

03088
1

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

UNIDAD ACADEMICA DE CICLOS PROFESIONALES Y DE
POSGRADO

M. en B. Rafael Germán Campos Montiel

Presenta Tesis Doctoral

CARACTERIZACION Y FRACCIONAMIENTO DE
COMPUESTOS ACTIVOS CON EFECTOS
PROBIOTICOS CONTENIDOS EN
CULTIVOS FUNGICOS

Tutor
Dr. Gustavo Viniegra González

Jurado
Dra. Alicia González Manjarrez
Dr. Guillermo Aguilar Osorio
Dr. Sergio Revah Moissev
Dr. Fernando Pérez Gil
Dr. Eduardo Bárzana García
Dra. Ma. del Carmen Wachter Rodarte

278586

México, D.F., Mayo del 2000



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

A characterization of the probiotic fractions of three fungal cultures named *Saccharomyces cerevisiae* (Ys), *Aspergillus oryzae* (Ao) and *Aspergillus niger* (An), was made. The bioassay used was based on the enhancement of cellulose digestion done by a bacterial consortium, under anaerobiosis. The bacterial consortium was obtained through a long term continuous culture. The anaerobic bacteria were obtained from bovine rumen liquor. The culture was made within an anaerobic continuous reactor, fed with 6 g/L of carboxy-methyl-cellulose (CMC).

Water extracts from fungal samples were filtrated through a Whatman 5 paper and passed through a Millipore membrane having pore size smaller than 0.45 μm . All samples that were added to the fermentation at catalytic levels (2 % V/V), had stimulatory effects on the rate of growth of the bacterial consortium.

The probiotic activity was resistant to heat incubation (120°C for 15 minutes) and was extracted in a pH range between 4 and 10.

Gel filtration with Sephadex G-50 showed active peaks with molecular weights as follows: one peak for Ys (MW \approx 4 kDa), other for An (MW \approx 6.1 kDa) and two peaks for An (MW \approx 3.9 and 15.2 kDa). The peak samples with MW less to 15 kDa had a positive effect on the bioassay. Gel filtration with Sephadex G25-80 with Ys extract showed only one peak detected by UV absorbancy with MW between 1 kDa and 5 kDa. The biochemical analysis showed that the peak fraction was positive for protein, negative for carbohydrates and without proteolytic activity.

Infrared spectra for peaks with positive effect in the bioassay and MW near 5 kDa showed functional groups (OH, NH, H-N-H and C=O) characteristic for peptides.

The conclusion was that main probiotic compounds contain in Ys, Ao and An were a mixture of polypeptides that stimulate the growth of anaerobic bacteria using CMC as a sole carbon source.

Ys Ao
[Handwritten signature]

Se caracterizaron y fraccionaron los componentes activos contenidos en tres cultivos fúngicos (*Saccharomyces cerevisiae* (Ys), *Aspergillus oryzae* (Ao) y *Aspergillus niger* (An), que tienen actividad promotora en la digestión anaerobia de fibras celulolíticas, para conocer su naturaleza química.

Por la complejidad del rumen se han tomado como modelos experimentales ensayos *in vitro*, para caracterizar los componentes activos con efectos probióticos. Por tal motivo, en esta tesis se desarrolló un nuevo bioensayo, en donde las bacterias anaerobias celulolíticas de origen ruminal se obtienen a partir del efluente de un biorreactor UASB alimentado con carboximetilcelulosa.

Los componentes de Ys, Ao y An con capacidad de estimular bacterias anaerobias con actividad CMCica fueron estables a 120°C por 15 minutos y a diferentes pH (4 y 10).

En el fraccionamiento por ultrafiltración se encontró que los componentes activos tuvieron pesos moleculares menores de 30 kDa. En la columna Sephadex G-50 se observaron un solo pico para Ys (PM ≈ 4 kDa), otro para An (PM ≈ 6.1) y dos picos para Ao (PM ≈ 3.9 y 15.2 kDa). Las muestras de los picos con PM inferiores a 15 kDa resultaron con acción positiva en el bioensayo. Por separado, se demostró que una muestra del extracto de Ys pasada por Sephadex G 25-80 (1 kDa < PM < 5 kDa) contenía también un solo pico. El análisis bioquímico mostró que la fracción que representaba el pico fue positiva a proteína, negativa a carbohidratos y sin actividad proteolítica medible.

El espectro infrarrojo mostró que los picos con efecto positivo en el bioensayo y peso molecular cercano a 5 kDa tuvieron grupos funcionales (OH, NH, C=O y H-N-H) característicos de péptidos.

Se concluye que los principales componentes probióticos contenidos en Ys, Ao y An son polipéptidos que actúan estimulando el crecimiento de bacterias anaerobias con actividad de CMCica.

CONTENIDO

	Pag.
RESUMEN	1
ANTECEDENTES	
2.1 Introducción	2
2.2 Planteamiento de la tesis	4
2.5 Hipótesis del trabajo	4
GENERALIDADES	
3.1 Funcionamiento del rumen	5
3.1.1 Aspectos generales	5
3.1.2 Clasificación de bacterias del rumen	6
3.1.3 Bioensayos <i>in vitro</i>	7
3.2 Efecto de los cultivos fúngicos	10
3.3 Características de los principios activos	13
3.4 Caracterización y fraccionamiento	14
3.4.1 Efecto de la temperatura	15
3.4.2 Efecto del pH	15
3.4.3 Intervalo de peso molecular	16
3.4.4 Cromatografía de exclusión molecular	16
3.5 Propuesta metodológica	
3.5.1 Desarrollo del bioensayo	18
3.5.2 Caracterización	
3.5.3 Fraccionamiento	
OBJETIVO	
4.0 Objetivo de la tesis	20
4.1 Metas	20
MATERIAL Y METODOS	
5.1 Materiales	
5.1.1 Cultivos fúngicos	21
5.1.2 Extractos fúngicos	21
5.2 Metodología	

	5.2.1.0 Arranque del reactor	21
	5.2.1.1 Bioensayo microbiano	22
	5.2.1.2 Medio de cultivo	23
	5.2.1.3 Cuantificación de las variables de respuesta	24
5.2.2 Caracterización y fraccionamiento		
	5.2.2.1 Efecto de la temperatura	24
	5.2.2.2 Efecto del pH	24
	5.2.2.3 Fraccionamiento por ultrafiltración	25
	5.2.2.4 Cromatografía de exclusión molecular (G-50)	25
	5.2.2.5 Cromatografía de exclusión molecular (G 25-80)	26
	5.2.2.6 Espectro infrarrojo	26
5.3 Estadística		26
RESULTADOS Y DISCUSION		
6.1 Bioensayo <i>in vitro</i>		
	6.1.1 Biorreactor	27
	6.1.2 Bioensayo	28
6.2 Caracterización y fraccionamiento		
	6.2.1. Efecto del pH y la temperatura	33
	6.2.2 Fraccionamiento por ultrafiltración	38
	6.2.3 Cromatografías de exclusión molecular	40
	6.2.4 Espectro infrarrojo	45
CONCLUSIONES		46
REFERENCIAS		49

RESUMEN

Se han formulado dos hipótesis sobre la naturaleza química de los compuestos activos contenidos en los cultivos fúngicos que tienen el efecto de mejorar la digestión ruminal e incrementar la producción de bovinos. Una de ellas se basa en la idea que son enzimas microbianas que intervienen en la digestión de forrajes y la otra que son metabolitos que estimulan el crecimiento de la microbiota ruminal. Por esta razón, los probióticos de tipo fúngico se les define como mezclas de microorganismos, enzimas, metabolitos y vitaminas que según los datos publicados, han aumentado la eficiencia de la digestión ruminal.

Esta tesis contribuye a caracterizar y fraccionar los componentes activos contenidos en cultivos fúngicos, que tienen actividad promotora en la digestión anaerobia de fibras celulolíticas, para conocer su naturaleza química y apoyar una de las hipótesis anteriores.

Por la complejidad del rumen se han tomado como modelos experimentales ensayos *in vitro*, para caracterizar los componentes activos con efectos probióticos. Por tal motivo, en esta tesis se desarrolló un nuevo bioensayo, en donde las bacterias anaerobias celulolíticas de origen ruminal se obtienen a partir del efluente de un biorreactor UASB alimentado con carboximetilcelulosa. El bioensayo consiste en cultivos anaerobios en lote, donde se observa la diferencia en la producción de proteína, actividad carboximetilcelulolítica (CMCica) y acetato entre los tratamientos con extractos fúngicos y el control (sin extracto).

Los resultados mostraron que los extractos fúngicos estimulaban la actividad de CMCica en forma significativa ($P < 0.05$) en el bioensayo y que esta actividad se puede correlacionar con la digestión ruminal de fibra detergente neutro.

Usando este nuevo bioensayo se procedió a caracterizar y fraccionar tres muestras de origen fúngico: Ys (*Saccharomyces cerevisiae*), Ao (*Aspergillus oryzae*) y An (*Aspergillus niger*).

Los componentes de Ys, Ao y An con capacidad de estimular bacterias anerobias con actividad CMCica fueron estables a 120°C por 15 minutos y a diferentes pH (4 y 10).

En el fraccionamiento por ultrafiltración se encontró que los componentes activos tuvieron pesos moleculares menores de 30 kDa. En la columna Sephadex G-50, que separa moléculas en el intervalo de 1.5 kDa < PM < 30 kDa se observaron un solo pico para Ys (PM ≈ 4 kDa), otro para An (PM ≈ 6.1) y dos picos para Ao (PM ≈ 3.9 y 15.2 kDa). Las muestras de los picos con PM inferiores a 15 kDa resultaron con acción positiva en el bioensayo. Por separado, se demostró que una muestra del extracto de Ys pasada por Sephadex G 25-80 (1 kDa < PM < 5 kDa) contenía también un solo pico. El análisis bioquímico mostró que la fracción que representaba el pico fue positiva a proteína (medida por el método de Bradford), negativa para carbohidratos y sin actividad proteolítica medible. En las restantes fracciones excluidas en la columna de Sephadex G25-80 no se detectaron carbohidratos ni proteína.

El espectro infrarrojo mostró que los picos con efecto positivo en el bioensayo y peso molecular cercano a 5 kDa tuvieron grupos funcionales (OH, NH, C=O y H-N-H) característicos de factores de crecimiento de tipo peptídico.

Se concluye que los principales componentes probióticos contenidos en Ys, Ao y An son compuestos de tipo peptídico que actúan estimulando el crecimiento de bacterias anaerobias con actividad de CMCica.

ANTECEDENTES

2.1 INTRODUCCIÓN

En años recientes el uso de cultivos fúngicos como promotores de crecimiento en la producción de bovinos ha aumentado, por el motivo de que los productores pretenden obtener más ganancias al incrementar la eficiencia biológica del rumen.

A los cultivos fúngicos usados como promotores de crecimiento se les denominan probióticos y son aquellos compuestos químicos que no son nutrientes esenciales, que se adicionan a los alimentos para incrementar la eficiencia de la digestión ruminal y con ello la producción animal. El uso de este tipo de aditivo se remonta a los años 30's, cuando en forma empírica se le adicionaban a las dietas levaduras para incrementar la producción animal (Dawson., 1993). Los cultivos fúngicos más usados comercialmente como probióticos en rumiantes son *Aspergillus oryzae* y *Saccharomyces cerevisiae*, pero, Tapia y col., (1988) encontraron efectos probióticos con cultivos de *Aspergillus niger*.

Es de notarse que las patentes registradas en Estados Unidos de América sobre este tipo de aditivos con los números de registro 4, 175, 121 del 20 de Noviembre de 1979 y 5, 501, 857 del 26 de Marzo de 1996 que fueron obtenidas de la base de datos de US Patent & Trademark Office muestran a estos productos como una mezcla de microorganismos, metabolitos, enzimas, vitaminas, amortiguadores y minerales.

En la actualidad existen dos hipótesis sobre la manera que actúan los cultivos fúngicos en la digestión ruminal:

La primera sugieren que son metabolitos con un efecto positivo en el crecimiento y en la fisiología de los microorganismos del rumen que digieren los forrajes (Wiedmeier y col., 1987) o que consumen un exceso de ácidos orgánicos (Chaucheyras y col., 1995).

La segunda apoya la idea de un efecto directo de enzimas hidrolíticas contenidas en cultivos fúngicos (hongos y levaduras) que aumenta la digestión de forrajes y de piensos (Beauchemin y col., (1995) y Lewis y col., (1996)).

En la actualidad existen pocos estudios sobre las características fisicoquímicas de los principios activos contenidos en los cultivos fúngicos usados como probióticos, ya que la mayoría de los trabajos se han encausado a la fisiología ruminal y a la producción animal (Campos y Viniegra, 1994).

Por la complejidad de rumen los estudios de caracterización solamente se han realizado con bioensayos *in vitro* (cultivos puros, biorreactores y digestibilidades con líquido ruminal). Por lo tanto, en este trabajo se trabajó con un biorreactor con bacterias anaerobias que muestran actividad carboximetilcelulolítica, ya que esta actividad se correlaciona con la degradación de la fibra en la digestión ruminal.

2.2 PLANTEAMIENTO DE LA TESIS

Las patentes sobre estos productos biotecnológicos los presentan como mezclas de microorganismos, metabolitos, enzimas, vitaminas, amortiguadores y minerales, pero los estudios que apoyan las dos principales hipótesis descritas anteriormente sobre la manera que estos productos incrementan la digestión ruminal sugieren que los principales componentes probióticos podrían ser metabolitos, enzimas y/o vitaminas. La hipótesis de que el principal componente activo responsable del incremento de la digestibilidad sean las enzimas microbianas contenidas en los probióticos fue puesta en entre dicho en estudios previos que preceden a este trabajo (Campos, 1991). Esencialmente, no se encontró una correlación entre los niveles de celulasas, amilasas, proteasas y lipasas y los incrementos observados en la digestibilidad *in vitro* de los alimentos ricos en celulosa, almidón, proteínas y grasas respectivamente. Por la tanto, se decidió caracterizar y fraccionar estos compuestos activos contenidos en los cultivos fúngicos que promueven el crecimiento de las bacterias anaerobias con actividad carboximetilcelulolítica procedentes de un reactor UASB arrancado con líquido ruminal.

2.3 HIPOTESIS DE TRABAJO

Los componentes activos contenidos en los cultivos fúngicos que mejoran la digestión ruminal de forrajes de baja calidad son metabolitos, termoestables e hidrosolubles que estimulan el crecimiento de bacterias anaerobias celulolíticas.

GENERALIDADES

3.1 FUNCIONAMIENTO DEL RUMEN

El rumen es uno de los compartimentos del estómago de animales poligástricos, en el cual los microorganismos del rumen pueden degradar carbohidratos complejos, como la celulosa, la cual no se puede hidrolizar con enzimas que excretan los monogástricos.

3.1.1 Aspectos generales de la ecología ruminal

La alimentación de rumiantes es muy variable (carbohidratos, proteínas, grasas, numerosos compuestos orgánicos y minerales), por esta razón, existe una gran diversidad de microorganismos en el rumen, que tienen una alta especificidad por sus nutrientes y por el nicho ecológico que ocupan. Es decir, existe una compleja asociación bioquímica entre los microorganismos del rumen.

La mayoría de las bacterias del rumen son Gram negativas cuando su alimentación es predominantemente de forraje y heno, pero cuando se alimentan con grandes cantidades de granos o concentrados, aumenta la proporción de bacterias Gram positivas (Caldwell y Bryant, 1966). En su morfología, la mayoría de las bacterias del rumen son cocos y bacilos cortos de diferentes tamaños con un rango de 0.4 a 1.0 μm de diámetro y de 1 a 3 μm de longitud, que están adaptados a vivir en las siguientes condiciones fisicoquímicas: pH 5.5-7, ausencia de oxígeno y una temperatura de 39-40°C (Hungate, 1966).

