

## PULPA DE CAFE FERMENTADA :

### SU USO COMO ADITIVO EN LA ALIMENTACION DE RUMIANTES

TAPIA I.M.(<sup>1</sup>), HERRERA-SALDANA R.(<sup>1</sup>), VINIEGRA G.G.(<sup>2</sup>),  
GUTIERREZ M.<sup>2</sup> & ROUSSOS S. (<sup>3</sup>) (\*)

#### RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo determinar el efecto de cinco cultivos de hongos en la digestibilidad de distintos nutrientes en rumiantes.

Por lo anterior, el presente trabajo constó de dos fases: en la primera se determinó la composición química de los compuestos biológicos (cultivos fungales) y de los nutrientes usados para la evaluación y en la segunda se estudió el efecto de los compuestos fungales en la digestibilidad de nutrientes, para lo cual esta segunda fase constó de dos etapas.

En una primera etapa cuatro pruebas de digestibilidad *in vitro* fueron conducidas para determinar el efecto de cinco compuestos fungales: *Penicillium roqueforti* (PR), *Trichoderma harzianum* (TH), *Aspergillus niger* en bagazo de caña (AN<sub>1</sub>), *Aspergillus niger* en yuca (AN<sub>2</sub>) y *Aspergillus oryzae* (AO) Amaferm, sobre la digestibilidad de la materia seca (DMS) de tres fuentes de lípidos: aceite vegetal, cebo de res y manteca; tres fuentes de proteínas: harina de sangre, pasta de algodón y pasta de soya; tres fuentes de fibra: rastrojo de malz, heno de ballico y heno de alfalfa; y tres fuentes de almidón: desechos de panificación, grano de sorgo y grano de malz. Cada compuesto fue adicionado en cuatro niveles: 0, 1, 2 y 3% de la muestra (en base seca) antes del periodo de incubación de 48 horas. Los resultados fueron analizados usando un diseño completamente al azar designado con un arreglo factorial de 3X5X4 con dos repeticiones por tratamiento.

---

(\*) 1. Universidad Autónoma de Chapingo; Colegio de Posgraduados Texcoco, Edo. Mex., 56230 México

2. Depto de Biotecnología; Universidad Autónoma Metropolitana (UAM-I); Apdo Postal 55-535; 09340 Iztapalapa, México DF; México

3. ORSTOM: Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération; 213 Rue Lafayette, 75010 Paris (France)

Los niveles de 2 y 3% dieron resultados positivos ( $P < 0.05$ ). Los ingredientes más beneficiados fueron los siguientes: manteca vegetal más AN<sub>2</sub> al 2% (de 74-80%); cebo de res con 3% de AO (de 74.5 a 79.8%); harina de sangre (68.80, 69.91, 67.47, 68.72, 70.91, 65.45% para PR, TH, AN<sub>1</sub>, AN<sub>2</sub>, AO y Testigo respectivamente). En las fuentes de almidón el incremento fue moderado y la mejor respuesta se observó en el grano de sorgo con TH (de 82-86%). AN<sub>2</sub> y AO tendieron a presentar los mejores resultados en la DMS.

## INTRODUCCION

El uso extensivo de los forrajes como fuentes de energía para los rumiantes está basado en la digestión microbiana de los carbohidratos estructurales como la celulosa y la hemicelulosa. En las dietas basadas en forrajes, cerca del 90% de la digestión ocurre en el rumen y el 10% restante ocurre principalmente en el intestino delgado. Las células microbianas y sus subproductos de ácidos grasos volátiles son utilizados para cubrir la mayor proporción de las necesidades de proteína y energía. Sin embargo la presión constante para incrementar la eficiencia en la producción ha estimulado el uso de mayores cantidades de concentrado, además de la búsqueda de nuevas técnicas que permitan incrementar la eficiencia y el nivel de producción de los animales.

Dentro de las técnicas que actualmente se están utilizando en distintas partes del mundo, está la manipulación ruminal con el objeto de lograr las siguientes metas:

- . promover la degradación de complejos lignocelulósicos,
- . incrementar la actividad celulolítica
- . aumentar la síntesis de proteína microbiana
- . reducir la producción de metano y
- . reducir la actividad proteolítica, entre otras.

La biotecnología, una nueva disciplina en las ciencias biológicas, ha hecho importantes contribuciones en el área de producción animal y en particular en la manipulación ruminal a través de la producción de compuestos probióticos.

. El uso de estos compuestos ha despertado un gran interés debido a los incrementos observados en la digestibilidad ruminal de las dietas y el comportamiento productivo de los animales que los reciben.

A continuación se revisarán los conceptos básicos acerca de estos compuestos y algunas experiencias obtenidas con su uso en animales haciendo énfasis en los probióticos producidos a base de cultivos de hongos microscópicos.

## CONCEPTOS GENERALES

Los probióticos pueden ser agrupados dentro de la categoría de los promotores de crecimiento los cuales han sido divididos a su vez en probióticos (en favor de la vida) y en antibióticos (contra de la vida). La función de estos últimos está bien definida y consiste en eliminar o en mantener a un bajo nivel de población de microorganismos patógenos o indeseables, sin embargo en la mayoría de los casos se desconoce el funcionamiento de los probióticos, esto se debe en parte a la gran diversidad de compuestos existentes y a la gran gama de procesos para producirlos. De cualquier forma resulta necesario tratar de definir que es un probiótico y cual o cuales pueden ser los mecanismos de su funcionamiento.

Podemos decir en forma general, que los probióticos son compuestos formados por una mezcla de microorganismos, enzimas, vitaminas, minerales y nutrientes o factores de crecimiento desconocidos que tienen un efecto benéfico en el desarrollo y producción animal.

Según Huber (1988), para que un compuesto biológico pueda ser considerado como un probiótico debe cumplir además con los siguientes requisitos:

- . ser no patógeno
- . estar libre de toxinas
- . ser requerido en pequeñas cantidades
- . incrementar la eficiencia en la utilización de nutrientes

Originalmente los probióticos consistían en preparaciones viables de lactobacilos, principalmente cepas de *Lactobacillus acidophilus*, actualmente los probióticos incluyen cepas viables y no viables de lactobacilos, estreptococos, hongos, levaduras y otras bacterias (Zinn, 1988).

