



INFLUENCIA DE CULTIVOS FUNGICOS EN ENSAYOS RUMINALES *in vitro* DE DIFERENTES SUSTRATOS

INFLUENCE OF FUNGAL CULTURES ON *in vitro* RUMINAL ASSAYS WITH DIFERENT SUBSTRATES

R.G. Campos-Montiel^{1,2*}, D.J. Pimentel-González¹, A.D. Hernández-Fuentes¹,
R.H. Alfaro-Rodríguez¹ y G. Viniegra-González²

¹ CICyTA, ICAP, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Av. Universidad Km. 1, Rancho Universitario, 43600, Tulancingo, Hgo., México.

² Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco 186. Col Vicentina, 09340, México, D. F., México.

Recibido 6 de Junio 2008; Aceptado 10 de Septiembre 2008

Resumen

El objetivo del estudio fue evaluar la influencia de los cultivos fúngicos sobre la desaparición de materia seca en ensayos ruminales *in vitro*. Se experimentaron con cultivos de *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma harzianum* y *Penicillium sp.*, y nueve sustratos divididos ricos en fibra, almidón y proteína. Se obtuvieron perfiles enzimáticos de celulasas, amilasas y proteasas. Los resultados mostraron que todos los cultivos fúngicos fueron diferentes ($P < 0.05$) con respecto al control (sin adición de cultivo fúngico) en todos los sustratos en el ensayo *in vitro*. No se observaron correlaciones entre las actividades enzimáticas y el incremento de desaparición de materia seca. En los contrastes ortogonales, los *Aspergillus* tuvieron mayor influencia ($P < 0.001$) que otros géneros fúngicos en los sustratos ricos en fibra y proteína. En los sustratos ricos en almidón no se observaron diferencias ($P > 0.05$) entre los cultivos, aunque sólo dos cultivos de *Aspergillus* presentaron amilasas. Los resultados sugieren que no se puede atribuir el incremento de desaparición de materia seca por la adición de los cultivos fúngicos únicamente a las actividades enzimáticas, sino que están involucrados otros mecanismos y que el efecto depende del tipo de sustrato más que del tipo de cultivo fúngico.

Palabras clave: desaparición de materia seca; ensayo ruminal *in vitro*; cultivos fúngicos; actividad enzimática.

Abstract

The aim of this work was to evaluate the influence of fungal cultures on the disappearance of dry matter on *in vitro* ruminal assays. The cultures used were *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma harzianum* and *Penicillium spp.*, and nine substrates divided in rich in fiber, starch and protein. Cellulose, amylase and protease profiles were obtained. Results showed that all of the cultures were different ($P < 0.05$) in comparison with the control (without added fungal culture) in the *in vitro* assays with all the substrates. No correlations were observed between the enzymatic activities and the increase in the disappearance of dry matter. In the orthogonal contrasts, the *Aspergillus* genre had a higher influence ($P < 0.001$) than the other fungal genre in the substrates rich in fiber and protein. In the substrates rich in starch non-significant differences ($P > 0.05$) were observed among the cultures, although only two *Aspergillus* cultures included amylases. The results suggest that the increase in the disappearance of dry matter cannot be attributed to the addition of fungal cultures only the enzymatic activity, but those other mechanisms are involved, and that the effect is more substrate dependent and not of fungal culture type.

Keywords: disappearance of dry matter; *in vitro* ruminal assay; fungal cultures; enzymatic activity.

1. Introducción

Una manera de incrementar la producción de bovinos en carne y leche es por medio de mejorar la eficiencia de la digestión ruminal. Por esta razón diversas investigaciones sobre aditivos se realizan, con objeto de aumentar la actividad en el rumen. Los

cultivos fúngicos han demostrado que estimulan la fermentación ruminal al incrementar la digestibilidad (Di Francia y col., 2008). Los aditivos de origen no bacteriano más empleados en las dietas de los rumiantes consisten en extractos de *Aspergillus oryzae* o *Saccharomyces cerevisiae*. Estos aditivos, obtenidos de cultivos fúngicos, contienen enzimas,