3.1.2 Clasificación de las Bacterias del Rumen

En forma muy general las bacterias ruminales, se pueden clasificar por el tipo de sustrato que digieren. Los principales materiales utilizados son: carbohidratos complejos (*celulosa, hemicelulosa y almidón*), proteínas y lípidos (Hungate, 1966).

Las bacterias que pueden digerir celulosa se les conoce como celulolíticas y pueden constituir del 15 al 20% del total de las bacterias del rumen cuando los animales son alimentados principalmente con forrajes. Además, estas bacterias tienen la habilidad de digerir hemicelulosa (Hungate, 1966). Las bacterias ruminales más comunes que fermentan celulosa, hemicelulosa y almidón se muestran en la Tabla 1 (Hungate, 1966).

Tabla 1. Principales Bacterias Ruminales Clasificadas por el Tipo de Carbohidrato Complejo que Digieren.

Carbohidrato Complejo
Celulosa
<i>Fibrobacter succinoges</i>
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>
<i>Butyrividrio fibrisolvens</i>
Almidón
<i>Streptococcus bovis</i>
<i>Bacteroides amylophilus</i>
<i>Bacteroides ruminicol</i>
<i>Succinimonas amylolytica</i>
<i>Selenomonas ruminantium</i>
Hemicelulosa
<i>Bacteroides ruminocola</i>
<i>Bacteroides amylogenes</i>
<i>Butyrividrio fibrisolvens</i>
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>
<i>Ruminococcus albus</i>

(Hungate, 1966).

Los generos de bacterias celulolíticas que pueden representar del 50 al 60 % en el ganado bovino y Ovino son *Fibrobacter*, *Ruminococcus* y *Butyrivivrio* (Hiltner y Dehority, 1983). Estas bacterias celulolíticas requieren para su crecimiento *in vitro* de vitaminas (p-aminobenzoico y biotina), amonia y cisteina (Scott y Dehority, 1965). El principal producto de la fermentación y la transformación de la celulosa y hemicelulosa por las principales bacterias celulolíticas es el ácido acético (Haigler y Weimer, 1991).

Los ácidos grasos volátiles son absorbidos por el animal para posteriormente ser utilizados como fuente de energía en rutas catabólicas, pero también, en el rumen se encuentran las bacterias metanogénicas que pueden transformar estos productos en bióxido de carbono y metano. Este tipo de bacterias no son deseables en la fermentación ruminal, ya que representan una pérdida de carbono y energía para el animal rumiante. Por ello se utilizan aditivos comerciales que inhiben su crecimiento.

Para simplificar las evaluaciones de la digestión ruminal, algunos autores han realizado sus investigaciones sobre los cultivos fúngicos como probióticos utilizando bioensayos *in vitro* como: digestibilidades con líquido ruminal (Tapia y col., 1988), cultivos puros (Nisbet y Martin, 1991) y biorreactores (Newbold y col., 1991), los cuales serán discutidos a continuación.

3.1.2 Bioensayos in vitro

El rumen de un vacuno adulto por lo general tiene una capacidad de 60 litros, con cerca de 10^{10} microorganismos por mililitro (Hungate, 1966).

Debido a la gran diversidad de microorganismos presentes y de sus nichos ecológicos, todavía no se conocen todos los detalles relativos a sus actividades bioquímicas. Por estas razones se han diseñado diferentes bioensayos *in vitro* para evaluar aspectos específicos sobre la digestión ruminal y como sistemas preliminares de evaluación.

Los bioensayos más utilizados son: cultivos puros, medición de la digestibilidad *in vitro* y biorreactores.

Todos estos ensayos tienen las siguientes ventajas:

- 1) Requieren muestras de pequeño volumen.
- 2) Son más rápidos.
- 3) Tienen un mayor control de variables.

La digestibilidad *in vitro* con líquido ruminal es una técnica muy utilizada en nutrición de rumiantes. Fue diseñada por Tilley y Terry, (1963) y en su primer fase simula la digestión ruminal al poner la muestra a incubar con líquido ruminal. Este método tiene la desventaja de estar influenciado por las características nutricias y microbianas del líquido ruminal que pueden estar relacionadas con el tipo de dieta que tenga el animal donador del líquido ruminal. Campos y col., (1997) indicaron que la adición de alfalfa fresca en la dieta del animal donador del líquido ruminal disminuía o hacia imperceptible el efecto probiótico de aditivos fúngicos sobre la digestibilidad *in vitro* de forrajes, mientras que en animales alimentados con rastrojo de maíz, si se observó dicho efecto. Varel y Kreikemeier, (1994) reportaron resultados similares.

Esta observación apoya la necesidad de tener bioensayos que no dependan de factores nutricios o ambientales externos a la prueba de probióticos

El uso de cultivos puros de bacterias ruminales es otro bioensayo que se remontan a los años 50's, cuando se aislaron los microorganismos para estudiarlos y tratar de entender su funcionamiento en el rumen (Hungate, 1966). El cultivo puro más utilizado para estudiar a los cultivos fúngicos y su efecto en la digestión ruminal es la bacteria *Selenomonas ruminantium*, ya que esta bacteria puede representar hasta un 51% de la microbiota ruminal (Caldwell y Bryant, 1966) en animales alimentados con granos y/o concentrados, pero esta bacteria no sería representativa del rumen en animales alimentados con dietas alta en forrajes de poca calidad como el rastrojo de maíz.

Otro bioensayo propuesto es el uso de biorreactores. Uno de los biorreactores más conocidos que tratan de simular al rumen es el *Rusitec* descrito por Czerkawski y Breckenridge, (1977). Es un biorreactor cilíndrico con cuatro compartimentos, cada uno con una capacidad de 1 L. Existen otros reactores anaerobios como el UASB (reactor anaerobio de flujo ascendente con lecho de lodos) que pueden proporcionar una microbiota anaerobia que permitiría determinar el efecto probiótico de los cultivos fúngicos, como el de estimular el crecimiento microbiano. El funcionamiento del reactor UASB se basa en la formación de un lecho en el cual se encuentran microorganismos asociados en granos y como consecuencia el tiempo de residencia de los microorganismos dentro del reactor tienen un tiempo prolongado (Lettinga y col., 1985). Sin embargo, no se han desarrollado sistemas estables y específicos de tipo UASB para

obtener microbiota de origen ruminal con actividad de carboximetilcelulolítica para bioensayos *in vitro*. Este sistema será estudiado en esta tesis y su desarrollo será uno de los aspectos fundamentales de este trabajo.

3.2 EFECTOS DE LOS CULTIVOS FÚNGICOS EN EL RUMEN

Los principales efectos reportados por la adición de cultivos fúngicos son los siguientes:

- 1) Estimulan el crecimiento de microorganismos ruminales.
- 2) Incrementan la digestibilidad de forrajes.
- 3) Influyen en la fermentación ruminal.
- 4) Promueven una mayor producción de leche.

Tabla 2 Efecto de los Cultivos Fúngicos en los Microorganismos Ruminales

Cultivo Fúngico	Microorganismo Estimulado Significativamente	Autores
Ao	Bacterias celulolíticas	Wiedmeier y col., (1987)
Sc	Bacterias anaerobias	Dawson y col., (1990)
Ao	Bacterias anaerobias	Fondevila y col., (1990)
Ao	Bacterias celulolíticas	Newbold y col., (1991)
Sc	<i>Selenomonas ruminantium</i>	Nisbet y Martin, (1991)
Ao	Protozoarios	Ayala y col., (1992)
Ao	<i>Neocallimastix frontalis</i>	Welch y Calza, (1993)
Sc ⁺	Bacterias anaerobias	Newbold y Wallace, (1993)
Sc	Protozoarios	Plata y col., (1993)
Sc ⁻	Bacterias que utilizan lactato	Girad y col., (1993)
Ao	<i>Selenomonas ruminantium</i>	Nisbet y Martin, (1993)
Ao	<i>Ruminococcus albus</i>	Varel y Kreikemeier, (1994)
SC	Bacterias acetogánicas	Chaucheyras y col., (1995)

Ao: *Aspergillus oryzae* (Amaferm).

Sc: *Saccharomyces cerevisiae*.

Sc⁺: *Saccharomyces cerevisiae* NCY240.

Sc⁻: *Saccharomyces cerevisiae* (Yea-Sacc).

Los cultivos fúngicos estimulan el crecimiento de microorganismos ruminales de manera no específica (Tabla 2), ya que existen informes de un efecto estimulativo en el crecimiento de diferentes tipos de poblaciones (bacterias anaerobias totales, bacterias celulolíticas, bacterias que consumen ácido láctico, protozoarios y hongos), por la adición de éstos aditivos.

Con la adición de cultivos fúngicos en la dieta de rumiantes se observa un incremento en la digestibilidad de forrajes (Tabla 3) y los mejores resultados se han obtenido en alimentos de baja calidad (Campos y Viniegra, 1994).

Tabla 3 Efecto de los Cultivos Fúngicos en la Digestibilidad Ruminal

Cultivo Fúngico	Tipo de nutrimento	Autores
Ao	Materia seca	Van Horn y col., (1984).
Ao y Sc ¹	Hemicelulosa	
	Proteína cruda	Wiedmeier y col., (1987).
Ao, Th y Ps	Materia seca	Tapia y col., (1988).
Ao	Materia seca	Gomez-Alarcon y col., (1990).
Ao y An	Materia seca	
	Proteína cruda	Campos y col., (1990).
Ao	Materia seca	Ayala y col., (1992).
Ys	Materia seca	Sommart y col., (1993).
Sc	Fibra	Plata y col., (1993).

Ao: *Aspergillus oryzae*

Sc: *Saccharomyces cerevisiae*

Sc¹: *Saccharomyces cerevisiae* (Yea-Sacc)

El incremento de la digestibilidad de nutrimentos por adición de cultivos fúngicos, en dietas con alto contenido de forrajes, podría deberse principalmente al incremento de bacterias celulolíticas y hongos anaerobios (Tabla 2) y/o al contenido de enzimas hidrolíticas (Varel y col., 1993) y en las dietas con alto contenido de concentrados se podría deber a la estimulación de bacterias que consumen el lactato como *Selenomonas ruminantium* (Tabla 2) ya que estas bacterias evitarían la acidosis.

Los investigadores han esperado que al ver una mayor digestión de forrajes debería existir un incremento en los ácidos grasos volátiles (acético, propiónico y butírico) y una disminución de amoníaco, pero los resultados han sido muy diversos y en la mayoría no se indican cambios significativos asociados a la adición de cultivos fúngicos (Campos y Viniegra, 1994).

Algunos autores no han encontrado efectos en la digestión ruminal por la adición de materiales fúngicos (Arambel y col., 1987; Finkins y col., 1990; Frumholtz y col., 1989); incluso otros han encontrado efectos negativos (Martin y Nisbet, 1990). Estos resultados se les podría atribuir a la influencia que tienen las interacciones dieta-probiótico como han comentado Dawson, (1993) y Campos y col., (1997). Es decir, para que haya un efecto en la digestión ruminal aparentemente se requiere que la dieta sea deficiente en factores nutricios (Plata y col., 1993) o este excedida en niveles de carbohidratos de fácil asimilación (Fondevila y col., 1990).

En resumen: Se ha documentado con numerosos experimentos que la adición de biomasa o de extractos de cultivos fúngicos (hongos y levaduras) incrementan la producción animal (Huber, 1988) muy por encima de lo esperado por la cantidad de material digerible añadido. Sin embargo no se ha logrado demostrar contundentemente a que se debe el efecto de mejorar la digestión ruminal. Esto puede deberse a un efecto de metabolitos que actúan sobre los microorganismos ruminales (Nisbet y Martin, 1993) o un efecto enzimático (Varel y col., 1993).

En un estudio previo (Campos y col., 1991), no se encontró correlación entre las actividades enzimáticas (celulasas, amilasas, proteasas y lipasas) de los

cultivos fúngicos y el efecto de incrementar de digestibilidad en piensos muy diversos (fibrosos, amiláceos, proteínicos y grasos). Por lo tanto, se ha formulado la hipótesis contraria: El efecto mejorar la digestión ruminal se debe a metabolitos como: vitaminas, aminoácidos y ácidos orgánicos (Callaway y Martin, 1997) presentes en los extractos de la biomasa, y estos compuestos pueden ser concentrados y procesados como aditivos para enriquecer los alimentos de los vacunos.

3.3 CARACTERISTICAS DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS CONTENIDOS EN LOS CULTIVOS FÚNGICOS CON EFECTOS EN LA DIGESTION RUMINAL

Existen pocos reportes sobre las características fisicoquímicas de los componentes activos de los cultivos fúngicos que incrementan la digestión ruminal.

Nisbet y Martin, (1991 y 1993) observaron que los principios activos de *Aspergillus oryzae* y *Saccharomyces cerevisiae* que estimulaban el crecimiento de bacteria ruminal *Selenomonas ruminantium* eran hidrosolubles y que podrían ser ácidos como el málico y el fumárico. Además otros autores encontraron que los componentes activos de *Saccharomyces cerevisiae* y *Aspergillus oryzae* que estimulaban el crecimiento de bacterias anaerobias eran termolábiles a 120⁰C (Dawson y col., (1990) y Newbold y col., (1991) respectivamente).

Newbold y col., (1991) reportaron que la viabilidad de *Aspergillus oryzae* no influía en su efecto de estimular el crecimiento de las bacterias anaerobias en

un biorreactor que simulaba el rumen, ya que los extractos sometidos a rayos gamma conservaban su efecto.

En un estudio previo (Campos, 1991) se demostró que una muestra cruda de *Aspergillus niger* crecido en pulpa de café tuvo un efecto probiótico por incrementar la digestibilidad *in situ* del rastrojo de maíz, indicando que los componentes activos eran hidrosolubles y termolabiles a 120⁰C. Por lo tanto se justifica la necesidad de caracterizar al material hidrosoluble de los cultivos fúngicos que es el responsable de estimular el crecimiento de las bacterias ruminales con actividad celulolítica.

3.4 CARACTERIZACIÓN Y FRACCIONAMIENTO DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS CONTENIDOS EN LOS CULTIVOS FUNGICOS

En la actualidad no se han reportado cuáles son los compuestos activos que contienen los cultivos fúngicos que son responsables del efecto probiótico asociado al crecimiento de los microorganismos anaerobios. Por ello en la literatura científica del tema se habla de mezclas de biomasa microbiana, enzimas, vitaminas, minerales y otros nutrientes no específicos (Huber, 1988) o de microorganismos viables (Fuller, 1989).

La identificación de los compuestos activos contenidos en los cultivos fúngicos se inició con una caracterización del material crudo, determinando el efecto de la temperatura y el pH en los compuestos activos. Posteriormente se fraccionó por ultrafiltración y por cromatografía de exclusión molecular. Por ultimo a las fracciones activas se analizó por medio

de un espectro infrarrojo.

3.4.1 Efecto de la temperatura en la actividad biológica de compuestos orgánicos

La mayoría de los compuestos orgánicos de bajo peso molecular pueden cambiar de estado físico conservando su estructura y actividad química (ejemplo: ácidos carboxílicos y aminoácidos). Las vitaminas como la tiamina, niacina, biotina, p-aminobenzoico y cianocobalamina son muy estables al calor (Maynard y col., 1987). Por lo que, su actividad biológica no se ve afectada por un tratamiento con temperaturas entre 50 y 120°C. En cambio, las proteínas y ácidos nucleicos pierden su estructura terciaria y/o cuaternaria y con ello su actividad biológica, cuando son calentados a temperaturas entre 60 y 120°C. Las enzimas celulolíticas de cultivos fúngicos como *Trichoderma*, *Fusarium* y *Aspergillus* pierden su actividad con temperaturas mayores a 80°C y su temperatura óptima de actividad es cercana a los 55°C (Haigler y Weimer, 1991), pero, existen enzimas celulolíticas termoestables a 106°C (Bok-Jin-Duck y col., 1998).