Con relación a los mecanismos de acción de los probióticos, poco se sabe con certeza. Diversos autores (Lyons, 1986, Arambel y Wiedmeir, 1987; Gomez y al.1987; Huber, 1988) han especulado sobre posibles formas en que los probióticos actúan, dentro de los posibles mecanismos están los siguientes:

- . servir como fuente de nutrientes para el rumiante,
- . producir antibióticos que eliminan o disminuyen patógenos,
- . cambiar las condiciones ambientales (físico-químicas) del rumen,
- . competir por sustrato contra agentes patógenos,
- . estimular el crecimiento de organismos benéficos al proveerlos de factores de crecimiento y
- . reducir la producción de metano.

Se desconoce si más de uno de estos mecanismos están involucrados en el efecto que los probióticos han demostrado en diversos estudios. Otro punto a considerar especialmente con respecto a los probióticos fungales, es que en el rumen existen hongos anaeróbicos que aparentemente se ven particularmente beneficiados con la adición de probióticos. La presencia de estos hongos en rumen fué demostrada recientemente (Orpin, 1981; Bauchop, 1979), la función de estos hongos está relacionada con la degradación de los carbohidratos estructurales de (celulosa y hemicelulosa) de las paredes celulares de las plantas. A continuación se revisarán algunos resultados obtenidos con la adición de probióticos fungales a dietas de rumiantes y posteriormente algunos métodos para evaluar el funcionamiento de dichos compuestos.

#### EFFECTO DE LA ADICION DE PROBIOTICOS FUNGALES SOBRE LA ACTIVIDAD Y DESARROLLO DE LOS MICROORGANISMOS EN RUMIANTES

Durante los últimos años varios cultivos de hongos han sido utilizados como aditivos en la ganadería. Las especies con las que más se ha trabajado son cepas de *A.oryzae* y *Saccharomyces cerevisiae* (Huber, 1988). Críticas a la adición de hongos como aditivos en la alimentación han sugerido que habría un escaso crecimiento fungal en el rumen debido a su naturaleza aeróbica. Sin embargo, Lyons (1988) reportó un incremento substancial en el número de hongos (*A.oryzae*) después de su introducción al rumen en animales fistulados. Así mismo Gomez y al.(1987) observaron un incremento en la producción microbiana (15.5 vs. 20.0 g/100 g de materia orgánica fermentada) resultando en una mayor cantidad de proteína microbiana pasando al duodeno (355 vs.635 g/d).

Por otra parte, Arambel y al. (1987) reportaron que *A.oryzae* y/o *S.cerevisiae* adicionados a la alimentación de vacas lecheras incrementó ( $p>0.5$ ) a nivel ruminal el total de bacterias celulolíticas. Harrison y al (1987) encontraron un aumento en el número de bacterias celulolíticas como resultado de la adición de cultivos de levaduras. Similares resultados fueron encontrados por

de cultivos de levaduras. Similares resultados fueron encontrados por Dawson (1987). Según Huber (1988) las posibles explicaciones del incremento en el número de bacterias celulolíticas al adicionar cultivo de hongos o levaduras son:

- . que poseen algún factor de crecimiento o nutrientes no específicos
- . la inhibición de ciertas bacterias o especies de protozoarios, permitiendo de esta manera que haya mayor cantidad de sustrato disponible para las celulolíticas. Sin embargo, éstas son solo sugerencias y requieren investigación futura.

## MÉTODOS PARA EVALUAR EL EFECTO PROBIÓTICO DE COMPUESTOS FUNGALES

Existen varios métodos para evaluar a un posible compuesto probiótico. Tenemos desde los métodos relativamente simples de laboratorio, hasta las pruebas de producción con animales.

Los métodos de laboratorio nos permiten hacer una selección inicial de varios compuestos mediante pruebas de digestibilidad *in vitro*, para la determinación de la actividad enzimática, viabilidad en medios aeróbicos o anaeróbicos, capacidad de esporulación y composición química, entre los más importantes.

El siguiente tipo de métodos consiste en las pruebas de digestibilidad *in situ*. Para esto se requiere de animales fistulados en el rumen y/o duodeno; con este tipo de pruebas es posible determinar el efecto de un compuesto probiótico sobre la digestibilidad de nutrientes y sobre el crecimiento y desarrollo de bacterias y hongos ruminales.

El último tipo de prueba requiere de un número considerable de animales, los cuales deben ser: uniformes en cuanto a peso, sexo, nivel de producción y de consumo. Estas pruebas son, por lo general bastante complicadas y costosas, no obstante este tipo de pruebas son las más convenientes, debido a que los animales son nuestros indicadores más fieles para evaluar el efecto de un probiótico. Así, utilizando varios animales podemos realizar pruebas de digestibilidad, consumo, producción, balance energético y comportamiento reproductivo.

## EVALUACION DE CUATRO CULTIVOS FUNGALES SOBRE LA DIGESTIBILIDAD *In vitro* DE LA MATERIA SECA DE CUATRO FUENTES NUTRIENTES

El presente estudio tuvo como finalidad la de desarrollar un método simple que permitiera determinar el valor como aditivo de cuatro cultivos fungales. Dichos cultivos fueron producidos por el laboratorio de Microbiología del Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa (UAM-I). Debido a que se desconocía el nivel más adecuado para lograr un efecto positivo y cual sería el efecto de dichos compuestos cuando se adicionarán con diferentes alimentos (fibrosos, proteícos, energéticos, etc.) se diseñó esta evaluación de tal manera que pudiesen encontrarse respuestas a esas interrogantes. Así los niveles evaluados fueron: 0,1,2 y 3% de la materia seca incubada.