* Autor para la correspondencia. E-mail: rcampos@uaeh.reduaeh.mx
Tel. (771) 71 7 20 00, ext. 4641; Fax: (771) 71 7 20 000

metabolitos y residuos del medio de cultivo (Beauchemin y col., 2002). Estudios realizados por Campos-Montiel y Viniegra-González (1995), encontraron que *Aspergillus niger* induce la actividad enzimática de carboximetilcelulolítica en un cultivo de microorganismos anaerobios en forma similar a *Aspergillus oryzae*. Lee y col. (2000), indicaron que la administración de cultivos de hongos anaerobios de origen ruminal incrementan la digestibilidad de nutrientes y la retención de nitrógeno al aumentar el crecimiento de bacterias y hongos ruminales. Miembros de la especie de *Aspergillus* producen una variedad de enzimas tales como celulasas, xilanasas y L- arabinosa (Roper y Fennell, 1965; Loeza-Corte y col., 2007), las cuales influyen en la degradación de componentes celulares de las plantas. Las enzimas fibrolíticas contenidas en *Aspergillus oryzae* son consideradas como el modo de acción primario para mejorar la degradación de la fibra en el rumen (Varel y col., 1993). La adición de enzimas fibrolíticas de los géneros *Aspergillus* y *Trichoderma* en fermentaciones ruminales *in vitro* incrementan la actividad microbiana encontrando una diferente respuesta según el sustrato (Giraldo y col., 2008). El efecto de las enzimas en la digestión ruminal depende del tipo de dieta (Beauchemin y col., 2003). Preparaciones de celulasas de *Penicillium*, *Aspergillus* y *Trichoderma* incrementaron la actividad microbiana en cultivos *in vitro* (Wallace y col., 2001).

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de extractos crudos de *Penicillium sp*, *Trichoderma harzianum*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus oryzae* en sustratos con alto contenido de fibra, almidón y proteína en la desaparición de materia seca en ensayos ruminales *in vitro* y su relación con sus actividades enzimáticas.

2. Materiales y métodos

2.1 Cultivos fúngicos

Se utilizaron cuatro cultivos fúngicos producidos por fermentación en medio sólido (FMS) y un cultivo fúngico comercial producido por fermentación en medio líquido (FML). La composición de los fermentos sólidos en base seca es: *Penicillium sp* (PS) producido por FMS en pulpa de café con 93% de materia seca (MS) con un contenido en (%): 14.3, cenizas; 61.1, fibra detergente neutro (FDN); 11.6, proteína cruda (PC); 11.5, extracto libre de nitrógeno (ELN); y 1.5, extracto etéreo (EE). *Trichoderma harzianum* (TH) producido por FMS sobre bagazo de caña y de salvado de trigo (80:20), con 95.3% MS y un contenido en (%): 9.9, cenizas; 60.1, FDN; 19.6, PC; 8.8, ELN; y 1.6, EE. *Aspergillus niger* (ANY) producido por FMS en yuca con 93.9% de MS y un contenido en (%): 5.6, cenizas; 21.5, FDN; 11, PC; 61.6, ELN; y 0.3, EE. *Aspergillus niger* (ANB) por FMS sobre bagazo de caña, con 96.3% de MS y un

contenido en (%): 4.3, cenizas; 81.6, FDN; 5.3, PC; 8, ELN; y 0.8, EE. *Aspergillus oryzae* (AO) extracto de FML producido por la empresa Biozyme Enterprises, Inc. St., Joseph, Missouri, USA.

2.2 Sustratos

Los sustratos se clasificaron según su composición en: alto contenido de fibra (rastrajo de maíz con 65.2% FDN; heno de ballico, 51.9% FDN; y heno de alfalfa, 36.8% FDN; alto contenido de almidón (A) (desecho de panificadora, 78.3% A; grano de maíz, 77.2% A y grano de sorgo, 68.2% A); y alto contenido de proteína (harina de sangre, 51.3% PC; pasta de soya, 47.3% PC; y harinolina, 48.3% PC).