3.4.2 Efecto del pH

La solubilidad en el agua de diferentes compuestos se ve influenciado por el pH y es indicativo de la polaridad de una molécula, porque la solubilidad en cierto solvente depende de la capacidad de estos compuestos para tener interacciones con dicho solvente (Shriner y col., 1985).

Las vitaminas del tipo "B" como la tiamina, niacina, piridoxina, piridoxal, biotina, p-aminobenzoico son solubles en agua sin importar el pH, mientras el ácido fólico es inestable en pH ácidos, mientras la rivotflavina es más

soluble en pH básicos (Maynard y col., 1987).

Las celulasas producidas por hongos filamentosos como: *Trichoderma*, *Fusarium* y *Aspergillus* son menos solubles en medios con pH cercanos a 4, ya que su punto isoeléctrico por lo general, es de 4.5 (Haigler y Weimer, 1991).

3.4.3 Intervalo del Peso Molecular

Los compuestos orgánicos solubles en agua que podrían tener actividad probiótica se podrían dividir en forma gruesa en macromoléculas como polisacáridos y proteínas con masa superior a 30 kDa y oligómeros de tipo peptídico y monómeros como: ácidos carboxílicos, aminoácidos y vitaminas del tipo "B" con masa menor a 30 kDa (Legaz y Córdoba, 1993). Esta división está basada en el hecho de proteínas con actividad biológica no pasan por poros de una membrana de celofán. Sin embargo desde el punto de vista de la fisiología microbiana, la membrana celular sólo es permeable a compuestos menores a unos cuantos Da. y por ello requieren de enzimas hidrolíticas para alimentarse de polímeros o de oligómeros con masa mayor a 1 kDa.

3.4.4 Cromatografía de Exclusión Molecular

Se basa en el tamaño o forma molecular de las especies de la muestra. Se efectúa en una columna, donde el relleno consiste en pequeñísimas partículas 10 μm de diámetro, de sílice o de polímeros que forman una red de poros uniformes a través de la cual pueden difundir las moléculas de soluto y de disolvente. (Laurent y Killander, 1964). Existen diferentes tamices, dependiendo del intervalo de peso molecular que se quiera separar.

Por lo que es importante conocer en que intervalo de peso molecular se encuentra el compuesto a analizar.

Por lo general para detectar los compuestos orgánicos se utiliza la espectroscopía ultravioleta, ya que el 65% de los compuestos absorben a 254 nm y es apto para sustancias como ácidos carboxílicos, aminoácidos y vitaminas del tipo “B” que tienen uno o más dobles enlaces. Es importante recalcar que esta detección no aporta información sobre la estructura (Legaz y Córdoba, 1993).

Las celulasas de hongos filamentosos como *Trichoderma*, *Fusarium* y *Aspergillus* presentan pesos moleculares mayores de 30 kDa (Haigler y Weimer, 1991). Los factores de crecimiento de tipo peptídico tienen pesos moleculares entre 30 y 1 kDa (McKay y Leigh, 1993). Las vitaminas del tipo “B”, aminoácidos y ácidos carboxílicos tienen pesos moleculares menores a 1 kDa (Morrison y Boyd, 1990).

3.5 PROPUESTA METODOLOGICA

3.5.1 Desarrollo del bioensayo

Se montó un bioensayo utilizando un biorreactor tipo (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) UASB (Lettinga y col., 1985). El reactor se inoculó con líquido ruminal de un bovino y su influente fue un medio de cultivo que tuvo como única fuente de carbono a la carboximetilcelulosa. Del efluente se obtuvo un cultivo mixto de bacterias anaerobias celulolíticas de origen ruminal. Cuando el reactor estuvo en fase estacionaria se usó su efluente como fuente de microorganismos para realizar bioensayos *in vitro* en cultivos en lote. El efecto probiótico de promover el crecimiento microbiano se determinó al cuantificar en el bioensayo la producción de proteína, actividad de carboximetilcelulolítica y acetato.

3.5.2. Caracterización de los componentes activos

Para caracterizar los componentes probióticos contenidos en los cultivos fúngicos se utilizó el nuevo bioensayo *in vitro*. Primero se determinará la estabilidad térmica de los compuestos activos contenido en los extractos fúngicos al calentarlos diferentes temperaturas (60, 90 y 120°C). Posteriormente se observó la influencia del pH (4 y 10) en la estabilidad de los compuestos activos que promueven el crecimiento en el bioensayo.

3.5.3 Fraccionamiento de los componentes activos

Primero se realizó una ultrafiltración con cortes de 300 y 30 kDa para conocer el intervalo de peso molecular se encontraban los componentes activos contenidos en los cultivos fúngicos. Posteriormente conociendo el intervalo de peso molecular donde se encuentran los componentes activos.

Se escogió el tamiz a utilizar para estimar el peso molecular de las fracciones que tengan un efecto positivo en el bioensayo, para proceder a su caracterización por espectroscopía infrarroja.

OBJETIVO

4.0 OBJETIVO DE LA TESIS

Caracterizar y fraccionar los componentes probióticos de los extractos de *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus oryzae* y *Aspergillus niger* que pueden mejorar la digestión ruminal. Esto en un nuevo bioensayo *in vitro* con un cultivo mixto de bacterias anaerobias con actividad de carboximetilcelulolítica de origen ruminal obtenidas en un biorreactor de digestión anaerobia.

4.1 Metas

4.1.1. Diseñar y montar un bioensayo con un cultivo mixto de bacterias anaerobias con actividad carboximetilcelulolítica de origen ruminal crecidos en un biorreactor anaerobio continuo para detectar efectos que puedan mejorar la digestión ruminal.

4.1.2. Caracterizar los componentes activos contenidos en los cultivos fúngicos determinando: la estabilidad a diferentes temperaturas y a diferentes pH.

4.1.3 Fraccionar los extractos de los cultivos fúngicos por ultrafiltración para determinar el intervalo aproximado de su peso molecular y posteriormente por cromatografías de exclusión molecular estimar el peso molecular de las fracciones con efectos positivos en el bioensayo

4.1.4 Analizar las fracciones obtenidas en las cromatografías de exclusión molecular con efectos positivos en el bioensayo mediante un espectro infrarrojo.

MATERIAL Y METODOS

5.1 Materiales

5.1.1 Cultivos Fúngicos

- Yea-Sacc es un producto comercial, el cual tiene como base 55×10^6 /g de levaduras de *Saccharomyces cerevisiae* (Ys), 34 U/g de amilasa e invertasa y metabolitos solubles como vitaminas (tiamina, riovoflavina, niacina, ácido fólico, colina). Este aditivo es producido por Alltech en EUA .
- Amaferm es otro producto comercial que contiene extractos de fermentaciones de *Aspergillus oryzae* (Ao) y contiene 130 U/g de celulasas y 586 U/g de amilasas, y es producido por BioZyme Enterprises en EUA .
- Un producto de fermentación sólida que fue producido por la planta de fermentaciones de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Se obtuvo a partir de un cultivo de *Aspergillus niger* (An) crecido sobre pulpa de café. Este producto demostró tener efecto al incrementar la digestibilidad del rastrojo de maíz en ensayos *in situ* en vacas Holstein como lo reportaron Campos y col., (1990) y contiene 150 U/g de celulasas.

5.1.2 Extractos Fúngicos

- Se tomaron 10 g en base seca del cultivo fúngico (Ao, An y Ys).
- Se mezclaron en 100 mL de agua desionizada durante una hora.
- Se filtraron en papel Whatman No. 5.
- Se esterilizaron a través de una membrana Millipore con un poro de 0.45 μm .

5.2 METODOLOGÍA

5.2.1 Montaje de un Bioensayo in vitro con un Cultivo Mixto

5.2.1.0 Arranque del Reactor

- Se utilizó un reactor cilíndrico de 43.5 cm de alto, 9.4 cm de diametro y con un volumen de operación de 2.5 L.
- Se inoculó con 500 mL de líquido ruminal de una vaca Holstein fistulada

con un peso de 450 Kg, no preñada y no lactante.

- La vaca fue alimentada con una dieta de (60:30:10) de forraje, ensilado de maíz y concentrado, respectivamente, dos veces al día a la misma hora.
- El líquido ruminal fue tomado 3.5 horas después de la alimentación de la mañana, extrayendo de la parte intermedia del rumen y transportado en un termo totalmente lleno para inocular inmediatamente el biorreactor.
- El reactor después de ser inoculado se puso en un régimen de lote por 3 días para que posteriormente pasarlo a un cultivo continuo con un flujo de 6 mL/día por 3 semanas y finalmente se incrementó el flujo hasta 550 mL/día.
- El influente de biorreactor tuvo los mismos nutrientes que el bioensayo que se encuentran en la pag. 25.
- El seguimiento de los siete primeros meses fue con densidad óptica (medición a 600 nm), los siguientes 6 meses se determinó densidad óptica, proteína (Lowry y col., 1951), actividad de carboximetilcelulolítica (Miller, 1959), acetato (Gómez y Coronado, 1983) y pH (medición directa).

Inóculo para los bioensayos

Se utilizó el efluente del biorreactor descrito anteriormente en su estado estacionario como la fuente de inóculo de los bioensayos microbianos.

5.2.1.1 Bioensayo Microbiano

- Se utilizaron cultivos anaerobios en lote.
- Las botellas serológicas tuvieron un volumen nominal de 60 mL.
- Cada botella contenía 25 mL de un medio con base de sales minerales y carboximetilcelulosa que es descrito posteriormente.
- A cada botella se inoculó con 1 mL del efluente del biorreactor UASB el cual contenía a los microorganismos anaerobios, en sustitución del líquido

ruminal.

- Se incubó a una temperatura de 39° C.
- A cada botella se le adicionó el extracto del cultivo fúngico a una dosis (2%(V/V)).
- En cada corrida se tuvieron cultivos microbianos testigos (sin la adición del aditivo fúngico).

El crecimiento microbiano fue determinado por densidad óptica (600 nm) contra un blanco sin inocular.

5.2.1.2 Medio de cultivo

El medio contenía los siguientes nutrientes (mg/L):

- Na₂HPO₄, 600.
- KCl, 580.
- MgSO₄·7H₂O, 100.
- CaCl₂, 64.
- (NH₄)₂SO₄, 480.
- NaHCO₃, 4000.
- Resarzurina, 1.
- Peptona de caseína, 100.
- Extracto de levadura, 100.
- Carboximetilcelulosa, 6000.

Todos los ingredientes fueron disueltos y esterilizados en el mismo matraz, excepto la carboximetilcelulosa, la cual se disolvió separadamente y se agregó para tener una concentración final de 6 g/L. El medio se ajustó a un pH de 6.8 con HCl.

5.2.1.3 Cuantificación de las Variables de Respuesta (proteína, actividad de carboximetilcelulolítica y acetato)

- La cuantificación de los parámetros de respuesta se realizó en muestras con 24 horas de fermentación.
- Se agitaron las botellas que contenían los cultivos microbianos con un vortex por 30 segundos.
- Se tomó una alícuota de 4 mL.
- Se centrifugó 5000 rpm por 20 minutos.
- A los precipitados resuspendidos con 2 mL de agua destilada se le determinó el contenido proteico de la biomasa por el método de Lowry y col., (1951).
- En los sobrenadantes se determinó la producción de acetato por la técnica propuesta por Gómez y Coronado, (1983) y se cuantificó la actividad de carboximetilcelulolítica mediante la medición de azúcares reductores corrigiendo el contenido de los carbohidratos iniciales con un testigo (Miller, 1959).
- El pH se evaluó por medición directa.

5.2.2 Caracterización y Fraccionamiento de Cultivos Fúngicos

5.2.2.1 Efecto de la temperatura

- Los tratamientos consistieron en calentar los extractos fúngicos a 60, 90 y 120°C por 15 minutos.
- Se determinó la actividad residual en el bioensayo microbiano.
- Se utilizaron dos testigos; uno con extracto sin calentar y el otro sin extracto.

5.2.2.2 Efecto del pH

- Se utilizó el mismo procedimiento que los extractos fúngicos, pero, en vez de agua desionizada se utilizaron dos amortiguadores diferentes: acetato y

carbonato con pH de 4 y 10 respectivamente.

- Se probó cada extracto en el bioensayo microbiano.
- Se empleó un testigo sin la adición de extracto fúngico.

5.2.2.3 Fraccionamiento por ultrafiltración

- Se filtraron 5 mL de los extractos fúngicos a través de filtros Millipore ultrafree-PFL para pesos moleculares nominales de 300 kDa y 30 kDa.
- Cada filtración fue probada en el bioensayo microbiano.
- Se emplearon dos testigos; uno con el extracto crudo y el otro sin extracto.

5.2.2.4 Cromatografía de Exclusión Molecular (Sephadex G-50)

- Se utilizaron extractos fúngicos ultrafiltrados (<30 KD).
- Se empleó una columna de 1.6 x 75 cm.
- Se equilibró con un amortiguador de 0.1 M de fosfatos pH de 7.
- El flujo fue de 15 mL/h.
- El volumen colectado fue de 5 mL.
- Las fracciones se analizaron por espectrofotometría ultravioleta a 254 nm.
- Cada pico fue probado en el bioensayo microbiano.

La curva de calibración para estimar el peso molecular fue realizada con los siguientes marcadores: azul de dextrano (2×10^6), anhidrasa carbónica (29000), citocromo "C" (12400) y apronitrin (6500), corridos a las condiciones antes mencionadas.

Bioensayo de las fracciones que representaban picos obtenidos en Cromatografías de Exclusión Molecular

- Se utilizaron máximos obtenidos de cultivos fúngicos (Ys, Ao, y An) de diferentes columnas de exclusión molecular.
- Se probó cada pico en el bioensayo del cultivo mixto.
- Se emplearon dos testigos; uno con el extracto crudo y el otro sin extracto.

5.2.2.5 Cromatografía de Exclusión Molecular (Sephadex G 25-80)

- Se utilizó extracto de Ys
- Se empleó un equipo Biologic Chromotography System marca Bio-Rad.
- Se equilibró con un amortiguador de 0.1 M de fosfatos pH de 7.
- El flujo fue de 0.7 mL/mi.
- El volumen colectado fue de 3.5 mL.
- Las fracciones se analizaron por espectrofotometría ultravioleta a 254 nm.
- A cada pico se le determinó proteína (Bradford, 1976), azúcares totales (Trevelyan y Harrison, 1952) y actividad proteolítica (Dosoretz y col., 1990).
- Se calibró la columna con los siguientes marcadores: azul de dextrano (2×10^6) y rojo de congo (686.7) corridos a las condiciones antes mencionadas.

5.2.2.6 . Espectro Infrarrojo

- Se evaporaron a 60°C las fracciones que representaban picos con actividad positiva en el bioensayo.
- Se mezclaron los sólidos obtenidos con bromuro de potasio.
- Se produjeron pastillas y se realizaron barridos de 4400 a 500 cm^{-1} .
- Se graficaron y se compararon contra curvas patrón.

5.3 Estadística

Se llevó a cabo un análisis estadístico para el montaje del bioensayo con el cultivo mixto y los estudios de termoestabilidad, efecto del pH, fraccionamiento por ultrafiltración y exclusión molecular. El diseño experimental fue un bloque aleatorio. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado ($n=3$). Se analizaron los resultados por análisis de varianza con una significancia de ($P<.05$). Cuando se compararon medias se utilizó la prueba de Duncan's (Steel y Torrie, 1960).