Las fuentes de substrato evaluadas fueron las siguientes:

- . fibrosas: rastrojo de malz, heno de pasto ballico (pasto Inglés) y heno de alfalfa
- . proteícos: harina de sangre, harina de pasta de algodón y harina de pasta de soya
- . amiláceos: sorgo molido, malz molido y desechos de panificadora
- . lípidicos: cebo de res, manteca vegetal y aceite vegetal

Dichos substratos fueron seleccionados de tal forma, que se tuviera una fuente de baja degradabilidad, una de media y otra de alta (v.g. rastrojo de malz, h. de ballico y h. de alfalfa, respectivamente). Los compuestos evaluados fueron residuos de la fermentación de:

- . *Penicillium* sp. cultivado en pulpa de café (Psp).
- . *T.harzianum* cultivado en una mezcla de bagazo de caña más salvado de trigo (TH).
- . *A.niger* cultivado en yuca integral (AN<sub>1</sub>).
- . *A.niger* cultivado en bagazo de caña (AN<sub>2</sub>).

El efecto de estos compuestos fué comparado contra el efecto de un probiótico conocido como "Amaferm" (Biozyme Inc.), que es el producto de fermentación de *A.oryzae* en dos substratos diferentes. Dicho producto aún no se comercializa en México.

Tanto los sustratos como los compuestos fungales, fueron analizados en el laboratorio para determinar los siguientes parametros:

- . Materia seca (MS)
- . Materia Orgánica (MO)
- . Nitrógeno (PC)
- . Nitrógeno soluble (NS)
- . Paredes celulares (FDN)
- . Energia total (E)

Posteriormente, se realizaron las combinaciones de los compuestos fungales con los sustratos (Tabla 1). Cada fuente de sustrato fué evaluada independientemente de las otras a traves de una prueba de digestibilidad *in vitro* de la MS, utilizando la primera fase de Tilley y Terry (1963). El periodo de incubación fué de 48 hs. los niveles probados fueron de 0, 1, 2 y 3% de la materia seca de la fuente de sustrato. El diseño experimental utilizado fué completamente al azar con un arreglo factorial 3X5X4 (AXBXC), siendo A= efecto de Ingredientes (3), B= efecto del tipo de probiótico (5) y C= efecto del nivel de probiótico (4), con tres repeticiones por tratamiento. Para las comparaciones entre medias se usó la prueba de Tukey (1953) citado por Steel y Torrie (1963).

Tabla 1. Arreglo experimental de sustrato y los compuestos fungales.

Compuesto Niveles (% MS)	Sustrato : Harinas								
	malz			ballico			alfalfa		
	0	1	2, 3	0	1	2, 3	0	1	2, 3
<i>Penicillium sp.</i>	'	"	'	"	'	"	'	"	
<i>Trichoderma harzianum</i>	'	"	'	"	'	"	'	"	
<i>Aspergillus niger (a)</i>	'	"	'	"	'	"	'	"	
<i>Aspergillus niger (b)</i>	'	"	'	"	'	"	'	"	
<i>Aspergillus oryzae</i>	'	"	'	"	'	"	'	"	

## RESULTADOS Y DISCUSION

### FASE I. Composición química

#### a) Cultivos fungales

Los resultados de la composición química de los compuestos fungales procedentes de la UAM-I se reportan en la Tabla II. Puede observarse que los compuestos tienen un alto contenido de materia seca, materia orgánica y especialmente cenizas y proteína cruda, al compararlos con los sustratos en los que fueron fermentados.

Tabla II : Composición química de los compuestos biológicos.

compuesto fungal	M.S. %	M.O. %	FDN %	P.C. %	% del N total		Energía Kcal/Kg	Extracto etéreo %
					N-pro- téico	N-so- luble		
PR	93.54	86.72	65.3	12.37	81.81	8.58	3,848.3	1.64
TH	95.25	90.13	68.89	20.56	17.93	80.25	3,816.7	1.73
AN <sub>1</sub>	96.3	94.54	84.74	5.52	39.53	49.81	3,949.6	0.80
AN <sub>2</sub>	93.94	93.9	22.87	11.75	19.56	78.0	4,268.0	0.24

PR= *Penicillium roqueforti*

TH= *Trichoderma harzianum*

AN<sub>1</sub>= *Aspergillus niger* en bagazo

AN<sub>2</sub>= *Aspergillus niger* en yuca

Los valores de proteína cruda variaron dependiendo del cultivo fungal y tuvieron una amplitud observada de 5.52 a 20.60%. El mayor valor correspondió a *T.harzianum* en bagazo + salvado de trigo y probablemente se debió a la presencia del salvado en este compuesto,

por su alto contenido de PC. De la cantidad de N en los compuestos el 82% fué proteínico para PR, 17.93 en TH, 39.53 en AN<sub>1</sub> y 19.56% en AN<sub>2</sub>. La solubilidad del N contenido en los compuestos también fué variada.

Con respecto al contenido de FDN, energía, almidón y cenizas los resultados (Tabla II) muestran también especificidad para cada compuesto biológico, lo que demuestra que cada cultivo tiene sus propias características en composición química determinado probablemente por el sustrato empleado.

Así por ejemplo, el de mayor contenido en FDN es *A.niger* en bagazo de caña, en energía es *A.niger* en yuca y en cenizas *P.roqueforti* en pulpa de café.

#### b) Fuentes de sustrato

En la Tabla III, se muestran los resultados de la composición química de las fuentes de proteína (harina de sangre, pasta de soya, harinolina), fuentes de fibra (heno de alfalfa, heno de ballico y rastrojo de maíz); fuentes de almidón (grano de maíz, desecho de panificación y grano de sorgo) y fuentes de lípidos (aceite de cartamo, manteca vegetal y cebo). Puede observarse que en gran parte de los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado por el NRC (1988) y Church (1984).

#### FASE II. Digestibilidad *in vitro* de la materia seca

Los resultados de digestibilidad de la materia seca de fuentes de lípidos se ilustran en la Tabla IV. Se observaron cambios positivos ( $P < 0.01$ ) en la digestibilidad de la MS, en la mayoría de los casos, cuando se añadieron los compuestos biológicos al proceso de incubación *in vitro*. Al realizar el análisis de varianza incluyendo todas las fuentes de variación, se encontraron diferencias significativas ( $P < 0.01$ ) en los efectos principales (ingrediente, tipo y nivel de probiótico) y efectos de interacciones, con excepción de los efectos de las interacciones ingrediente X nivel de probiótico probablemente porque el efecto por niveles para cada ingrediente no sigue la misma tendencia, lo que provoca que se enmascaren las diferencias y lógicamente tampoco se observaron diferencias entre los efectos de la triple interacción.