2.3 Actividades enzimáticas

Celulasas se determinaron por incubación de 0.1 g de cultivo fúngico con 2 mL de una solución al 1% de carboximetilcelulosa. Amilasas con 0.1 g del cultivo fúngico y 2 mL de una solución al 0.3% de almidón de papa. Las actividades de celulasas y amilasas se cuantificaron por azúcares reductores (Miller, 1959). Proteasas fueron ensayadas con 0.1 g del cultivo fúngico y 2 mL de una solución de caseína. La reacción se midió con reactivo de Folin (Lowry y col., 1951). En los ensayos enzimáticos se empleó amortiguador fosfato de citrato 0.05 M, pH 6.5, y se incubaron a 39 °C (condiciones similares al rumen), por periodos de 15 minutos. En cada caso, se preparó un control (To), con los sustratos y las mismas condiciones del ensayo, pero sin la adición del cultivo fúngico. La reacción enzimática de celulasas y amilasas se detuvo por calor a 95 °C por 5 minutos y proteasas por adición de 2 mL de ácido tricloroacético frío (0.4 M).

2.4 Ensayos ruminales *in vitro*

Para los ensayos *in vitro* de la fermentación ruminal, se utilizó líquido ruminal de una vaca fistulada tipo Holstein con un peso aproximado de 530 kg con una dieta basal de (20:30:50) heno de alfalfa, ensilado de maíz y suplementada con un concentrado comercial (16% de proteína cruda) respectivamente. Las vacas se alimentaron dos veces al día con un libre acceso al agua *ad libitum*. Las muestras del líquido ruminal se obtuvieron tres horas y media después del alimento de la mañana. Los ensayos de digestibilidad se hicieron en tubos de 250 mL usando la primera fase de la técnica de Tilley y Terry (1963). Las muestras con 0.4 g de materia seca y 3% de los diferentes cultivos fúngicos, se incubaron a 39 °C, pH 6.5, por 48 h.

2.5 Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por duplicado (n = 2). Los datos sobre los ensayos ruminales *in*

in vitro se obtuvieron a partir de un diseño factorial 6X3 (cinco cultivos fúngicos y un control X tres sustratos). Los cultivos fúngicos y el control fueron comparados usando contrastes ortogonales por GLM con el programa estadístico SAS (SAS, 1990). El diseño de las actividades enzimáticas fue completamente al azar de una sola vía. Las comparaciones entre las medias se efectuó por la técnica de Tukey con una significancia de ($P < 0.05$). Los coeficientes de correlación se calcularon con las actividades enzimáticas contra el porcentaje de desaparición de materia seca en el ensayo ruminal *in vitro*.

3. Resultados y discusión

En los sustratos ricos en celulosa, la adición de los extractos crudos incrementaron la digestibilidad significativamente con respecto al control (To), en 13, 10 y 5% con rastrojo de maíz, heno de ballico y heno de alfalfa, respectivamente (Tabla 1). Como se esperaba, existieron diferencias significativas ($P < 0.001$) entre los sustratos (dato estadístico no mostrado). Los contrastes ortogonales mostraron que todos los ensayos con cultivos fúngicos tuvieron significativamente ($P < 0.001$) mayor porcentaje de desaparición de materia seca (% DMS) que el control (To). El contraste entre los *Aspergillus* (ANB, ANY y AO) y To, PS, y TH mostró que los *Aspergillus* fueron significativamente ($P < 0.001$) mejores (Tabla 1). Las celulasas provenientes de *Aspergillus* presentaron mejores resultados en ensayos ruminales *in vitro*, lo cual es acorde a lo reportado por Wallace y col. (2001), donde celulasas de *Aspergillus niger* tuvieron una mejor fermentación ruminal que *Trichoderma reesei*, *Trichoderma viride* y *Penicillium funiculosum*. Estudios realizados por Martins y col. (2006), mostraron que enzimas de *Aspergillus niger* y *Trichoderma longibrachiatum* tuvieron efectos positivos en digestibilidad de paredes celulares en dietas para bovinos. Los efectos positivos en la digestibilidad se obtienen igualmente en cultivos de hongos anaerobios (Lee y col., 2000). Con relación a las celulasas, se encontraron diferencias significativas ($P < 0.01$) entre los extractos crudos de los diferentes cultivos fúngicos. PS, TH, ANY y ANB producidos por FMS presentaron mayor actividad celulolítica que AO cultivado en líquido. Estos resultados concuerdan a lo reportado por Ruíz-Leza y col. (2007), donde los fermentos sólidos tienen una mayor concentración de metabolitos en comparación a los reportados en fermentaciones en medios líquidos. Aunque AO tuvo los mayores incrementos en % DMS al igual de ANY en el ensayo ruminal *in vitro* (Tabla 1). Giraldo y col. (2008), encontraron que los cultivos de hongos producen diferentes perfiles enzimáticos y no sólo un tipo de enzima. El coeficiente de correlación muestra que donde existe mayor incremento de % DMS en el ensayo ruminal *in vitro* (rastrojo de maíz), fue el que