RESULTADOS Y DISCUSION

6.0 Bioensayo *in vitro* Para Determinar Efectos Probióticos Usando un Cultivo Mixto

En este trabajo se desarrolló un bioensayo utilizando como inóculo los microorganismos contenidos en el efluente de un reactor anaerobio. El biorreactor empezó operar a partir del líquido ruminal de una vaca Holstein.

6.0.1 Biorreactor

En la Figura 1 se muestra el seguimiento del biorreactor por densidad óptica desde su inoculación hasta 410 días de operación. Se observa que en los primeros 60 días los microorganismos ruminales se adaptaron a las nuevas condiciones, seguido de una selección del consorcio microbiano capaz de utilizar la carboximetilcelulosa como fuente de carbono. En los siguientes 170 días se observó un estado de transición con un coeficiente de variación en la densidad óptica cercano al 30 % y por último un estado más estable a partir de los 225 días con un coeficiente de variación del 16.5%.

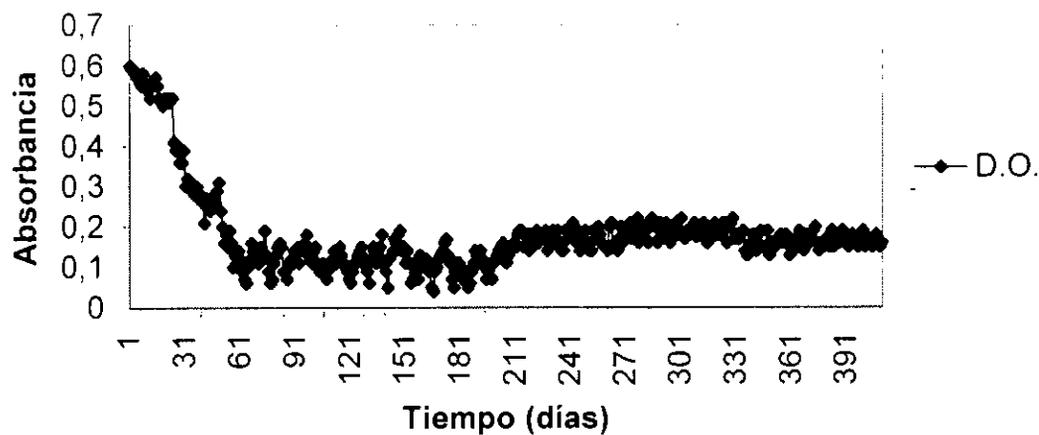


Figura 1 Seguimiento del biorreactor por densidad óptica a 600 nm.

Desde que el biorreactor formo su lodo granular y empezó a operar en estado estacionario (225 días) se evaluaron en forma diaria los parámetros mostrados en Tabla 4. No se observaron diferencias significativas ($P>.05$) entre valores de los parámetros analizados en este periodo (Tabla 4) que estuvieron cerca de: 0.17 en densidad óptica, 60 mg/L de proteína, 186 UI/L de celulasas, 37.5 μ mol de acetato y un pH de 6.7. Después de 410 días, el biorreactor se mantuvo entre 0.15 y 0.2 de densidad optica.

Tabla 4. Monitoreo del biorreactor en forma intensiva por 6 meses

Parámetros	Meses					
	7	8	9	10	11	12
D. O.	0.167±0.04	0.170±0.01	0.190±0.03	0.188±0.01	0.159±0.02	0.163±0.2
Proteína (mg/L)	53.7±7.2	59.2±5.3	60.1±4.5	66.3±6.9	52.2±4.2	68.2±6.1
Celulasas (UI/L)	175±12	180±15	197±16	179±9	198±18	189±11
Acetato (μ mol/L)	37.3±4.5	40.4±3.7	36.1±3.2	33.2±5.9	39.4±4.1	38.6±4.8
pH	6.64±0.5	6.53±0.4	6.23±0.3	6.95±0.6	6.84±0.3	6.91±0.7

D.O. = Densidad óptica.

Se concluye que se puede montar un biorreactor, mantenerlo en estado estacionario y proporcionar bacterias anaerobios celulolíticas de origen ruminal en forma constante para poder determinar efectos probióticos.

6.0.2 Bioensayo

El efluente del biorreactor en estado estacionario se utilizó como fuente de microorganismos anaerobios celulolíticos para el bioensayo.

Los resultados sobre el efecto de la adición de extractos fúngicos (*Saccharomyces cerevisiae* (Ys), *Aspergillus oryzae* (Ao) y *Aspergillus niger* (An)) en una cinética de crecimiento del cultivo mixto de bacterias

anaerobias celulolíticas con respecto al cultivo control sin extracto (To) se muestran en la Figura 2. Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) en densidad óptica entre los tratamientos con extractos de Ys, Ao y An y el control sin extracto (To) (Anexo 1). Además se observa que el mayor crecimiento en todos los cultivos fue a las 24 horas.

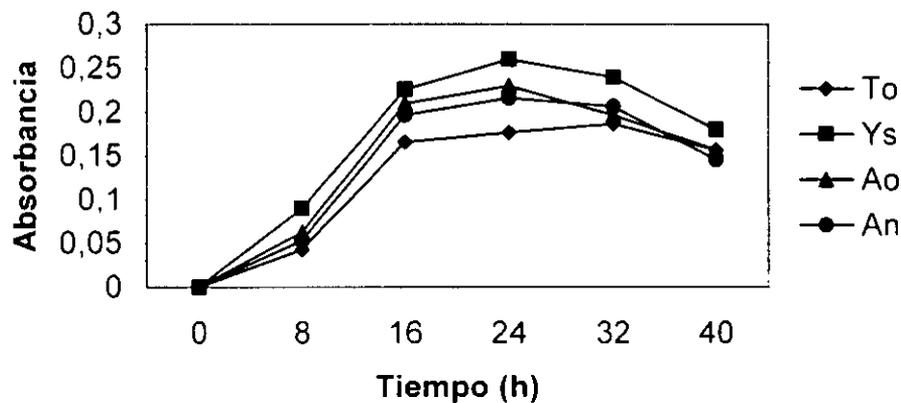


Figura 2 Efecto de la adición de extractos fúngicos (Ys, Ao y An) en el crecimiento del cultivo mixto de bacterias anaerobias celulolíticas en botellas serológicas, monitoreadas por densidad óptica (600 nm), con respecto al control sin extracto (To)

Los resultados en el nivel de proteína, actividad de carboximetilcelulolítica (CMCica) y de acetato en los diferentes tratamientos a las 24 horas se muestran en la Tabla 5. Los resultados en la producción de proteína concuerdan con lo observado en densidad óptica, pues sus valores se ordenan como sigue: $Ys > Ao > An > To$. El efecto de los extractos fúngicos en los niveles de actividad de CMCica y de acetato fue igual a los de proteína (Tabla 5), en la secuencia ordenada de los valores ($Ys > Ao > An > To$). Estas observaciones soportan la presencia de bacterias anaerobias con actividad carboximetilcelulolíticas (CMCica) de origen ruminal que fueron estimuladas en su crecimiento por la adición de extractos fúngicos.

Los análisis de varianza indicaron que para los niveles observados en proteína, actividad de CMCica y acetato existieron diferencias significativas ($P < .05$) entre los tratamientos con extractos (Ys, Ao y An), y el control sin extracto (To), aunque no fueron estadísticamente distintos ($P > .05$) entre los tratamientos con extractos fúngicos (Ys, Ao y An) (Anexo 1). Estos resultados son parecidos a los reportados por Newbold y col., (1991) con el biorreactor llamado *Rusitec*, en los cuales la adición de Ao incrementaba la población de bacterias celulolíticas. No se observaron diferencias significativas en los valores de pH ($P > .05$) entre los tratamientos asociados a la adición de los extractos fúngicos (Tabla 5).

Tabla 5. Efecto de los cultivos fúngicos (Ys, Ao y An) en la producción de proteína, actividad CMCica, acetato y pH en el cultivo mixto de bacterias anaerobias con respecto al control (sin extracto) a las 24 h de cultivo.

Tratamiento	Proteína mg/L	CMCica UI/L	Acetato $\mu\text{mol/L}$	pH
To	59.8 \pm 2.0 ^a	364 \pm 6.1 ^a	10.7 \pm 0.9 ^a	7.3 \pm 0.4
Ys	72.3 \pm 2.1 ^b	440 \pm 4.4 ^b	16.9 \pm 0.8 ^b	7.0 \pm 0.4
Ao	70.2 \pm 2.3 ^b	410 \pm 6.6 ^b	14.2 \pm 0.9 ^b	7.1 \pm 0.5
An	68.9 \pm 1.8 ^b	400 \pm 4.4 ^b	13.4 \pm 1.0 ^b	7.2 \pm 0.4

CMCica= Actividad de carboximetilcelulolítica.

To = Tratamiento sin la adición de extracto fúngico.

Ys = *Saccharomyces cerevisiae*.

Ao = *Aspergillus oryzae*.

An = *Aspergillus niger*.

^a Los tratamientos en la misma columna con diferente superíndice difieren ($p < .05$).

La actividad específica carboximetilcelulolítica no fue alterada por la adición de los cultivos fúngicos, lo que descarta que el mayor crecimiento del cultivo mixto se deba a un efecto másico. Hiltner y Dehority, (1983) reportaron que la adición de carbohidratos solubles es inversamente proporcional a la actividad celulolítica. Además Nam-Joo-Heon y col., (1998) encontraron que la actividad celulolítica de *Trichoderma reesei*

decrece hasta en un 50% cuando se le adiciona glucosa (efecto másico). Es decir, si el efecto del mayor crecimiento del cultivo mixto se debiera a una adición de carbohidratos solubles (factor másico) la actividad específica de la carboximetilcelulolítica disminuiría. Los resultados encontrados en este trabajo concuerdan con los reportados por Jouany y col., (1998), en los cuales extractos de Ys incrementaron la actividad carboximetilcelulolítica en bioensayos *in situ* en el rumen de borregos, que descarta la idea que el efecto de los cultivos fúngicos en el rumen se deba a un factor másico.

Estos resultados sugieren que la mayor actividad de carboximetilcelulolítica por la adición de Ys se deba a metabolitos contenidos en los extractos fúngicos que estimulan el crecimiento de las bacterias celulolíticas, ya que Ys no contiene enzimas celulolíticas. Además, es poco probable que el efecto por la adición de Ys en el bioensayo se deba a vitaminas debido al que el medio de cultivo contiene extracto de levadura la cual proporciona las mismas vitaminas que contiene Ys. Con Ao y An no se puede ser concluyente con la hipótesis que el efecto en el bioensayo se deba a metabolitos, ya que estos extractos si contienen enzimas celulolíticas (Ortiz y col., 1995).

Este trabajo también descarta la hipótesis de Wallace, (1994) la cual sugiere que el efecto de Ys en el rumen se debe a que la levadura crece en el rumen consumiendo oxígeno y de esta forma estimulando a los microorganismos anaerobios, ya que los extractos fúngicos usados en este trabajo fueron esterilizados al atravesar poros de 45 μm . En otras palabras, los extractos fúngicos usados en este estudio no contenían microorganismos viables, sino solamente compuestos hidrosolubles como: enzimas, metabolitos y

vitaminas. Además los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con las conclusiones de investigadores como Nisbet y Martin (1991 y 1993) y Campos y col., (1995), ya que los componentes activos de Ao, Ys y An que estimulan el crecimiento de la bacteria ruminal *Selenomonas ruminantium* eran también metabolitos hidrosolubles. Además, con este estudio se confirma que los compo nes hidrosolubles contenidos en los probióticos de tipo fúngico Ys, Ao y An estimulan bacterias ruminales en forma inespecífica. Su efecto se observó tanto en un cultivo mixto de bacterias anaerobias celulolíticas representativas de un bovino alimentado con una dieta alta en fibra evaluado en este trabajo, como en una bacteria ruminal que consume lactato (*Selenomonas ruminantium*) representativa de un bovino con una dieta rica en granos y concentrado evaluado por Nisbet y Martin (1991 y 1993), y por Campos y col., (1995).

Es importante recalcar que este bioensayo se basa en el efecto de los cultivos fúngicos en las bacterias con actividad de carboximetilcelulolítica. Esta actividad tiene un coeficiente de correlación del 0.93 con la digestión de la fibra detergente neutro en el rumen de bovinos (Bowman y Firkins, 1993). Por lo tanto, los resultados obtenidos se pueden correlacionar con la digestión ruminal.

Se concluye que la adición de extractos fúngicos (Ys, Ao y An) estimula el crecimiento del cultivo mixto de bacterias anaerobias con actividad de carboximetilcelulolítica en forma notoria en comparación al control (sin extracto) y los efectos de la adición de extractos de Ys, Ao y An son muy similares entre sí.

6.1 Caracterización y Fraccionamiento de los Probióticos de los Cultivos Fúngicos

En esta parte del trabajo se determinó la estabilidad de los componentes probióticos a diferentes pH y a diferentes temperaturas, se fraccionó por ultrafiltración, se estimó el peso molecular y se analizó por espectro infrarrojo.

6.1.1 Determinación de la Estabilidad de Componentes Activos de los Cultivos Fúngicos a Diferentes pH y Temperaturas

En estos experimentos se determinó el efecto del pH y la temperatura en los principales componentes probióticos. En algunos tratamientos los extractos fúngicos se calentaron a temperaturas de 120°C para confirmar o rechazar la hipótesis que el principal componente de los extractos fúngicos sean las enzimas microbianas.

Como se observa en la Figura 3 la extracción a diferentes pH (4, y 10) de los compuestos probióticos contenidos en Ys y el calentamiento del extracto Ys a diferentes temperaturas (60, 90 y 120°C) no tuvo efecto en los compuestos activos que incrementan la producción de proteína, actividad de carboximetilcelulolítica (CMCica) y acetato en el bioensayo. En el análisis de varianza no se detectó efecto significativo ($P > .05$) entre los extractos fúngicos tratados a diferentes pH, ni entre los extractos calentados a diferentes temperaturas en la producción de proteína, actividad CMCica y producción de acetato en el bioensayo, pero se detectaron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los tratamientos con extracto de Ys y el control sin extracto de Ys (Anexo 1).

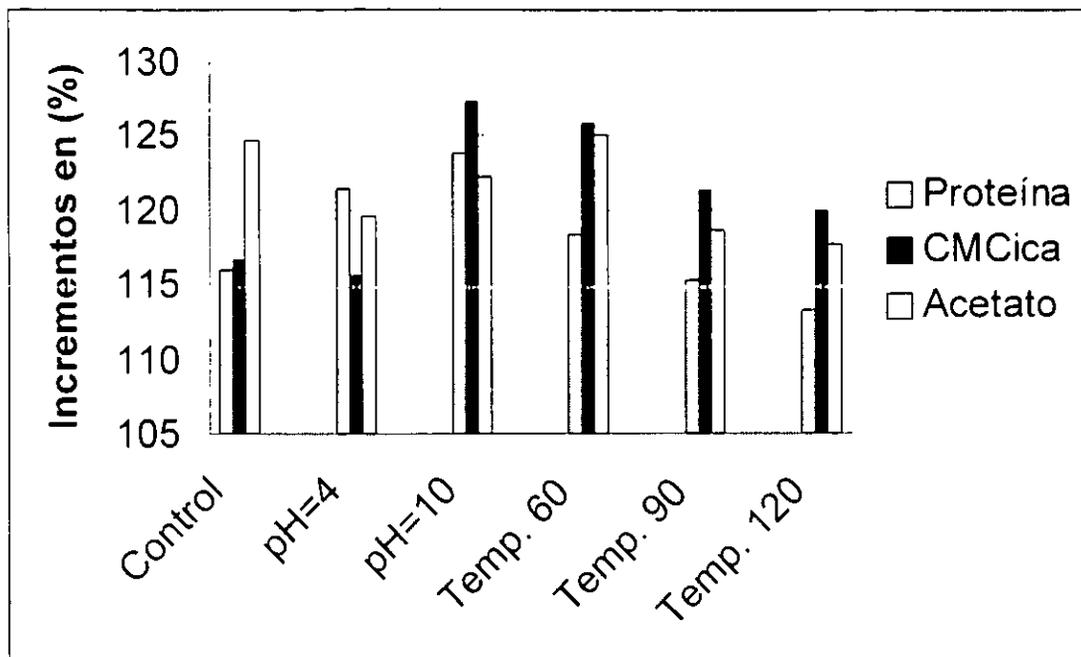


Figura 3. Efecto del pH y la temperatura en los componentes activos de Ys que tienen el efecto de incrementar la producción de proteína, actividad de carboximetilcelulolítica y acetato en el cultivo mixto de bacterias anaerobias celulolíticas con respecto al testigo (sin extracto).