Tabla III : Composición química de la fuente de sustrato

Ingredientes	MS %	PC %	N-pro- téico %	N-solu- ble %	FDN %	ALMIDON %	Energía Kcal/Kg	Extracto etéreo
Harina de sangre	94.42	51.31	77.71	21.07	24.74	-	3,862.75	5.82
Pasta de soya	98.02	47.25	92.63	35.44	13.36	-	4,166.66	1.6
Harinolina	98.64	48.25	90.66	42.48	13.36	-	3,713.62	1.38
Heno de ballico	96.25	20.57	-	-	51.95	-	2,900.12	-
Heno de alfalfa	92.43	20.95	-	-	36.79	-	2,076.59	-
rastrojo de maíz	95.39	4.13	-	-	65.15	-	3,896.0	-
Maíz grano	92.77	7.3	-	-	12.44	77.15	4,225.0	4.91
Desecho de pan- ificación	93.19	8.1	-	-	3.08	78.33	4,349.63	3.97
Sorgo	92.27	8.75	-	-	36.0	68.22	4,104.79	1.94
Heno de alfalfa + 5% de cebo	87.8	19.9	-	-	25.83	-	2,378.0	7.07
Heno de alfalfa + 5% de aceite de cartamo	89.1	18.66	-	-	26.21	-	2,402.2	6.53
Heno de alfalfa + 5% de manteca vegetal	87.93	18.42	-	-	25.86	-	2,411.13	7.46