presentó la menor correlación con las celulasas (0.3), pero en los dos sustratos restantes (heno de ballico y heno de alfalfa) tampoco existió correlación (Tabla 1). Los incrementos en la desaparición de materia seca en el ensayo ruminal *in vitro* no pueden relacionarse directamente con las celulasas que tienen los extractos crudos, sino a un sinergismo por la adición de extractos fúngicos como lo reportaron Varel y Kreikemeier (1994), con extractos de AO y Morgavi y col. (2000), con extractos de *Trichoderma longibrachiatum*. Lee y col. (2000), proponen que las fracciones enzimáticas que contienen los extractos crudos de los cultivos fúngicos, no son lo suficientemente potentes para influir de tal manera sobre los parámetros de la fermentación ruminal. Concuerdan con los resultados obtenidos en este trabajo, ya que AO tuvo la menor actividad celulolítica pero tuvo los mayores incrementos en % DMS en el ensayo ruminal *in vitro* (Tabla 1). Schmidt y col. (2004), reportaron que AO tiene componentes no identificados o factores que son responsables de estimular la producción de zoosporas del hongo *Neocallimastix frontalis* EB 188 y que el efecto es mayor cuando se encuentran creciendo en sustratos ricos en celulosa. Giraldo y col. (2008), proponen que los efectos de las enzimas están influenciados por la naturaleza del sustrato donde es aplicado y además, están involucrados otros mecanismos de acción que actúan positivamente en la fermentación ruminal.

En relación a los sustratos ricos en almidón, los incrementos fueron menores de 6% con respecto al control (To). Se encontraron diferencias significativas entre los sustratos ($P < 0.05$) (dato estadístico no mostrado). Los contrastes ortogonales mostraron que los extractos de los cultivos fúngicos tuvieron diferencias ($P < 0.01$) con el control (To), pero no existieron diferencias entre los cultivos fúngicos ($P > 0.05$) (Tabla 2). Sólo los extractos crudos de ANY y AO presentaron amilasas. Por otra parte, aunque la actividad enzimática fue aproximadamente 3 veces mayor con ANY con respecto a AO, no existieron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre ambos cultivos en el ensayo ruminal *in vitro* (Tabla 2). Los coeficientes de correlación con los granos de sorgo y de residuos de panificación fueron mayores que en los sustratos ricos en celulosa (Tabla 2), pero también se encontró el menor coeficiente de correlación (0.06) con granos de maíz. Rojo y col. (2005), encontraron que la inclusión de glucoamilasa de *A. niger* incrementó el conteo de protozoarios, lactato y ácidos grasos volátiles pero no en la digestión. Nuestros resultados con los cultivos de ANY y AO respaldan la propuesta de Lee y col. (2004) que reportaron que el efecto estimulador en la fermentación ruminal por el hongo anaerobio de origen ruminal *Piromyces communis* cepa 22 se debe a las enzimas y metabolitos que contienen.

Tabla 1. Actividades celulolíticas de diferentes cultivos fúngicos y porcentaje de desaparición de materia seca en sustratos ricos en fibra en ensayo ruminal *in vitro* y sus coeficientes de correlación (3% cultivo fúngico, 39 °C, pH 6.5).

Cultivo Fúngico	Celulasas (U/g)	Rastrojo de maíz	Heno de ballico	Heno de alfalfa
		% DMS		
To	0 ^a	57.01	72.18	74.55
PS	156 ^b	59.78	73.26	76.49
TH	605 ^d	59.75	76.18	76.63
ANB	422 ^c	61.39	76.50	78.02
ANY	712 ^e	62.45	77.30	80.44
AO	130 ^b	64.46	79.56	78.39
SE	38.40	0.73	0.71	0.95
R		0.30	0.42	0.66
Contrastes del % DMS				
To vs PS, TH, ANB, ANY, AO		(P<0.001)		
To, PS, TH vs ANB, ANY, AO		(P<0.001)		
ANY vs AO		(P>0.05)		
PS vs TH		(P>0.05)		
ANB vs ANY		(P>0.05)		

*U = Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima requerida para liberar una μmol de glucosa por minuto bajo las condiciones del ensayo.