Como se aprecia en la Figura 4 ni el pH, ni la temperatura afectaron la capacidad de los extractos de Ao de incrementar la producción de proteína, actividad de CMCica y acetato en el bioensayo. Sin embargo se observa que en proteína y en actividad carboximetilcelulolítica el aumento de temperatura es inversamente proporcional al incremento de ambos parámetros (Figura 4), El análisis de varianza no mostró efectos significativos ($P > .05$) por el calentamiento a diferentes temperaturas del extracto Ao (Anexo 1), pero se encontraron diferencias significativas ($P < 0.01$) entre los tratamientos con extractos de Ao y el testigo sin extracto (Anexo 1).

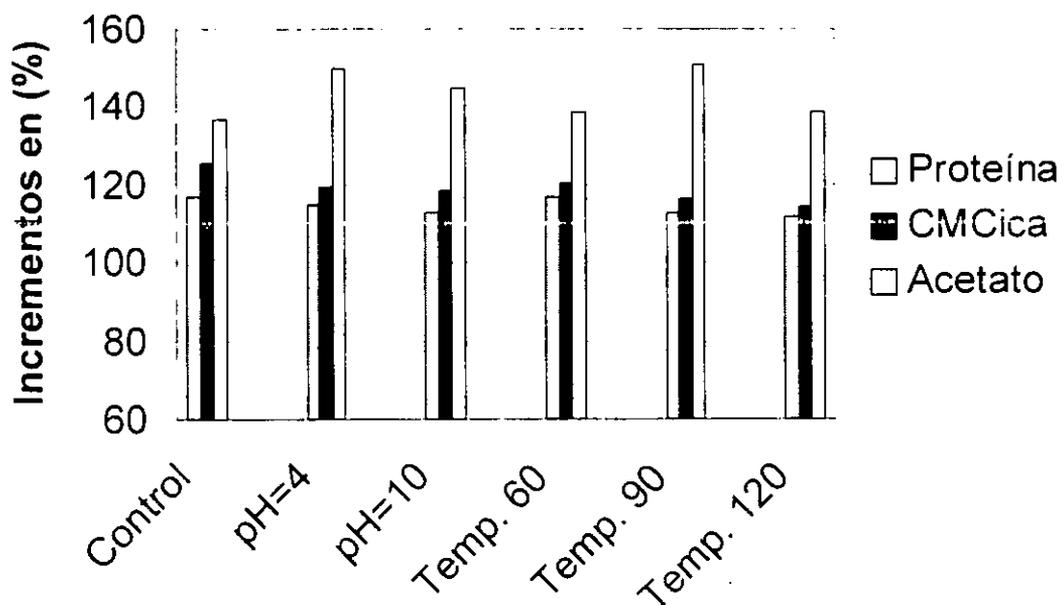


Figura 4. Efecto del pH y la temperatura en los componentes activos de Ao que tienen el efecto de incrementar la producción de proteína, actividad de carboximetilcelulolítica y acetato en el cultivo mixto de bacterias anaerobias celulolíticas con respecto al testigo (sin extracto).

En los experimentos con An (Figura 5) se encontraron resultados similares a los que se obtuvieron con Ys y Ao (Figura 3 y 4 respectivamente). El análisis de varianza indicó diferencias ($P < 0.05$) entre los tratamientos con extracto fúngico y el testigo sin extracto (Anexo 1). No fue el caso para los tratamientos a diferentes pH (4 y 10), ni entre los tratamientos a diferentes temperaturas, donde no existió efecto ($P > 0.05$) por dichos tratamientos en la capacidad de incrementar la producción de proteína, actividad de CMCica y acetato en el bioensayo.

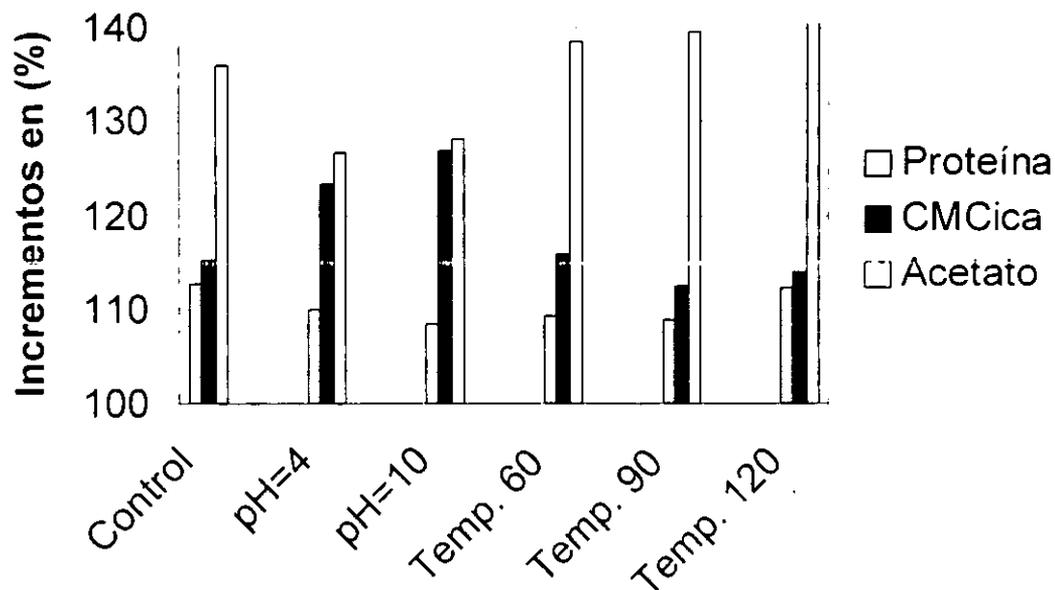


Figura 5. Efecto del pH y la temperatura en los componentes activos de An que tienen el efecto de incrementar la producción de proteína, actividad de carboximetilcelulolítica y acetato en el cultivo mixto de bacterias anaerobias celulolíticas con respecto al testigo (sin extracto).

El pH (4 y 10) no tuvo efecto en los compuestos probióticos en términos de su capacidad de estimular el crecimiento de las bacterias anaerobias con actividad de CMCica en el bioensayo (Figuras 3, 4 y 5). Estos resultados sugieren que podrían ser compuestos anfóteros como los aminoácidos o compuestos polares de bajo peso molecular (Shriner y col., 1985). Con estos resultados se puede rechazar la idea de que sean vitaminas como ácido fólico y rivo flavina, ya que la primera es inestable a pH ácidos y la segunda es más soluble a pH básicos (Maynard y col., 1987).

El efecto de la temperatura en los componentes probióticos de este trabajo (Figuras 3, 4 y 5) difieren a los reportados por Dawson y col., (1990), Newbold y col., (1991) y García y col., (1994), quienes observaron que los materiales fúngicos de Ys, Ao y An respectivamente, perdían su efecto

cuando eran calentados a 120°C. En contraparte, los resultados de Harper y col., (1996) fueron similares a los de este trabajo y donde también se usaron extractos de Ao calentados a 120°C para el hongo ruminal *Neocallimastix frontalis* EB188. Las diferencias pueden deberse a los primeros autores calentaron productos secos, mientras que Harper y col., (1996) y en este trabajo se calentaron extractos. Yoo B. y Lee C., (1993); Calderon y col., (1994); Rajeshwara and Prakash, (1996) reportaron que compuestos en solución como sorbitol, carbohidratos y cosolventes (respectivamente) interactúan con diferentes compuestos incrementado su termoestabilidad.

Por otra parte, los resultados en este experimento, confirman la hipótesis formulada por Campos y col., (1991), donde sugieren que el principal componente de los cultivos fúngicos con efectos probióticos no eran las enzimas. Esto debido a que ellos no encontraron correlación entre las enzimas hidrolíticas (celulasas, amilasas, proteasas y lipasas) y el incremento de la digestibilidad de materiales fibrosos, amiláceos, proteínicos y grasos.

Estos resultados sugieren que los componentes activos son metabolitos estables a temperaturas de 120°C y a pH de 4 y 10, como podrían ser algunas vitaminas del tipo "B" (tiamina, niacina, piridoxina, piridoxal, biotina y p-aminobenzoico), aminoácidos y ácidos carboxílicos o factores de crecimiento de tipo peptídico como lo sugieren Callaway y Martin, (1997) y Harper y col., (1996) respectivamente. Para confirmar esta idea se procedió a purificar por fraccionamiento a las muestras empleadas.

6.1.3 Fraccionamiento por ultrafiltración de los Cultivos Fúngicos

Una forma relativamente sencilla para fraccionar compuestos hidrosolubles con actividad biológica es usar membranas de ultrafiltración con diversos grados de porosidad conocida y así poder determinar el intervalo de peso molecular en que se encuentra el compuesto con la actividad deseada.

En la Tabla 6 se muestran los resultados del extracto Ys y sus ultrafiltrados pasados por cortes de pesos moleculares de 300 y 30 kDa. El análisis de varianza mostró diferencias significativas ($P < .05$) entre los tratamientos en la producción de proteína, actividad carboximetilcelulolítica (CMCica) y acetato (Anexo 1). Los tratamientos con extracto o ultrafiltrado fúngico tuvieron un aumento en promedio del 13.6% en la estimulación de la producción de proteína con respecto al control (Tabla 6). En la actividad de carboximetilcelulolítica por el cultivo mixto se encontró que los ultrafiltrados tuvieron mayor efecto que el extracto crudo, mientras que para la estimulación en la producción de acetato, el efecto fue inverso, pues el mayor incremento se presentó con el extracto crudo.

Tabla 6. Efecto de las fracciones de Ys a diferentes intervalos de pesos moleculares en la producción de proteína, actividad de CMCica y acetato en el cultivo mixto.

Tratamiento	Proteína (mg/L)	CMCica (UI/L)	Acetato (μ mol/L)
Control	53.0 \pm 2.5 ^a	300 \pm 15.4 ^a	17.1 \pm 0.6 ^a
Extracto crudo	60.5 \pm 2.7 ^b	342 \pm 19.7 ^b	20.3 \pm 1.0 ^b
Ultrafiltrado de 300 kDa	58.9 \pm 1.4 ^b	355 \pm 21.2 ^b	19.8 \pm 0.9 ^b
Ultrafiltrado de 30 kDa	61.3 \pm 3.8 ^b	356 \pm 29.6 ^b	19.6 \pm 1.3 ^b

CMCica= Actividad de carboximetilcelulolítica.

Control= Tratamiento sin extracto.

^{a, b} Los tratamientos en la misma columna con diferentes superíndice difieren significativamente ($P < .05$) según la prueba de Duncan's.

Los resultados de la ultrafiltración de Ao se muestran en la Tabla 7. Se observa que el ultrafiltrado pasado a través de la malla de 30 kDa resulto tener la mayor producción de proteína, actividad de CMCica y acetato. El análisis de varianza indicó diferencias significativas entre los tratamientos con Ao y el control (Anexo I).

Tabla 7. Efecto de las fracciones de Ao a diferentes intervalos de pesos moleculares en la producción de proteína, actividad CMCica y acetato en el cultivo mixto.

Tratamiento	Proteína (mg/L)	CMCica (UI/L)	Acetato (μmol/L)
Control	40.6±1.5	289±11.1 ^a	11.7±0.8
Extracto crudo	48.5±1.7 ^b	331±15.5 ^b	15.3±1.1 ^b
Ultrafiltrado de 300 kDa	47.5±0.8 ^{bc}	342±10.6 ^b	16.8±0.6 ^c
Ultrafiltrado de 30 kDa	50.7±1.7 ^c	356±9.6 ^b	18.3±0.5 ^d

CMCica= Actividad de carboximetilcelulolítica.

Control= Tratamiento sin extracto.

^{a, b, c y d} Los tratamientos en la misma columna con diferentes superíndice difieren significativamente (P<.05) según la prueba de Duncan's.

Los resultados sobre An son similares a los extractos fúngicos anteriores (Ys y Ao) como se muestra en la Tabla 8. Existen diferencias significativas (P<.05) entre los tratamientos con respecto al testigo sin extracto en los niveles de proteína, actividad de carboximetilcelulolítica y acetato (Anexo 1). Es decir, los principios activos que contiene el extracto de An también pasaron a través del corte de 30 kDa.

Tabla 8. Efecto de las fracciones de An a diferentes intervalos de pesos moleculares en la producción de proteína, actividad CMCica y acetato en el cultivo mixto.

Tratamiento	Proteína (mg/L)	CMCica (UI/L)	Acetato (μmol/L)
Control	54.7±1.0 ^a	276±8.7 ^a	11.9±1.2 ^a
Extracto crudo	60.3±1.6 ^b	310±7.0 ^b	16.6±1.1 ^b
Ultrafiltrado de 300 kDa	59.9±2.1 ^b	315±7.9 ^{bc}	17.2±1.4 ^b
Ultrafiltrado de 30 kDa	60.6±2.0 ^b	326±8.2 ^c	18.2±0.5 ^b

CMCica= Actividad de carboximetilcelulolítica.

Control= Tratamiento sin extracto.

^{a, b y c} Los tratamientos en la misma columna con diferentes superíndice difieren significativamente (P<.05) según la prueba de Duncan's.

En este experimento se encontró que los componentes activos de los tres cultivos fúngicos que incrementan significativamente ($P < .05$) las actividades microbianas (producción de proteína, actividad CMCica y acetato) del bioensayo en comparación del testigo (sin la adición de extracto o ultrafiltrado) pasaban a través de ultrafiltros con corte de 30 kDa.

Estos resultados apoyan la hipótesis anterior que los componentes activos obtenidos pueden ser compuestos simples como vitaminas del tipo "B", ácidos carboxílicos y aminoácidos y/o oligómeros de bajo peso molecular. Además con estos experimentos se descarta en forma contundente que el efecto probiótico de los extractos fúngicos sea debido a enzimas de tipo fúngico, debido que el peso molecular de estas enzimas es mayor de 30 kDa (Haigler y Weimer, 1991).

Este análisis fue ampliado por medio de un estudio de cromatografía de exclusión molecular para estimar el peso molecular de los componentes activos contenidos en los extractos fúngicos. Como los componentes activos tuvieron pesos moleculares menores a 30 kDa se utilizó un gel de Sephadex G-50 para estimar pesos moleculares entre 1.5 y 30 kDa.

6.1.4 Cromatografía de exclusión molecular

En la Figura 6 se observan resultados de la cromatografía de exclusión molecular (sephadex G-50), en la cual los extractos de Ys y An presentaron un solo máximo. Ys1 representa el único máximo de Ys y su elución fue a los 141.4 ± 3.6 mL. An1 representa el único máximo de An y su elución fue a los 126.4 ± 1.9 mL. Ao presentó dos máximos, el primero Ao1 con una

elución a los 93.3 ± 5.0 mL y el segundo máximo Ao2 con una elución a los 142.3 ± 4.6 mL.