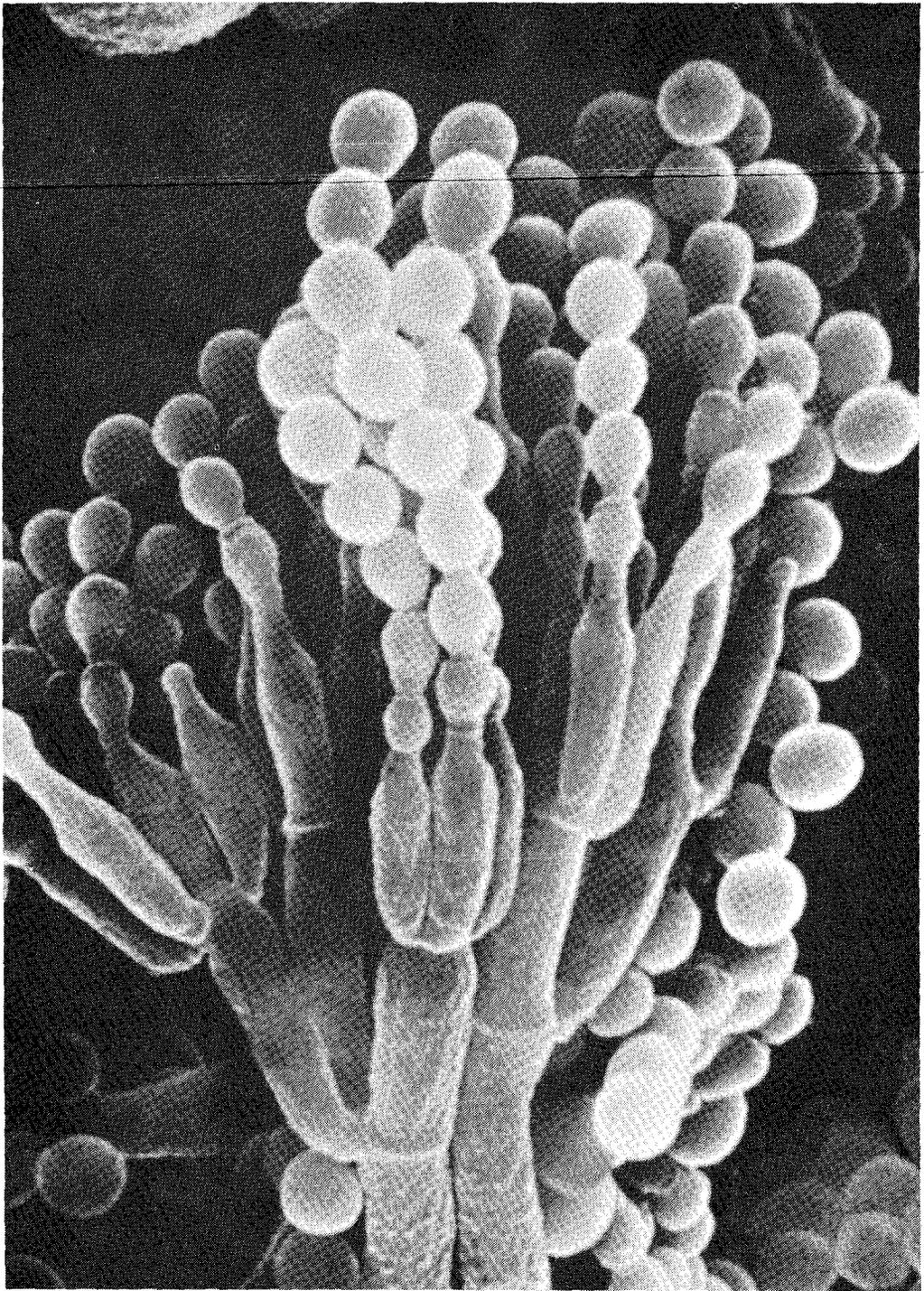


Tabla IV : Digestibilidad *In vitro* de la MS\* de fuentes de lípidos

Problema	Nivel %	I n g r e d i e n t e s					
		Aceite vegetal		cebo de res		Manteca vegetal	
		x	D.E.	x	D.E.	x	D.E.
PR	1	73.71	0.55	74.38	3.11	75.77	0.41
	2	75.58	0.09	75.11	1.76	76.79	0.65
	3	75.17	1.32	76.07	2.77	76.83	0.02
	0	72.97	1.53	74.84	0.06	73.10	0.02
TH	1	73.44	1.11	76.46	1.39	75.50	0.90
	2	74.88	1.36	77.07	0.60	72.41	2.20
	3	73.99	1.26	76.29	0.62	72.79	2.95
	0	72.73	0.05	74.47	0.67	74.53	0.00
AN <sub>1</sub>	1	74.34	0.16	73.76	1.18	76.13	0.00
	2	73.50	0.17	73.70	1.86	76.91	1.26
	3	74.66	1.35	73.84	0.18	76.05	2.41
	0	72.8	0.21	74.32	0.74	74.51	0.02
AN <sub>2</sub>	1	72.22	0.86	75.77	1.48	75.18	0.01
	2	74.30	0.07	76.64	0.07	80.17	0.64
	3	75.39	0.68	77.39	0.04	78.18	0.03
	0	71.13	0.07	74.20	1.04	74.33	1.71
AMAFERM	1	73.21	0.78	77.94	0.19	77.61	0.16
	2	76.97	0.01	78.74	1.23	78.38	1.09
	3	75.62	0.32	79.86	2.01	79.39	0.02
	0	72.80	0.28	74.81	0.61	73.64	0.02
$\bar{x}$ nivel	0	72.48		74.52		74.02	

(\*) Materia seca

PR= *P.roqueforti*

TH= *T.harzianum*

AN<sub>1</sub>= *A.niger* en bagaso de caña

AN<sub>2</sub>= *A.niger* en yuca

Amaferm= *A.oryzae*

Tabla V : Promedio de la digestibilidad *in vitro* de la MS de fuentes de lípidos

Ingrediente	Digestibilidad, % x	D.E.
Aceite de Cártamo	73.97 <sup>b</sup>	1.39
Sebo de res	75.98 <sup>a</sup>	1.75
Manteca vegetal	75.91 <sup>a</sup>	2.16

(a,b) Medias en la misma columna con distinta letra son diferentes (P<0.05)

Tabla VI : Promedios de digestibilidad *in vitro* de la MS por niveles de adición de los probióticos a fuente de lípidos.

Nivel del probiótico	Digestibilidad % x	D.E.
0	73.68 <sup>c</sup>	1.05
1	75.03 <sup>b</sup>	1.64
2	76.08 <sup>a</sup>	2.13
3	76.10 <sup>a</sup>	1.99

(a,b,c) Medias en la misma columna con distinta letra son diferentes (P<0.05)

Las comparaciones de promedios de digestibilidad (Tabla V) demuestran que el aceite de cartamo presentó la menor (P<0.05) digestibilidad *in vitro* de la materia seca, mientras que el sebo de res y manteca vegetal presentaron resultados similares (P>0.05). Además, se puede observar en la Tabla VI que los niveles de 2 y 3% de probióticos son los de mayor (P<0.05) efecto, no existiendo diferencia significativa entre ambos niveles.

En la tabla VII, se puede observar que al comparar las medias de los efectos de cada uno de los probióticos, Amaferm tuvo el mayor efecto ( $P < 0.05$ ) y no existieron diferencias significativas entre PR, TH, AN<sub>1</sub> y AN<sub>2</sub>. El mayor efecto del Amaferm podría deberse a que este probiótico es un extracto de fermentación de *A. oryzae* lo que sugiere una mayor concentración en la población de esporas fungales; en cambio, los probióticos restantes no son extractos sino subproductos de fermentación sólida para la producción de enzimas, en la cuales varió el sustrato en el que fueron fermentados dependiendo del tipo de hongo cultivado.

Tabla VII : Promedios de digestibilidad *in vitro* por cultivos fungales adicionados a fuentes de lípidos.

	Digestibilidad x	D.E.
PR	75.03 <sup>b</sup>	1.29
TH	74.55 <sup>b</sup>	1.55
AN <sub>1</sub>	74.54 <sup>b</sup>	1.22
AN <sub>2</sub>	75.41 <sup>b</sup>	2.49
Amaferm	76.58	2.48

(a,b) Medias en la misma columna con distinta letra son diferentes ( $P < 0.05$ )

Los ingredientes proteínicos también tuvieron un incremento en su digestibilidad cuando se les adicionó los cultivos de hongos al proceso de incubación *in vitro* (Tabla VIII). Con el análisis de varianza, se pudo detectar diferencias ( $P < 0.01$ ) entre efectos de ingredientes, de aditivo y nivel de administración del aditivo, con excepción de los efectos de las interacciones aditivo e interacción ingrediente X aditivo X nivel de administración de aditivo.

Tabla VIII : Digestibilidad *in vitro* de la MS de fuentes de proteínas

Problema	nivel	Ingredientes					
		Harina de x	sangre D.E.	Harina de x	linaza D.E.	Pasta de x	soya D.E.
PR	1	68.78	1.02	72.07	1.00	96.98	0.86
	2	68.85	1.04	71.87	0.86	97.46	1.71
	3	68.80	0.63	72.65	1.11	98.65	0.67
	0	65.06	0.31	71.01	0.51	97.25	0.27
TH	1	67.53	1.38	73.56	1.14	97.91	0.09
	2	68.95	1.37	74.39	0.66	98.68	0.04
	3	69.91	2.62	74.83	0.68	99.19	0.84
	0	65.30	0.12	72.67	0.90	97.51	0.47
AN <sub>1</sub>	1	65.44	2.47	74.23	1.20	98.28	2.05
	2	68.22	1.01	75.28	0.50	99.23	0.90
	3	67.47	0.65	74.35	1.54	99.28	0.68
	0	65.50	0.50	72.82	0.00	97.62	0.39
AN <sub>2</sub>	1	67.83	2.49	74.38	0.67	98.69	0.70
	2	68.43	0.49	74.46	0.62	99.68	0.12
	3	68.72	0.63	74.85	0.52	99.37	0.27
	0	66.07	0.40	72.47	1.14	97.49	0.28
Amaferm	1	65.83	3.30	75.62	1.29	98.09	0.70
	2	68.66	0.87	74.74	1.23	99.54	0.12
	3	70.91	0.09	75.95	0.98	99.60	0.16
	0	65.35	0.09	72.53	0.10	95.71	0.14
x nivel	0	65.45	0.37	72.30	0.73	97.11	0.79