% DMS = Porcentaje de desaparición de materia seca.

R = Coeficiente de correlación entre las celulasas y % DMS.

To = Control sin adición de cultivo fúngico; PS = *Penicillium sp*; TH = *Trichoderma harzianum*; ANB = *Aspergillus niger* en bagazo de caña; ANY = *Aspergillus niger* en yuca; AO = *Aspergillus oryzae*.

a, b, c, d, e. Las medias en la misma columna con diferente sobreíndice difieren significativamente (P<0.05).

SE = Error estándar.

Tabla 2. Actividades amilolíticas de diferentes cultivos fúngicos y porcentaje de desaparición de materia seca en sustratos ricos en almidón en ensayo ruminal *in vitro* y sus coeficientes de correlación (3% cultivo fúngico, 39 °C, pH 6.5).

Cultivo Fúngico	Amilasas (U/g)	Granos de sorgo	Granos de maíz	Residuos de panificadora
		% DMS		
To	0 ^a	82.20	94.28	95.55
PS	ND	82.91	97.43	97.25
TH	ND	86.58	94.83	96.23
ANB	ND	84.83	94.60	96.73
ANY	2149 ^c	84.79	94.86	97.02
AO	586 ^b	84.56	96.11	95.09
SE	65.50	0.73	0.90	0.90
R		0.76	0.06	0.88
Contrastes del % DMS				
To vs PS, TH, ANB, ANY, AO		(P<0.01)		
ANB, ANY, AO vs TO, PS, TH		(P>0.05)		
ANY vs AO		(P>0.05)		
PS vs TH		(P>0.05)		
ANB vs ANY		(P>0.05)		

*U = Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima requerida para liberar una μmol de glucosa por minuto bajo las condiciones del ensayo.

ND = No detectable.

% DMS = Porcentaje de desaparición de materia seca.

R = Coeficiente de correlación entre las amilasas y % DMS.

To = Control sin adición de cultivo fúngico; PS = *Penicillium sp*; TH = *Trichoderma harzianum*; ANB = *Aspergillus niger* en bagazo de caña; ANY = *Aspergillus niger* en yuca; AO = *Aspergillus oryzae*.

a, b, c. Las medias en la misma columna con diferente sobreíndice difieren significativamente (P<0.05).

SE = Error estándar.

Tabla 3. Actividades proteolíticas de diferentes cultivos fúngicos y porcentaje de desaparición de materia seca en sustratos ricos en proteína en ensayo ruminal *in vitro* y sus coeficientes de correlación (3% cultivo fúngico, 39 °C, pH 6.5).

Cultivo Fúngico	Proteasas (U/g)	Harina de sangre	Harinolina	Pasta de soya
		% DMS		
To	0	65.45	72.30	97.11
PS	58	68.80	72.65	98.65
TH	ND	69.91	74.83	99.19
ANB	ND	67.47	74.35	99.28
ANY	ND	68.72	74.85	99.37
AO	ND	70.91	75.95	99.61
SE	1.20	0.85	0.94	0.57
Contrastes del % DMS				
To vs PS, TH, ANB, ANY, AO			(P<0.001)	
To, PS, TH vs ANB, ANY, AO			(P<0.001)	
ANY vs AO			(P<0.05)	
PS vs TH			(P<0.05)	
ANB vs ANY			(P>0.05)	

*U = Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima requerida para liberar una μmol de tiroxina por minuto bajo las condiciones del ensayo.

ND= No detectable.

% DMS = Porcentaje de desaparición de materia seca.

To = Control sin adición de cultivo fúngico; PS = *Penicillium sp*; TH = *Trichoderma harzianum*; ANB = *Aspergillus niger* en bagazo de caña; ANY = *Aspergillus niger* en yuca; AO = *Aspergillus oryzae*.