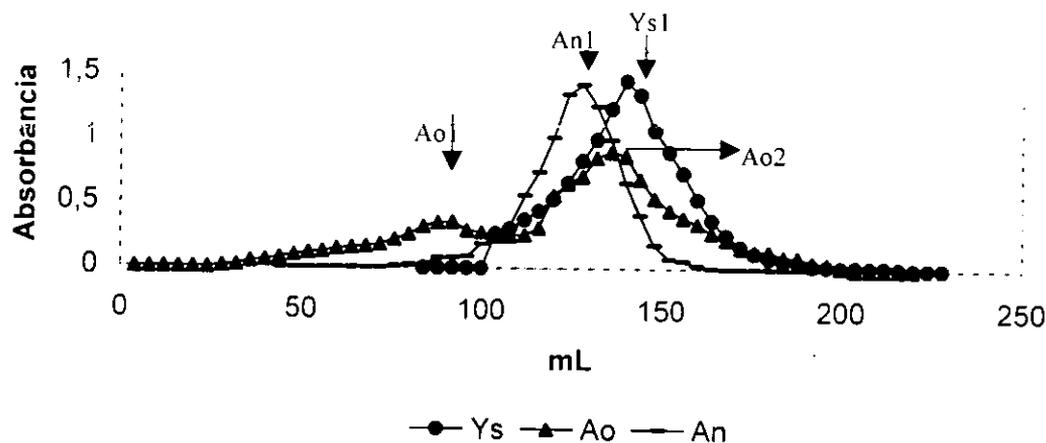


Figura 6. Cromatografía de exclusión molecular de extractos de *Aspergillus oryzae* (Ao), *Saccharomyces cerevisiae* (Ys) y *Aspergillus niger* (An) en una columna Sephadex G-50..

La curva patrón de la columna de exclusión molecular se muestra en la Figura 7. La ecuación encontrada para estimar los pesos moleculares fue $\text{Log PM} = -0.65 (V/V_0) + 5.3$ con un coeficiente de correlación de -0.94 .

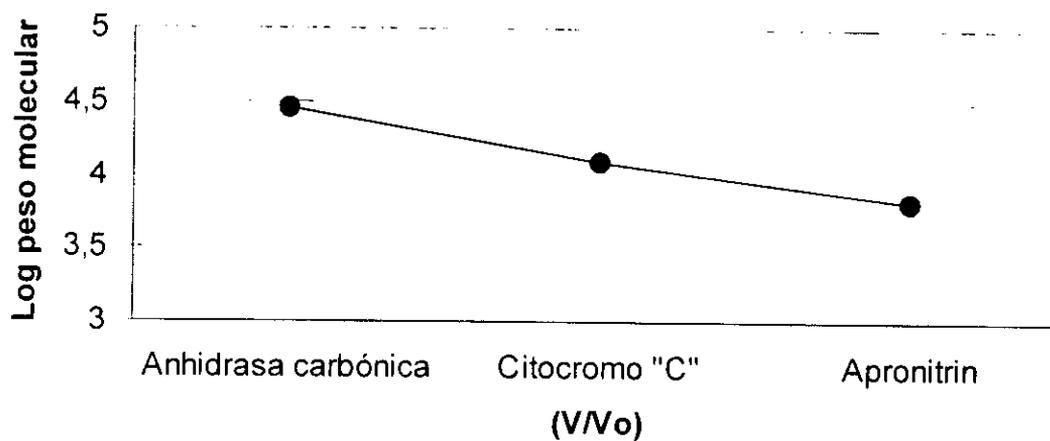


Figura 7. Curva patrón de anhidrasa carbónica (PM 29,000), citocromo "C" (PM 12,400) y apronitrin (PM 6,500). El volumen de elución de los compuestos patrón (V) entre el volumen de elución del azul dextrano (V_0) con PM de 2000,000 que fue de 54.13 ± 4.2 mL. En una columna de Sephadex G-50.

La estimación de los pesos moleculares de los picos obtenidos por las cromatografías de exclusión molecular (Ys1, Ao1, Ao2 y An1) se observan en la Tabla 9. El primer máximo de Ao (Ao1) tuvo un peso molecular de 15.2 kDa y el segundo máximo Ao2 tuvo un peso molecular similar al único máximo de Ys1 que fue cercano a 4 kDa. El único máximo de An (An1) tuvo un peso molecular mayor de Ao2 y Ys1, y fue de 6.1 kDa

Tabla 9. Estimación de los pesos moleculares de los picos obtenidos en las cromatografías de exclusión molecular

Pico	(V/Vo)	Peso molecular (kDa)
Ys1	2.61	4.0 ± 0.45 ^a
Ao1	1.72	15.20 ± 2.39 ^b
Ao2	2.63	3.9 ± 0.72 ^a
An1	2.33	6.1 ± 0.55 ^c

(V/Vo)= volumen de elución del pico entre el volumen de elución de azul de dextrano.

^{a, b, c} Los tratamientos en la misma columna con diferente superíndice difieren (p<.05).

Bioensayo

En la figura 8 se observan los efectos resultantes al incrementar la producción de proteína y la actividad de carboximetilcelulolítica (CMCica) de los ultrafiltrados (PM< 30kDa) y las fracciones que representaban los picos obtenidos en las cromatografías de exclusión molecular. Se observa que el único pico que se obtuvo en Ys1 (PM de 4 kDa) y An1 (PM de 6.1 kDa.) (Figura 6) y los ultrafiltrados de los tres cultivos fúngicos (Ys, Ao y An) tuvieron la capacidad de estimular la producción de proteína y la actividad de CMCica en el cultivo mixto. El pico representado como Ao2 con un peso molecular de 4 kDa también tuvo capacidad de estimular las funciones microbianas del cultivo mixto, mientras el pico representado con Ao1 con peso molecular de 15.2 kDa no se observó efecto de incrementar la producción de proteína y la actividad de CMCica en el bioensayo.

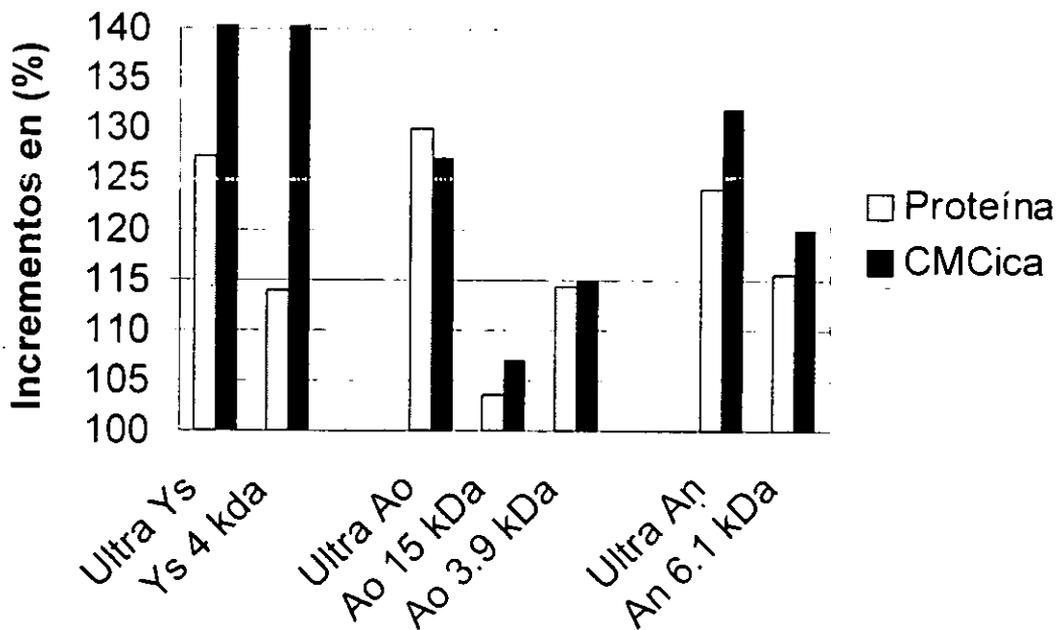


Figura 8. Efecto de los ultrafiltrados (< 30 kDa) y los picos obtenidos por cromatografías de exclusión molecular de Ys, Ao y An en el incremento en la producción de proteína y de la actividad de carboximetilcelulolítica en el cultivo mixto de bacterias anaerobias.

Es importante recalcar que las fracciones que representaban pesos moleculares cercanos a 5 kDa (Ys1, Ao2 y An1) tuvieron un efecto significativo ($P < 0.05$) en el cultivo de bacterias anaerobias con capacidad de CMCica (Anexo 1). Además estas fracciones representan más del 50 % de efecto estimulador del ultrafiltrado con peso molecular menor a 30 kDa.

Con estos resultados se descartan que los principales compuestos activos sean vitaminas de tipo "B", ácidos orgánicos y aminoácidos, ya que el peso molecular de estos compuestos es menor 1 kDa (Shriner y col., 1985) y las moléculas con efecto positivo en el bioensayo encontrados en este trabajo tuvieron pesos moleculares cercanos a 5 kDa.

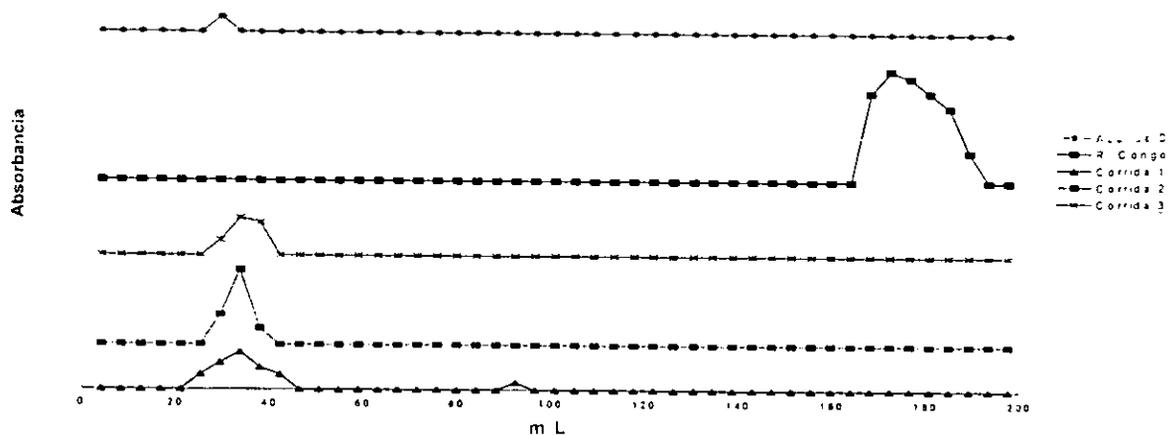


Figura 9 Cromatografías de exclusión molecular en sephadex G 25-80 con intervalo de exclusión de 1 a 5 kDA. con Ys.

Los resultados de la Figura 9 comprueban los resultados obtenidos en el Sephadex G-50 (Figura 6) en los cuales se observa un solo pico bien definido con el extracto de Ys (33.6 mL). Aunque en la corrida 1, existió una perturbación a los 92.4 mL, no detectada en las corridas 2 y 3.

Los análisis bioquímicos mostraron que solamente en las fracciones 29.4, 33.6 y 37.8 mL, que corresponden al área del pico se le detectó proteína (Anexo 1). El mayor contenido de proteína correspondió a la fracción de 33.6 mL y fue de 2 mg/L. No se detectaron azúcares totales ni actividad proteolítica en todas las fracciones obtenidas en los cromatogramas (Anexo 1). A la perturbación observada a los 92.4 mL en la corrida 1 no se le detectó proteína, ni azúcares. Por lo que se le puede atribuir a un problema de ruido en la línea basal del cromatograma.

Los resultados obtenidos en las cromatografías sugieren que los metabolitos contenidos en los extractos fúngicos (Ys, Ao, An) que estimulan en crecimiento de las bacterias anaerobias con capacidad de CMCica son compuestos con pesos moleculares cercanos a 5 kDa y de naturaleza péptidica, ya que la fracción activa de Ys tuvo reacción positiva a proteína, pero para confirmar esta hipótesis se procedió a determinar los grupos funcionales de estas fracciones.

6.1.6 Análisis del espectro infrarrojo

Los espectros infrarrojos de las fracciones activas se muestran en el Anexo 2.

Todas las fracciones Ys1, Ao2 y An1 mostraron tener los mismos grupos funcionales (OH, NH, C=O y H-N-H) en la región de 4400 a 1500 cm^{-1} , pero en la región de la huella digital (1500 a 700 cm^{-1}) fueron diferentes. Estos grupos funcionales son característicos en factores de crecimiento de tipo peptídico (McKay y Leigh, 1993).

Se puede concluir que los compuestos activos que contienen los extractos fúngicos que estimulan el crecimiento de bacterias anaerobias con actividad de CMCica, la cual está correlacionada con la digestión ruminal de fibra detergente neutra son factores de crecimiento de tipo peptídico termosestables, hidrosolubles y con pesos moleculares cercanos a 5 kDa.

CONCLUSIONES

La hipótesis central de esta tesis fue que los agentes probióticos contenidos en los cultivos fúngicos que mejoran la digestión ruminal de forrajes de baja calidad son metabolitos, termoestables e hidrosolubles que actúan estimulando el crecimiento de bacterias anaerobias celulolíticas y de esta forma incrementando la producción animal.

Esta hipótesis ha sido fortalecida por los siguientes hallazgos experimentales:

- 1) Los extractos hidrosolubles de la biomasa de *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus oryzae* y *Aspergillus niger* mostraron un efecto promotor del crecimiento de bacterias anaerobias con actividad de carboximetilcelulolítica, según se demostró gracias al uso del bioensayo con el cultivo mixto.
- 2) Esta acción probiótica no fue eliminada por el calentamiento en húmedo por 120°C durante 15 minutos ni por cambios en el pH (4 y 10).
- 3) Los agentes probióticos pasaron a través membranas de ultrafiltración para moléculas menores a 30 kDa.
- 4) Los estudios de cromatografía de exclusión molecular mostraron 3 fracciones activas con pesos moleculares cercanos a 5 kDa que son pesos moleculares inferiores a las dimensiones más comunes de la mayoría de las moléculas enzimáticas (PM>10 kDa.). Cabe señalar que la fracción soluble de 15 kDa detectada por UV en Sephadex G-50 fue inactiva ante el bioensayo.

- 5) La única fracción detectable con UV en la cromatografía con Sephadex G 25-80 presentó una reacción positiva al método de Bradford y negativa a antrona. Tampoco tuvo actividad proteolítica detectable en el método de Azocol.
- 6) El espectro infrarrojo de los principios activos contenidos en los extractos fúngicos (Ys, Ao y An) con pesos moleculares cercanos a 5 kDa mostró que tuvieron grupos funcionales (OH, NH, C=O y H-N-H) característicos de las moléculas de tipo peptídico.
- 7) Los compuestos de tipo peptídico que estimulan el crecimiento de bacterias anaerobias con actividad de CMCica son producidos por los cultivos fúngicos sin importar el tipo de proceso (líquido o sólido) y la clase de hongo (deuteromycetes y ascomycetes).

Desde el punto de vista básico este estudio ha logrado establecer que en la mezcla de microorganismos, metabolitos, enzimas, vitaminas, amortiguadores y minerales estipuladas en las patentes como los componentes de estos productos, solamente los metabolitos de tipo peptídico con pesos moleculares cercanos a 5 kDa tuvieron la capacidad de estimular el crecimiento de bacterias anaerobias con actividad de carboximetilcelulolíticas (CMCica). Es importante recalcar que el incremento de esta actividad (CMCica) se puede correlacionar con un aumento de la digestión ruminal de la fibra detergente neutro. Es decir, los componentes probióticos contenidos en los extractos fúngicos son compuestos de tipo polipeptídico.