PR= *P.roqueforti*  
 TH= *T.harzianum*  
 AN<sub>1</sub>= *A.niger* en bagazo  
 AN<sub>2</sub>= *A.niger* en yuca  
 Amaferm= *A.oryzae*

Los resultados demuestran además que el ingrediente de mayor digestibilidad es la pasta de soya (97.11%) seguida por la harinolina (72.3%) y la menor digestibilidad resultó ser la harina de sangre (65.45%) ( $P < 0.01$ ); valores que resultan ser similares a lo reportado por el NRC (1988) y por ORSKOV y col., (1983). Al comparar los efectos promedio, entre niveles de administración, se encontró que las diferencias fueron significativas ( $P < 0.05$ ) y que los niveles de mayor acción fueron los de 2 y 3 % (81 y 80.56% respectivamente) no existiendo diferencias entre ambos (Tabla VIII). Se pudo observar además que la digestibilidad de la harina de sangre, fué incrementada por el efecto de los cinco productos evaluados, siendo Amaferm al 3% el que aumentó más la digestibilidad de la MS 5% y 4% sobre TH y AN<sub>1</sub> y 3% sobre AN<sub>2</sub> y PR). Los resultados sobre la digestibilidad de harinolina y pasta de soya fueron moderados. De ésto se puede resumir que la fuente de proteína más beneficiada fué la harina de sangre, ingrediente que es bastante resistente a la degradación ruminal (NRC, 1988).

La comparación entre productos aditivos permitió determinar que el efecto sobre fuentes proteínicas es similar ( $P < 0.05$ ) para todos los cultivos fungales, con excepción de PR que fué el de menor acción en promedio para los tres ingredientes.

Los resultados presentes son semejantes a lo presentado por Wiedmeyer y col. (1987) quienes mostraron un aumento en la digestibilidad de la proteína cruda ( $P < 0.05$ ), por lo que suponen que los cultivos fungales poseen factores estimuladores de las bacterias proteolíticas.

Con respecto al efecto de la adición de los cultivos fungales en fuentes fibrosas (Tabla IX), los resultados muestran un alto beneficio en la digestibilidad *in vitro*. Así se pudo observar que el rastrojo de maíz incrementó su digestibilidad en 11% con Amaferm al 3% seguido de heno de ballico con Amaferm al 3% y heno de alfalfa con AN<sub>2</sub> al 3% (9% y 7% respectivamente). El análisis de varianza mostró que los incrementos resultaron significativos ( $P < 0.01$ ), pero al considerar los efectos principales y de interacciones se encontró que el efecto de la interacción ingrediente por nivel y el efecto de la triple interacción (ingrediente X probiótico X nivel de probiótico) no fueron significativos.

La comparación de los efectos del tipo de probiótico (Tabla X) mostró que AN<sub>2</sub> y Amaferm fueron los aditivos de mayor acción ( $P < 0.05$ ), seguidos por AN<sub>1</sub>, TH Y PR, respectivamente es importante indicar además que los niveles de mayor efecto fueron los de 2% y 3% sin existir diferencia significativa ( $P > 0.05$ ) entre ambos. Los resultados indicaron que los cultivos fungales probablemente estimulan la población

Tabla IX : Digestibilidad *in vitro* de la MS de fuentes de fibra.

Probiótico	nivel %	I n g r e d i e n t e s					
		Rastrojo de		Heno de		Heno de	
		Malz	D.E.	Ballico	D.E.	Alfalfa	D.E.
		x		x		x	D.E.
PR	1	55.65	0.92	73.99	0.41	75.51	0.23
	2	58.80	1.30	73.85	2.57	76.66	0.05
	3	59.78	1.30	73.26	2.00	76.49	2.39
	0	56.20	0.28	72.18	1.66	74.70	0.76
TH	1	61.37	0.26	76.01	0.05	75.27	1.72
	2	59.22	0.59	75.87	0.12	74.94	0.76
	3	59.75	1.16	76.18	0.61	76.63	0.62
	0	57.47	0.46	72.18	0.53	74.67	0.60
AN <sub>1</sub>	1	60.22	0.43	76.37	1.66	76.00	1.02
	2	60.20	1.91	74.98	1.21	77.11	0.95
	3	61.39	0.62	76.50	0.09	78.02	1.08
	0	57.33	0.14	72.18	1.45	74.08	0.95
AN <sub>2</sub>	1	61.82	0.89	74.14	1.57	77.71	0.91
	2	61.29	0.36	78.38	0.65	79.64	1.93
	3	62.45	0.16	77.30	0.31	80.44	0.50
	0	57.26	0.13	72.18	0.11	74.67	2.02
Amaferm	1	63.40	0.50	76.13	1.74	78.64	1.39
	2	64.42	0.64	78.30	0.95	79.22	1.80
	3	64.46	0.58	79.56	0.19	78.39	2.26
	0	56.80	0.01	72.18	0.91	74.67	0.28
x nivel	0	57.01		72.18		74.55	

PR= *P.roqueforti*  
 TH= *T.harzianum*  
 AN<sub>1</sub>= *A.niger* en bagazo  
 AN<sub>2</sub>= *A.niger* en yuca  
 Amaferm= *A.oryzae*

de bacterias celulolíticas en el rumen, lo que trajo como consecuencia un incremento en la utilización de la fibra en la fase ruminal *in vitro*. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Wiedmeyer y col.(1987) quienes indicaron que los cultivos de AO y YC probablemente producen factores que estimulan a las bacterias del rumen y aún cuando los cultivos de *A.oryzae* no producen el complejo enzimático de despolimerización de los carbohidratos estructurales a azúcares simples, producen enzimas que causan una despolimerización parcial y ayudan a las bacterias celulolíticas en la despolimerización completa del material celulósico a azúcares simples.

Tabla X : Digestibilidad de fuentes fibrosas con adición de diferentes probióticos.

Probiótico	Digestibilidad x	D.E.
PR	68.92 <sup>c</sup>	8.51
TH	69.96 <sup>b</sup>	7.88
AN <sub>1</sub>	70.36 <sup>b</sup>	8.00
AN <sub>2</sub>	71.44 <sup>a</sup>	8.34
Amaferm	72.18 <sup>a</sup>	7.84

(a,b,c) Medias en la misma columna con distinta letra son diferentes (P<0.05).