SE= Error estándar

Los sustratos con alto contenido de proteína tuvieron incrementos de 5.7, 3.1 y 2.2% en harina de sangre, harinolina y pasta de soya respectivamente por la adición de cultivos fúngicos en % DMS en los ensayos ruminales *in vitro*. Como se esperaba, existieron diferencias significativas entre los sustratos ($P<0.05$) (dato estadístico no mostrado). Se encontró un mayor efecto en harina de sangre con incrementos hasta del 8.3% con AO, pero este cultivo fúngico no se le detectaron proteasas. Los contrastes ortogonales mostraron que todos los extractos fúngicos tuvieron diferencias con el control ($P<0.001$) y que los *Aspergillus* fueron diferentes ($P<0.001$) al control, PS y TH. Pero, con estos sustratos, existieron diferencias ($P<0.05$) entre ANY contra AO al igual que PS contra TH (Tabla 3). Solamente en un extracto crudo se encontró actividad proteolítica que fue PS con 58 U/g, su incremento en el % DMS en el ensayo ruminal *in vitro* no fue el mayor en ninguno de los sustratos (harina de sangre, harinolina y pasta de soya), por lo que se respalda que el efecto en el ensayo ruminal *in vitro* no se debe solamente a las enzimas sino a metabolitos que deben contener estos cultivos fúngicos. Harper y col. (1996), observaron que componentes con pesos moleculares menores a 2 kDa obtenidos de extractos de AO incrementaban la fisiología de un hongo anaerobio implicado en la degradación de paredes celulares. Fondevila y col. (1990) sugieren que el incremento de nitrógeno amoniacal (N-NH_3) por la adición de cultivos fúngicos era debido a la actividad proteica de los cultivos fúngicos, lo que no concuerda con nuestros resultados (Tabla 3), ya que sólo un cultivo fúngico tuvo proteasas y todos los cultivos incrementaron la desaparición de materia

seca de los sustratos ricos en proteína en los ensayos ruminales *in vitro*. Mckain y col. (1991), reportaron que AO incrementaba la desaminación de aminoácidos. Lee y col. (2000), sugieren que los cambios en las concentraciones de N-NH_3 están relacionados al efecto que tienen los cultivos fúngicos en la estimulación de los microorganismos ruminales.

Nuestros resultados indican que el efecto en el ensayo ruminal *in vitro* por los cultivos fúngicos se debe principalmente a otros mecanismos de tipo no enzimático, que estimulan las fermentaciones ruminales, ya que en las preparaciones comerciales las enzimas no son puras sino mezclas, como lo reportan Giraldo y col. (2008). Por lo que se sugiere que otras sustancias provenientes de los cultivos fúngicos que se encuentran también en estos productos, influyen en la fermentación ruminal mediante la estimulación de los microorganismos ruminales (Schmidt y col., 2004).

Conclusiones

Los cultivos fúngicos influyen en forma positiva la desaparición de la materia seca en los ensayos ruminales *in vitro*. El efecto no se puede atribuir solamente a los perfiles enzimáticos. El incremento en degradabilidad de los sustratos depende más de su naturaleza que al tipo de cultivo fúngico adicionado. Los cultivos del género *Aspergillus* tuvieron por lo general los mejores resultados.