Además, esta tesis demostró a nivel práctico que con una lixiviación acuosa de la biomasa seguida de una filtración y una evaporación es un procedimiento adecuado para producir en forma efectiva aditivos fúngicos que promuevan el crecimiento de bacterias celulolíticas.

REFERENCIAS

1. **Arambel M. J., R. D. Wiedmeier and J. L. Walters. 1987.** Influence of donor animal adaptation to added yeast culture and/or *Aspergillus oryzae* fermentation extraction *in vitro* rumen fermentation. Nutr. Rep. Interna. 35:433.
2. **Ayala J. O., S. S. González, R.S. Herrera, R. Barcena and G.D. Mendoza. 1992.** Effect of a probiotic and molasses-urea supplementation fiber digestibility of sesame straw. J. Anim. Sci. 70 (Suppl. 1): 307 (Abstr).
3. **Beauchemin K.A., L. M. Rode and V. J. H. Sewalt. 1995.** Fibrolytic enzymes increase fiber digestibility and growth rate of steers fed dry forages. Can. J. Anim. Sci. 75:641.
4. **Bok-Jin-Duck, Yernool-Dinesh A., Eveleigh-Douglas E. 1998.** Purification, characterization and molecular analysis of thermostable cellulases CelA and CelB from *Thermotoga neapolitana*. Appl. Environ. Microbiol. 64:4774.
5. **Bowman J. G. P. And Firkins J. L. 1993.** Effects of forage and particle size on bacterial cellulolytic activity and colonization *in situ*. J. Anim. Sci. 71:1623.
6. **Bradford M. M. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72:248.
7. **Calderon B. A. M., Jara M. M. E. and Vazquez M. L. 1994.** Haptenic carbohydrates affect the thermal denaturation as soybean lectin. J. of Food Biochem. 17:295.
8. **Callaway E.S. and Martin S.S. 1997.** Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on ruminal bacteria that utilize lactate and digest cellulose. J. Dairy Sci. 80:2035.
9. **Caldwell D. R. And M. P. Bryant. 1966.** Medium without fluid for non selective enumeration and isolation of rumen bacteria. Appl. Microbiol. 14:794.

10. **Campos Montiel R. G.** 1991. Tesis de Maestría en Biotecnología en el Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM
11. **Campos-Montiel R. R. S. Herrera, M. Castañeda and G.G. Viniegra.** 1990. The effects of *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* Amaferm as probiotics on *in situ* digestibility of a high fiber diet. J. Dairy Sci. 73 (Suppl. 1):133 (Abstr).
12. **Campos Montiel R. G., Herrera y Saldaña R. y Viniegra González G.** 1997. Influencia de la alfalfa sobre efectos de cultivos fúngicos en la digestión ruminal *in vitro*. Libro Productos Naturales III:139-143, UAM México.
13. **Campos Montiel R. G., Medina Moreno S., Jiménez González A., Saucedo Castañeda G. y Viniegra González G.** 1995. Bioensayo para probióticos utilizando un cultivo puro de la bacteria ruminal *Selenomonas ruminantium*. Productos Naturales 2: 251, UAM, México.
14. **Campos Montiel R., M. I. Tapia, R.S. Herrera and G.G. Viniegra.** 1991. Is the fungal probiotic effect in ruminants related to enzyme activity?. J. Dairy Sci. 74 (Suppl.):74180 (Abstr.).
15. **Campos Montiel R.G. y Viniegra González G.** 1994. El uso de cultivos fúngicos como probióticos en la nutrición de rumiantes. Tecno. de Alimen. 29:34.
16. **Chaucheyras F., G. Fonty, G. Bertin and P. Gouet.** 1995. *In vitro* utilization by a ruminal acetogenic bacterium cultivated alone or in association with an Archaea Methanogen is stimulated by a probiotic strain of *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Environ. Microbiol.. 61:3466.
17. **Czerkawski J. W. and G. Breckenridge.** 1977. Design and development of a long-term rumen simulation technique (Rusitec). Br. J. Nutr. 38:371.
18. **Dawson K.A.** 1993. Yeast culture as feed supplements for ruminants: Mode of action and future applications. J. Anim. Sci. 71 (Suppl.):28 (Abstr.).

19. **Dawson K. A., K. E. Newman and J.A. Boling. 1990.** Effects of microbial supplements containing yeast and lactobacilli on roughage-fed ruminal microbial activities. *J. Anim. Sci.* 68:3392.
20. **Dosoretz C. Chen H-C, Grethlein H. 1990.** Effect of environmental condotions on extracellular protease activity in lignolytic cultures of *Phanerochacte dhysosporium* *Appl. and Environ. Microbiol.* 56 (2): 395.
21. **Finkins J. L., W. P. Weiss, M. L. Eastridge and B. L. Hull. 1990.** Effects of feeding fungal culture extract and animal-vegetable fat on degradation of hemicellulose and on ruminal bacterial growth in heifers. *J. Dairy Sci.* 73:1812.
22. **Fondevila M. C. C.J. Newbold, P.M. Hotten and E.R. Orskov. 1990.** A note on the effect of *Aspergillus oryzae* fermentation extract on the rumen fermentation of sheep fed straw. *Anim. Produc.* 51:422.
23. **Frumholz P.P., C.J. Newbold and R. J. Wallace. 1989.** Influence of *Aspergillus oryzae* fermentation extract on the fermentation of a basal ration in rumen simulation technique (Rusitec). *J. Agric. Sci. Cambrige.* 113:169.
24. **Fuller R. 1989.** Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66:365.
25. **García O. M., R. G. M. Campos y G.G. Viniegra. 1994.** La solubilidad y termoestabilidad del o de los principios probióticos de un cultivo crudo de *Aspergillus niger* producido por fermentación sólida. XXV Congreso Nacional de Microbiología. Resumen W49. Cd. Obregon, Son. México.
26. **Girad D., C.R. Jones and K.A. Dawson. 1993.** Lactic acid utilization in rumen simulating cultures receiving a yeast culture supplement. *J. Anim. Sci.* 71 (Suppl):288 (Abstr.).
27. **Gomez-Alarcon R.A., C. Dudas and J. T. Huber. 1990.** Influence of cultures of *Aspergillus oryzae* on rumen and total tract digestibility of dietary components. *J. Dairy Sci.* 73:703.
28. **Gómez H. J. and Coronado B. V. 1983.** Lactic acid production using animal wastes as inoculum. *Biotech. Lett.* 5:629.

29. **Harper E.G., Welch R. P., Contreras L. D., Chang J. S. And Calza R. E. 1996.** The effect of *Aspergillus oryzae* fermentation extract on the anaerobic fungi *Neocallimastix frontalis* EB 188, *Piromyces communis* DC 193 and *Orpinomyces ssp* RW206: generalized effects and component analysis. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 45:817.
30. **Haigler C. H. and Weimer P. J. 1991.** Biosynthesis and biodegradation of cellulose. Ed. Marcel Dekker. Inc.. New York. USA.
31. **Hiltner Peggy and B. A. Dehority. 1983.** Effect of soluble carbohydrates on digestion of cellulose by pure cultures of rumen bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 46:642.-
32. **Huber J. T., 1988.** Fungal additives for lactating cows. Notes from Department of Animal Sci. University of Arizona. Tucson Arizona.
33. **Hungate R.E. 1966.** The rumen and its microbes. Academic Press. New York.
34. **Jouany J.P., Mathieu F., Senaud J., Bohatier J., Bertin G. and Mercier M. 1998.** The effect of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* on the digestion of the cell wall fraction of a mixed diet in defaunated and refaunated sheep rumen. *Reproduc, Nutr. Develop.* 38:401.
35. **Laurent T.C. and J. Killander. 1964.** A theory of gel filtration and its experimental verification. *J. Chromatogr.* 14:317.
36. **Legaz G. M. E. y V. C. Córdoba. 1993.** Apuntes del curso internacional de cromatografía líquida de alta presión. Universidad Nacional Autónoma de México.
37. **Lettinga G., W. De Zeeuw, L. P. Hulshoff, W. Wiegant and A. Rinzema. 1985.** Anaerobic wastewater treatment based on biomass retention with emphasis on the UASB process. *Proc. 4th Int. Symp. China .*
38. **Lewis G.E., C.W. Hunt, W.K. Sanchez, R. Treacher, G.T. Pritchard and P. Feng. 1996.** Effect of direct fed enzymes on the digestive

- characteristics of a forage-based diet fed to beef steers. J. Anim. Sci. 74:3020.
39. **Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951.** Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265.
 40. **Mckay I and Leigh I. 1993.** Growth Factors. Ed, Oxford University Press. EUA.
 41. **Martin S. A. and D.J. Nisbet. 1990.** Effects of *Aspergillus oryzae* fermentation extract on fermentation of amino acids, bermudagrass and starch by mixed ruminal microorganism *in vitro*. J. Anim. Sci. 68:2142.
 42. **Maynard I., Loosli J., Hintz H. and Warner R. 1987.** Nutrición animal. Editorial McGraw-HILL, México.
 43. **Miller, G. L. 1959.** Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31:426.
 44. **Morrison T. R. and Boyd N. R. 1990.** Química orgánica. Ed. Addison Wesley Iberoamericana. EUA.
 45. **Nam-Joo-Heon, Koo-Yoon-Mo y Yun-Hyun-Shik. 1998.** Effects of mixed carbon sources on the production of cellulase by *Trichoderma reesei*. Korean J. of Mycol.. 26:239.
 46. **Newbold C. J., R. Brock and R. J. Wallace. 1991.** Influence of autoclaved or irradiated *Aspergillus oryzae* fermentation extract on fermentation in the rumen simulation technique (Rusitec). J. Agric. Sci. 116:159.
 47. **Newbold C. J. And R. J. Wallace. 1993.** The stimulation of rumen bacteria by *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on the respiratory activity of the yeast. J. Anim. Sci. 71 (Suppl.):280 (Abstr.).
 48. **Nisbet D.J. and S.A. Martin. 1991.** Effect of *Saccharomyces cerevisiae* on lactate utilization by the ruminal bacterium *Selomonas ruminantium*. J. Anim. Sci. 69:4628.

49. **Nisbet D.J. and S.A. Martin. 1993.** Effects of fumarate., L malate and an *Aspergillus oryzae* fermentation extract on D_lactate utilization by the ruminal bacterium *Selenomonas ruminantium*. Curr. Microbiol. 26:133.
50. **Ortiz P.A., Sanchez P. M., Barba C J M. y Campos M. R. G. 1995.** Caracterización de celulasas producidas por *Aspergillus niger* por fermentación sólida sobre pulpa de café. VI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. pag. 142.
51. **Plata F. P., S. S. González, G. Mendoza and R. Barcena. 1993.** Effect of a yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on nutritive value of oat straw based. J. Anim. Sci. 71(Suppl.):288 (Abstr.).
52. **Rajeshwara A. N. and Prakash V. 1996.** Effect of denaturant and cosolvents on the wheat germ lipase. J. of Agric. and Food Chem.. 44:736.
53. **Scott, H. W., and B. A. Dehority. 1965.** Vitamin requirements of several cellulolytic rumen bacteria. J. Bacteriol. 114:729.
54. **Shriner L. R., R.C. Fuson y D. Y. Curtin. 1985.** Identificación sistemática de compuestos orgánicos. Ed. Limusa. México.
55. **Sommart K., M. Wanapat, W. Wongsrikeao and S. Ngarmsak. 1993.** Effects of yeast culture and protein levels on ruminal fermentation intake, digestibility and performance in ruminants fed straw based diets. J. Anim. Sci. 71(Suppl.):281 (Abstr.).
56. **Steel R.G.D. and J.H. Torrie. 1960.** Principles and Procedures of Statistics. McGraw-Hill Book Co., New York, NY.
57. **Tapia M. N., R.S. Herrera, M. R. Gutierrez, S. Roussos and G.G. Viniestra. 1988.** The effect of four fungal compounds as probiotics on *in vitro* dry matter disappearance of different feedstuffs. J. Anim. Sci. 66(Suppl.):1260(Abstr.).
58. **Tilley J. M. A. and R. A. Terry. 1963.** A two-stage technique for the *in vitro* digestion forage crops. J. Brit. Grassl. Soc: 18:104-115.

59. **Trevelyan W. E. and Harrison J. S. 1952.** Fractionation and microdetermination of cell carbohydrates. *J. Biochem.* . 50:298.
60. **Van Horn H. H., B. Harris, M. J. Taylor, K.C. Bacman and C. J. Wilcox. 1984.** By-product feeds for lactating dairy cows effect of cottonseed hulls, sunflower hulls, corrugated paper, peanut hulls, sugarcane bagasse and whole cottonseed with additives of fat, sodium bicarbonate and *Aspergillus oryzae* product on milk production. *J. Dairy Sci.* 67:2922.
61. **Varel H. V. and K. K. Kreikemeier. 1994** Influence of feeding *Aspergillus oryzae* fermentation extract (Amaferm) on *in situ* fiber degradation, ruminal fermentation and microbial protein synthesis in nonlactating cows fed alfalfa or brome grass hay. *J. Anim. Sci.* 72:1814.
62. **Varel H. V. and K. K. Kreikemeier, C. J. Hans-Joachim and R.D. Hatfield. 1993.** *In vitro* stimulation of forage fiber degradation by ruminal microorganisms with *Aspergillus oryzae* fermentation extract. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:3171.
63. **Wallace R.J. 1994.** Ruminal Microbiology, Biotechnology and ruminant nutrition: progress and problems. *J. Anim. Sci.* 72:2992.
64. **Welch R. P. and R. E. Calza. 1993.** Amaferm stimulates the growth of the rumen fungus *Neocalimastix frontalis* EB188. *J. Anim. Sci.* 71(Suppl.):280 (Abstr.).
65. **Wiedmeier R.D., M. J. Arambel and J. L. Walters. 1987.** Effect of yeast culture and *Aspergillus oryzae* fermentation extract on ruminal characteristics and nutrient digestibility. *J. Dairy Sci.* 70:2063.
66. **Yoo, B and Lee C.M. 1993.** Thermoprotective effect of sorbitol on protein during dehydration. *J. of Agric. and Food Chem.*. 41:190.

4.0 OBJETIVO DE LA TESIS

Caracterizar y fraccionar los componentes probióticos de los extractos de *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus oryzae* y *Aspergillus niger* que pueden mejorar la digestión ruminal. Esto en un nuevo bioensayo *in vitro* con un cultivo mixto de bacterias anaerobias con actividad de carboximetilcelulolítica de origen ruminal obtenidas en un biorreactor de digestión anaerobia.

4.1 Metas

4.1.1. Diseñar y montar un bioensayo con un cultivo mixto de bacterias anaerobias con actividad carboximetilcelulolítica de origen ruminal crecidos en un biorreactor anaerobio continuo para detectar efectos que puedan mejorar la digestión ruminal.

4.1.2. Caracterizar los componentes activos contenidos en los cultivos fúngicos determinando: la estabilidad a diferentes temperaturas y a diferentes pH.

4.1.3 Fraccionar los extractos de los cultivos fúngicos por ultrafiltración para determinar el intervalo aproximado de su peso molecular y posteriormente por cromatografías de exclusión molecular estimar el peso molecular de las fracciones con efectos positivos en el bioensayo

4.1.4 Analizar las fracciones obtenidas en las cromatografías de exclusión molecular con efectos positivos en el bioensayo mediante un espectro infrarrojo.