PR= *P.roqueforti*

TH= *T.harzianum*

AN<sub>1</sub>= *A.niger* en bagazo

AN<sub>2</sub>= *A.niger* en yuca

Amaferm= *A.oryzae*

La anterior justificación se refuerza con lo reportado por Roussos (1981) quien mencionó que entre las especies de *Aspergillus* que pueden producir celulasas están *A.oryzae* y *A.niger*, los cuales además son capaces de producir cantidades importantes de B glucosidasa (O'Sousa y Volfora, 1982; Wase y Vald, 1983; citado por Roussos, 1985). Roussos (1981)

también indicó que las celulasas producidas por estas especies generalmente son ricas en endo B glucosidasas y pobres en exo B glucosidasa. Por otra parte *T.harzianum* produce cantidades importantes de celulasas e invaden los substratos con bastante rapidez. Además Bajracharya y Mudjet (1979) encontraron pectinasas en el líquido de muestras fermentadas con *Aspergillus*, en tanto que Alexopoulos (1979) señaló que se han aislado una gran cantidad de antibióticos de los cultivos de *Aspergillus*.

Los resultados obtenidos confirman también lo reportado por Gomez y col. (1987), Van Horn y col. (1984) por ello se supone que, además de la probable estimulación en la población de las bacterias celulolíticas, podría estimularse la población de hongos ruminales cuya función en la digestión de fibra a nivel ruminal ha sido demostrado por varios investigadores (Bauchop, 1979; Orpin, 1975; Akin y col. 1983; Windham y Akin, 1984).

La digestibilidad de las fuentes de almidón (desechos de panificación, grano de sorgo y grano de maíz) se incrementaron moderadamente al usar como aditivo los cultivos fungales (Tabla XI). La mejor respuesta ( $P < 0.05$ ) se observó en el grano de sorgo + *T.harzianum* al 3% (4 unidades porcentuales, 82% del testigo vs. 86%) y *P.roqueforti* fue el aditivo que ejerció mayor efecto en la digestibilidad del grano de maíz (94% vs 97%) y desechos de panificación (95% vs 97%). El análisis de varianza reportó que el incremento de la digestibilidad por efecto del nivel probiótico (0, 1, 2 y 3%) fue estadísticamente significativo, siendo los niveles 2 y 3% los que más influenciaron la digestibilidad de la materia seca.

Para este grupo de ingredientes se observó una situación similar a lo sucedido con las fuentes fibrosas y proteínicas; el ingrediente más beneficiado por el efecto probiótico fue el más resistente a la digestión en el rumen, que en este caso se trató del sorgo cuya resistencia a la digestibilidad ruminal ha sido indicada por Hale (1970), citado por Waldo (1973).

Tabla XI : Digestibilidad *In vitro* de la MS de fuentes de almidón

Probiótico	nivel %	I n g r e d i e n t e s					
		Desecho de pa- nificadora		S o r g o		M a i z	
		x	D.E.	x	D.E.	x	D.E.
PR	1	95.02	0.13	81.43	3.18	96.03	0.91
	2	94.39	0.52	82.41	1.88	97.57	0.11
	3	97.25	0.75	82.91	0.59	97.43	1.63
	0	95.50	1.00	81.11	1.41	94.87	0.45
TH	1	96.64	0.31	84.24	0.55	94.69	0.24
	2	96.67	3.29	86.63	0.00	95.57	0.30
	3	96.23	1.08	86.58	0.65	94.83	1.35
	0	95.03	2.04	82.87	1.33	94.32	0.02
AN <sub>1</sub>	1	94.74	0.86	83.34	1.20	94.95	1.90
	2	94.35	1.30	83.74	2.64	94.37	1.68
	3	96.73	1.82	84.83	0.67	94.60	1.87
	0	95.80	0.07	82.63	0.57	94.67	0.76
AN <sub>2</sub>	1	94.77	3.06	84.24	2.31	93.31	0.07
	2	97.54	0.55	84.25	0.91	94.94	0.01
	3	97.02	0.22	84.79	0.22	94.86	0.01
	0	95.53	0.31	82.54	0.38	93.99	0.40
Amaferm	1	95.30	0.04	83.25	2.22	94.93	0.26
	2	96.52	0.02	84.57	0.26	94.84	0.26
	3	95.09	1.11	84.56	1.40	96.11	0.04
	0	95.90	0.40	81.89	0.04	93.59	1.87
x nivel	0	95.52		82.20		94.24	

PR= *P.roqueforti*  
 TH= *T.harzianum*  
 AN<sub>1</sub>= *A.niger* en bagazo  
 AN<sub>2</sub>= *A.niger* en yuca  
 Amaferm= *A.oryzae*

Tabla XII : Digestibilidad *in vitro* de fuentes de almidón usando como complemento 0, 1, 2 y 3% de aditivo.

Nivel del probiótico	Digestibilidad % x	D.E.
0	90.6723 <sup>C</sup>	6.24
1	91.2610 <sup>bc</sup>	5.80
2	92.2610 <sup>ba</sup>	5.69
3	92.2963 <sup>a</sup>	5.62

(a,b,c) Medias en la misma columna con distinta letra son diferentes (P<0.05).

#### CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos y de acuerdo a las condiciones en que se realizaron estos experimentos es posible concluir lo siguiente:

. Los cultivos fungales evaluados ejercen efecto positivo sobre la digestibilidad *in vitro* de nutrientes (P<0.01) siendo *A. niger* y *A.oryzae* (Amaferm) los que provocan mayores incrementos (P<0.01) especialmente en la digestibilidad de la materia seca de fuentes fibrosas.

. Las fuentes menos degradables o de menor calidad son las más beneficiadas en la digestibilidad de la materia seca al utilizar como aditivos los cultivos fungales.

. El nivel de 3% es el óptimo para obtener un efecto probiótico en la digestibilidad.

#### REFERENCIAS

Alexopoulos C.J., 1979. Introductory Mycology. 3<sup>rd</sup>. Ed. John Willey & Sons. N.Y. 632 p.