Referencias

- Beauchemin, K.A., Colombatto, D., Morgavi, D.P. y Yang, W.Z. (2002). Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. *Journal of Animal Science* 81 (Suppl. 2), E37-E47.
- Beauchemin, K.A., Colombatto D., Morgavi, D.P. y Yang, W.Z. (2003). Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. *Journal Animal Science* 81 (Supl 2), E37-E47.
- Campos-Montiel, R.G. y Viniegra-González, G. (1995). Microbial bioassay of fungal compounds that stimulate the growth of a consortium of anaerobic cellulolytic bacteria. *Biotechnology Techniques* 9, 65-68.
- Di Francia, A., Masucci, F., De Rosa, G., Varricchio, M.L. y Proto, V. (2008). Effects of *Aspergillus oryzae* extract and a *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on intake, body weight gain and digestibility in buffalo calves. *Animal Feed Science and Technology* 140, 67-77.
- Fondevila, M., Newbold, C.J., Hutton, P.M. y Oskov, E.R. (1990). A note on the effect of *Aspergillus oryzae* fermentation extract on the ruminal fermentation of sheep given straw. *Animal Production* 51, 422-425.
- Giraldo, L.A., Tejido, M.L., Ranilla, M.J. y Carro M.D. (2008) Effects of exogenous fibrolytic enzymes in vitro ruminal fermentation of substrates with different forage: concentrate ratios. *Animal Feed Science Technology* 141 (3-4), 306-325.
- Harper, E.G., Welch, R.P., Contreras Lara, D., Chang, J.S. y 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. *Applied Microbiology Biotechnology* 45, 817-821.
- Lee, S.S., Ha, J.K. y Cheng K. J. (2000). Influence of an anaerobic fungal culture administration on in vivo ruminal fermentation and nutrient digestion. *Animal Feed Science Technology* 88, 201-217
- Lee, S.S., Choi, C.K., Ahn, B.H., Moon, Y.H., Kim, C.H. y Ha, J.K., (2004). In vitro stimulation of rumen microbial fermentation by a rumen anaerobic fungal culture. *Animal Feed Science Technology* 115, 215-226.
- Loeza-Corte, J.M., Verde-Calvo, J.R., Cruz-Sosa, F., Vernon-Carter, E.J. y Huerta-Ochoa S. (2007). Producción de L-arabinosa a partir de la hidrólisis de la goma de mezquite por un extracto crudo con actividad α -L-arabinofuranosidasa de *Aspergillus niger*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 6 (3), 259-265.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265-275.
- Martins, A.S., Vieira P.F., Berchielli T.T., Prado I. N. y Moletta J.L. (2006). Intake and Apparent Total tract digestibility in cattle supplemented with fibrolytic enzymes. *Revista Brasileira Zootecnia* 35, 2118-2124.
- Mckain, N., Newbold, C.J. y Wallace, R.J. (1991). Combined effects of *Aspergillus oryzae* fermentation extract (AMAFERM:AO) and monensin on fermentation in the rumen simulation technique (Rusitec). *Animal Production* 52, 593 (Abst).
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31, 426-428.
- Morgavi, D.P., Beauchemin, K.A., Nsereko, V.L., Rode, L.M., Iwaasa, A.D., Yang, W.Z., McAllister, T.A. y Wang, Y. (2000). Synergy between ruminal fibrolytic enzymes and enzymes from *Trichoderma longibrachiatum*. *Journal of Dairy Science* 83, 1310-1321.
- Rojó, R., Mendoza, G.D., González, S.S., Landois, L. Barcena, R. y Crosby, M.M. (2005). Effects of exogenous amylase from *Bacillus licheniformis* and *Aspergillus niger* on ruminal starch digestion and lamb performance. *Animal Feed Science and Technology* 123-124, 655-665.
- Roper, K.B. y Fennell, D.I. (1965). The genus *Aspergillus*. The Williams and Wikins Co., Baltimore, USA, pp 357-404.
- Ruiz-Leza, H.A., Rodríguez-Jasso, R.M., Rodríguez-Herrera, R., Contreras-Esquivel, J.C. y Aguilar C.N. (2007). Diseño de biorreactores para fermentación en medio sólido. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 6 (1), 33-40.
- SAS. (1990). SAS/STAT User's Guide (Version 6), 4Th ed. Statistical Analysis Systems Institute, Cary, NC, USA.
- Schmidt, J.A., Albright, S., Calza, G.M. y Calza, R.E. (2004). Characterization of *Aspergillus oryzae* fermentation extract effects on the rumen fungus *Neocallimastix frontalis* EB 188. Part 2. Carbon source utilization and effects on zoospore production. *Applied Microbiology Biotechnology* 63, 431-437.
- Tilley, J.M.A. y Terry, R.A. (1963). A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *Journal of the British Grassland Society* 18, 104-111.
- Varel, V.H., Kreikemeier, K. K., Jung, H.J.G. y Hatfield R.D. (1993). In vitro stimulation of forage fiber degradation by ruminal microorganism with *Aspergillus oryzae* fermentation extract. *Applied Environmental Microbiology* 59, 3171-3176.
- Varel, V.H. y Kreikemeier, K.K. (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 bromegrass hay. *Journal of Animal Science* 72, 1814-1822.

Wallace, R.J., Wallace, S.J.A., Mckain, N., Nsereko, V.L. y Hartnell G.F. (2001). Influence of supplementary fibrolytic enzymes on the fermentation of corn and grass silages by mixed ruminal microorganisms *in vitro*. *Journal Animal Science* 79, 1905-1916.