ANEXO 1

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Resultados y análisis estadístico de la Tabla 5				
Proteína				
To	Ys	Ao	An	
61.2	70.4	69.1	66.8	
57.5	71.9	68.7	70.2	
60.7	74.6	72.8	69.7	
2.0	2.1	2.3	1.8	
	GL	SC	CM	F
Tra.		3 273.65	91.21	21.41
Error		8 34.08	4.26	
Celulasas+A28				
To	Ys	Ao	An	
371	445	417	397	
363	438	404	398	
359	437	409	405	
6.1	4.4	6.6	4.4	
	GL	SC	CM	F
Tra.		3 8762.4	2920.0	98.74
Error		8 236.62	29.57	
Actividad específica				
To	Ys	Ao	An	
6.3	6.32	6.03	5.94	
6.1	6.09	5.89	5.66	
5.9	5.85	5.61	5.81	
.19	.24	.21	.14	
	GL	SC	CM	
Tra.		3 .221	.073	F
Error		8 .321	.040	.21
Acetato				
To	Ys	Ao	An	
11.1	17.7	15.3	14.5	
11.3	16.1	13.8	13.3	
9.7	16.9	13.5	12.4	
.87	.8	.96		1
	GL	SC	CM	
Tra.		3 58.62	19.54	F
Error		8 6.07	.859	22.74
pH				
To	Ys	Ao	An	
7.6	7.5	7.5	7.7	
6.75	6.77	7.4	6.9	
7.4	6.79	6.52	7.0	
.44	.41	.53	.44	
	GL	SC	CM	F
Tra.		3 0.6884	.029	0.13
Error		8 17.023	.212	

Resultados y análisis estadístico de los tratamientos de Ys a diferentes pH de la Figura 3.				
Proteína				
To	pH 4	pH 7	pH 10	
50.7	65.1	64.7	66.3	
53.0	60.4	60.9	64.8	
53.5	65.3	64.3	63.6	
1.5	2.8	2.1	1.4	
	GL	SC	CM	F
Tra.		3 303.6	101.2	25.1
Error		8 32.2	4.02	
Celulasas				
To	pH 4	pH 7	pH 10	
177	217	243	282	
204	253	255	266	
193	271	294	265	
14.2	27.5	26.7	9.5	
	GL	SC	CM	F
Tra.		3 11216	3738	8.5
Error		8 3518	439	
Actividad específica				
To	pH 4	pH 7	pH 10	
3.5	3.3	3.8	4.3	
3.8	4.2	4.2	4.1	
3.7	4.2	4.6	4.2	
.2	.5	.4	.1	
	GL	SC	CM	F
Tra.		3 .6025	.20	1.81
Error		8 .92	.11	
Acetato				
To	pH 4	pH 7	pH 10	
14.7	18.6	20.3	18.8	
15.6	16.9	17.5	20.0	
14.1	17.6	19.5	15.5	
0.8	0.9	1.4	2.3	
	GL	SC	CM	F
Tra.		3 30.68	10.22	4.64
Error		8 17.62	2.2	

Resultados y análisis estadístico de los tratamientos de Ao a diferentes temperaturas de la Figura 4.					
Proteína					
To	EC	60C	90C	120C	
37.0	51.2	45.3	44.8	43.7	
43.6	46.4	47.9	49.2	48.1	
40.5	47.3	48.5	46.6	45.6	
3.3	2.6	1.7	2.2	2.2	
	GL	SC	CM	F	
Tra.		4	116.7	29.18	4.87
Error		10	59.8	5.98	
Celulasas					
To	EC	60C	90C	120C	
	189	261	239	219	227
	217	274	247	235	249
	199	233	244	253	214
14.2	21.0	4.04	17.0	17.7	
	GL	SC	CM	F	
Tra.		4	4899	1224	4.86
Error		10	2518	251	
Actividad específica					
To	EC	60C	90C	120C	
5.1	5.1	5.3	4.9	5.2	
5.0	5.9	5.2	4.8	5.2	
4.9	4.9	5.0	5.4	4.7	
0.1	.53	.15	.32	.29	
	GL	SC	CM	F	
Tra.		4	.189	.0473	.473
Error		10	1.0	.1	
Acetato					
To	EC	60C	90C	120C	
10.1	17.9	18.2	19.3	16.8	
13.5	14.7	15.4	16.9	17.4	
13.0	19.3	17.0	19.1	16.6	
1.83	2.4	1.4	1.3	0.42	
	GL	SC	CM	F	
Tra.		4	69.21	17.3	6.73
Error		10	25.7	2.57	

Resultados y análisis estadístico de los tratamientos de An a diferentes pH de la Figura 5.				
Proteína				
To	pH 4	pH 7	pH 10	
53.1	64.5	65.7	59.5	
58.6	62.1	63.2	61.3	
58.0	59.9	61.6	63.4	
3.0	2.3	2.1	1.9	
	GL	SC	CM	F
Tra.		3 82.18	27.39	4.87
Error		8 44.94	5.6	
Celulasas				
To	pH 4	pH 7	pH 10	
196	214	225	244	
179	247	230	237	
168	208	201	208	
14.1	21	15.5	19.1	
	GL	SC	CM	F
Tra.		3 4301	1433	4.6
Error		8 2489	311.2	
Actividad específica				
To	pH 4	pH 7	pH 10	
3.7	3.3	3.4	4.1	
3.1	4.0	3.6	3.9	
3.0	3.5	3.3	3.3	
.4	.36	0.15	0.4	
	GL	SC	CM	F
Tra.		3 .4166	.1388	1.18
Error		8 0,9399	.1174	
Acetato				
To	pH 4	pH 7	pH 10	
12.0	16.4	16.2	16.1	
13.3	14.9	19.5	17.7	
11.9	15.8	15.9	13.9	
0.8	0.75	2.0	1.9	
	GL	SC	CM	F
Tra.		3 37.6	12.5	5.69
Error		8 17.6	2.02	

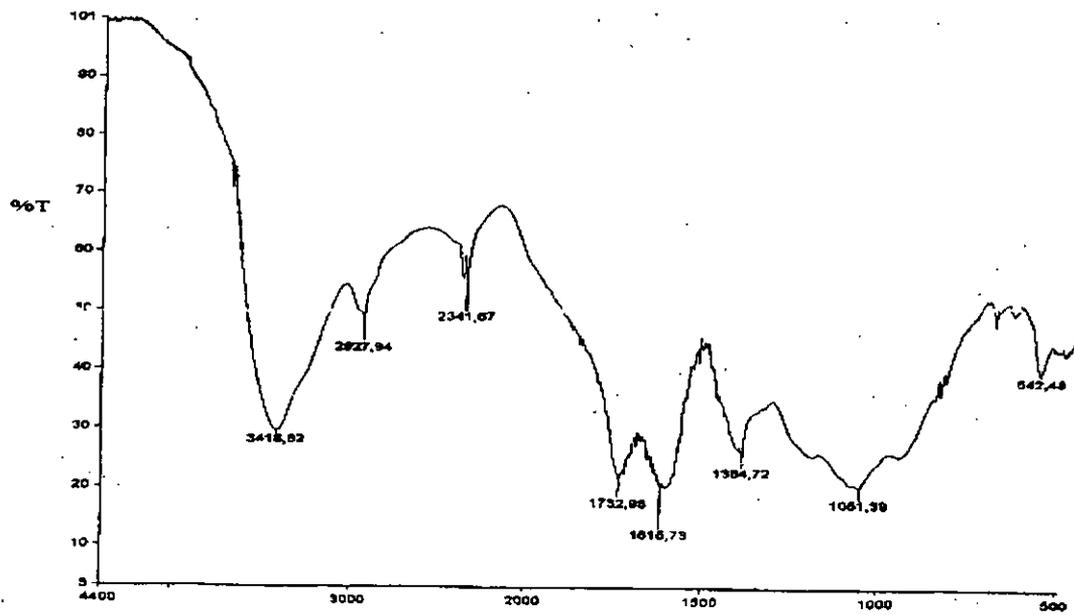
Resultados y análisis estadístico de los tratamientos de An a diferentes temperaturas de la Figura 5.				
Proteína				
To	EC	60C	90C	120C
50.7	60.2	55.0	56.5	61.3
50.4	59.1	60.2	57.4	58.6
55.4	56.8	55.7	56.3	55.5
2.8	1.7	2.8	0.58	2.9
	GL	SC	CM	F
Tra.		4	83.10	20.77
Error		10	55.21	5.52
Celulasas				
To	EC	60C	90C	120C
	247	283	302	288
	261	266	289	272
	250	283	287	294
7.4	9.8	8.14	11.4	5.2
	GL	SC	CM	F
Tra.		4	2988	747
Error		10	746	74.7
Actividad específica				
To	EC	60C	90C	120C
4.9	4.7	5.5	5.09	4.8
5.2	4.5	4.8	4.7	4.9
4.5	5.0	5.2	5.2	5.1
.35	.25	.35	.26	.15
	GL	SC	CM	F
Tra.		4	.3093	.0777
Error		10	.806	.0806
Acetato				
To	EC	60C	90C	120C
10.9	14.2	18.3	15.1	15.6
11.7	16.6	17.7	16.5	16.4
11.6	14.7	14.3	16.1	16.2
0.4	1.3	2.2	0.72	0.42
	GL	SC	CM	F
Tra.		4	54.11	13.52
Error		10	14.28	1.42

Resultados y análisis estadístico de la Tabla 6				
Proteína				
To	EC	300	30	
50.1	59.5	57.3	65.1	
54.7	58.4	59.4	57.6	
54.2	63.6	59.9	61.2	
2.5	2.7	1.4	3.8	
	GL	SC	CM	F
Tra.	3	126.6	42.19	5.65
Factor Dunca	8	59.7	7.46	
Factor Duncan's 1.57				
Celulasas				
To	Ec	300	30	
296	320	363	384	
317	357	371	359	
287	350	331	325	
15.4	19.7	21.2	29.6	
	GL	SC	CM	F
Tra.	3	6226	2075	4.26
Error	8	3896	487	
Factor Duncan's 12.74				
Acetato				
To	EC	300	30	
16.5	21.1	19.4	20.7	
17.2	20.6	20.8	19.9	
17.6	19.2	19.2	18.2	
0.6	1.0	0.9	1.3	
	GL	SC	CM	F
Tra.	3	18.42	6.14	6.69
Error	8	7.33	9174	
Factor Duncan's 0.55				

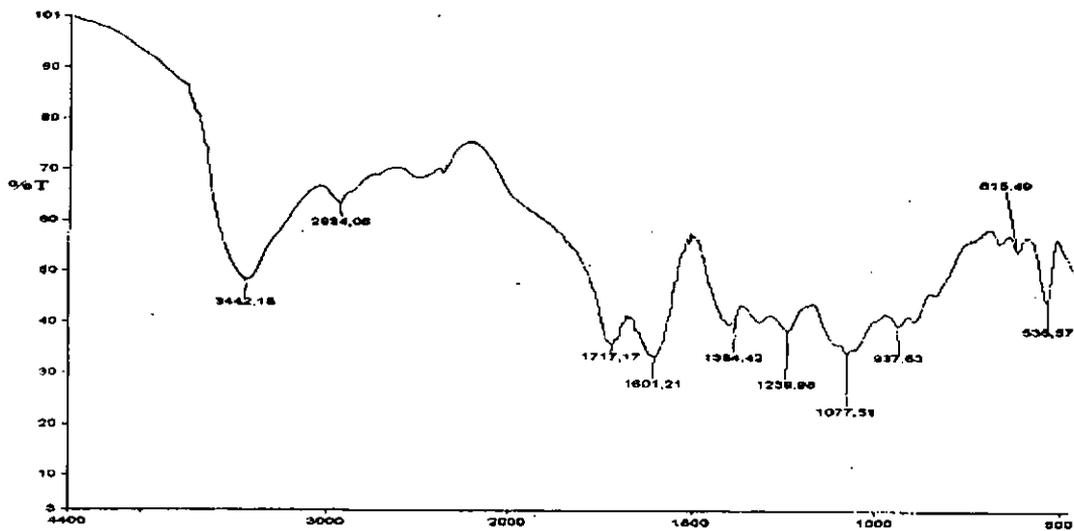
Resultados y análisis estadístico de la Tabla 7.				
Proteína				
To	EC	300	30	
39.8	50.4	48.2	51.5	
42.3	47.9	47.6	48.8	
39.7	47.2	46.7	51.8	
1.5	1.7	0.75	1.7	
	GL	Sc	CM	F
Tra.	3	171.08	57.02	27.54
Error	8	16.59	2.07	
Factor de Duncan's 0.83				
Celulasas				
To	EC	300	30	
287	315	338	360	
301	332	354	345	
279	346	334	363	
11.1	15.5	10.6	9.6	
	GI	SC	CM	F
Tra.	3	7503	2501	17.55
Error	8	1140	142.5	
Factor de Duncan's 11.93				
Acetato				
To	EC	300	30	
11.8	16.1	17.4	18.1	
12.5	15.7	16.3	18.9	
10.9	14.1	16.7	17.9	
0.8	1.0	.6	.5	
	GL	SC	CM	F
Tra.	3	71.26	23.75	40.94
Error	8	4.7	0.58	
Factor de Duncan's 0.43				

Resultados y análisis estadístico de la Tabla 8.				
Proteína				
To	EC	300	30	
53.9	62.1	61.5	58.3	
55.8	59.1	60.7	62.2	
54.4	59.6	57.5	61.3	
1.0	1.6	2.1	2.0	
	GL	SC	CM	F
Tra.	3	7017	23.39	7.66
Error	8	24.2	3.05	
Factor de Duncan's 1.0				
Celulasas				
To	EC	300	30	
281	315	324	333	
266	302	309	317	
281	313	312	328	
8.7	7.0	7.93	8.2	
	GL	SC	CM	F
Tra.	3	4184	1394.7	21.99
Error	8	508	63.4	
Factor de Duncan's 4.59				
Acetato				
To	EC	300	30	
10.6	15.7	17.9	18.0	
12.3	17.8	18.1	17.8	
12.8	16.3	15.6	18.8	
1.2	1.08	1.4	0.6	
	GL	SC	CM	F
Tra.	3	70.34	23.44	20.03
Error	8	9.41	1.17	
Factor de Duncan's 0.62				

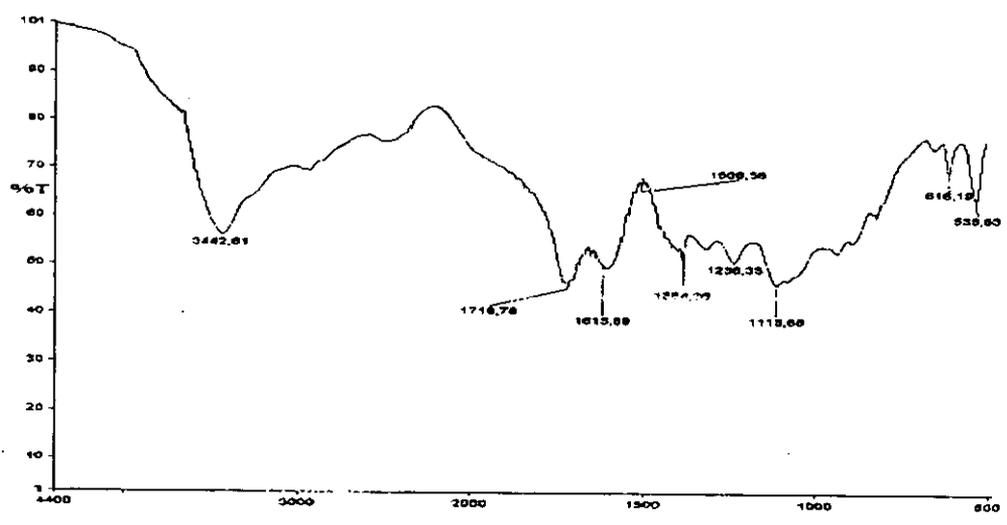
ANEXO 2



Espectro infrarrojo de la fracción con peso molecular de 4 kDa de Ys



Espectro infrarrojo de la fracción con peso molecular de 3.9 kDa de Ao



Espectro infrarrojo de la fracción con peso molecular de 6.1 kDa de An