Akin D.E., Geoff L.R., Gordon R. & Hogan J.P. 1983. Rumen Bacterial and fungal degradation of *Digitaria pentasili* grown with or without sulphur. Appl. Environ. Microbiol. 46:738-748

Arambel M.J., Wiedmeyer R.D. & Walters J.L. 1987. Influence of donor animal adaptation to added yeast culture and/or *Aspergillus oryzae* fermentation extract on *in vitro* rumen fermentation. Nutrition Reports International. Vol. 35(3)

Bajracharya R. & Mudgett R.E. 1979. Solid-substrate fermentation of alfalfa for enhanced protein recovery. Biotechnol. Bioeng. 21:551-560

Bauchop T. 1979. Rumen anaerobic fungi of cattle and sheep. Appl. Environ. Microbiol. 38:148-157

Bauchop T. 1981. Cellulose fermentation by a rumen anaerobic fungus in both the absence and the presence of rumen methanogenus. Appl. Environ. Microbiol. 42:1103-1110

Church D.C. 1984. Livestock feeds and feeding. 2<sup>nd</sup> ed. O & B. Books, Inc. Corvallis, Or. USA.

Dawson K.A. 1987. Effects of yeast culture supplements on the growth and activities of rumen bacteria in continuous culture. J. Animal Sci. (suppl. 1): 452

Gomez A.R., Dudas D. & Huber J.T. 1987. Effect of *Aspergillus oryzae* Amaferm and yeast on feed utilization by Holstein cows. J. Dairy Sci. 70(1) 218 (Suppl. 1)

Harrison G.A., Hemken R.W., Dawson A., Harmon R.J. & Barker K.B. 1987. Influence of addition of yeast culture supplement to diets of lactating cows on ruminal fermentation and microbial populations. J. Dairy Sci. 71:2967-2975

Huber J.T. 1988. Fungal additives for lactating cows. Depart. Anim. Sci. University of Arizona. Tucson, Az. Annual Report.

Lyons T.P. 1988. Yeast culture limits in the feed industry. Alltech's Fourth Annual Symposium on Biotechnology in the feed industry. Nicholasville, KY.

N.R.C. (National Research Council). 1988. Nutrient requirements of dairy cattle. Sixth revised edition. National Academy Press. Washington, D.C.

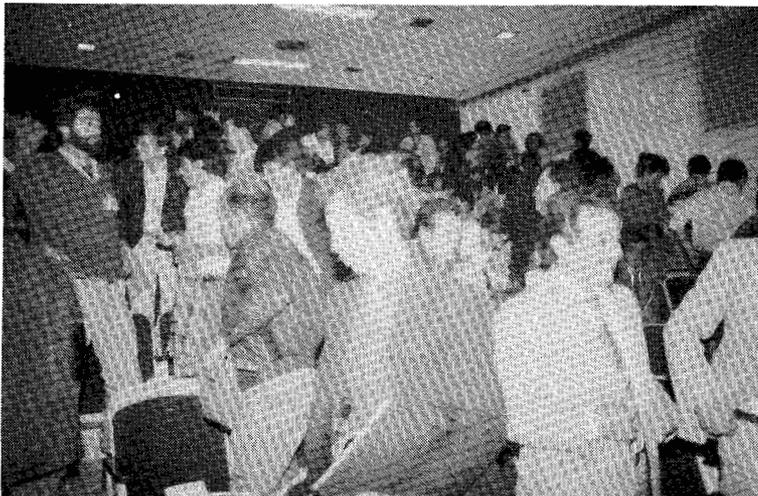
- Orpin C.G. 1975. Studies on the rumen flagellate *Neocallimastix frontalis*. J. Gen. Microbiol. 91:249-262
- Orpin C.G. 1981. Fungi in ruminal degradation. In: Agricultural Science Seminar: Degradation of plant cell-wall material. Agric. Res. Council. London, pp. 37-46
- Orskov E.R., Hughes-Jones M. & Ellman M.F. 1983. Studies on degradation and outflow rate of protein supplements in the rumen of sheep and cattle. Livestock Prod. Sci. 10:17
- Roussos S. 1981. Etude de l'hydrolyse de la cellulose par les moisissures cultivées en milieu solide. Rapport d'élève chercheur ORSTOM. Paris, France. 81 pp
- Roussos S. 1985. Croissance de *Trichoderma harzianum* par fermentation en milieu solide: Physiologie, sporulation et production de cellulases. Thèse d'Etat Université de Provence. 193 p.
- Steel G.D. & Torrie H.J. 1963. Two-staged technique for the *in vitro* digestion of forage crops. J. Brit. Grad. Soc. 18:104
- Tilley M.M.A. & Terry R.A. 1963. Two-staged technique for the *in vitro* digestion of forage crops. J. Brit. Grad. Soc. 18:104
- Van Horn B., Harris J.R., Taylor M.J., Bachman K.C. & Wilcox C.J. 1984. By-product feeds for lactating dairy cows: Effects 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. 67:2922-2938
- Waldo D.R. 1973. Extent and partition of cereal grain starch digestion in ruminants. J. Anim. Sci. 37:1062-1074
- Wiedmeyer R.D., Arambel M.J. & Walters J.L. 1986. Effect of yeast culture and *Aspergillus oryzae* fermentation extract on ruminal characteristics and nutrient digestibility. J. Dairy Sci. 70:2063
- Windham W.R. & Akin D.E. 1984. Rumen fungi and forage fiber degradation. Appl. Environ. Microbiol. 48:473-481
- Zinn R.A. 1988. Probiotics in receiving diets for feedlot cattle. In: Proceeding of the Southwest Nutrition and Management conference. Temple AZ.

# CEREMONIA DE CLAUSURA



Correspondió al comité organizador hacer los comentarios finales de este evento.

Ante una audiencia que en ningún momento decayó se clausuraron los trabajos del 1<sup>er</sup> Seminario Internacional sobre biotecnología





# I Seminario Internacional sobre Biotecnología en la Agroindustria Cafetalera

Compiladores  
S. Roussos  
R. Licona Franco  
M. Gutiérrez Rojas

Xalapa, Ver., México, del 12 al 15 de abril de 1989