



CARACTERIZACIÓN DEL COMPONENTE PREBIÓTICO DE *Aspergillus niger* ESTIMULANTE DE BACTERIAS CELULOLÍTICAS DE ORIGEN RUMINAL

CHARACTERIZATION OF THE PREBIOTIC COMPONENT OF *Aspergillus niger* THAT STIMULATES THE CELULLOLYTIC BACTERIA OF RUMINAL ORIGIN

A. Quintero-Lira¹, R. Hernández-Díaz¹, D. J. Pimentel-González¹,
M. E. Rodríguez-Huezo² y R. G. Campos-Montiel^{1*}

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

² Depto. Ingeniería Química y Bioquímica, Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec, Av. Tecnológico s/n
esq. Av. Central, Col. Valle de Anáhuac, 55210, Ecatepec, Edo. Méx., México.

Recibido 12 de Noviembre 2008; Aceptado 15 de Enero 2009

Resumen

Extractos crudos de *Aspergillus niger* (An) se han utilizado como aditivos para la nutrición animal demostrando su efecto al incrementar la digestibilidad de forrajes en ensayos *in vitro*. En esta investigación se caracterizó el componente prebiótico de An que estimula el crecimiento de un consorcio de bacterias celulolíticas de origen ruminal (CBCOR). Se utilizaron fracciones ultrafiltradas menores de 30 kDa. Las fracciones ultrafiltradas fueron calentadas a diferentes temperaturas (60, 90 y 120 °C), se estimó su peso molecular mediante cromatografía de exclusión molecular y se fraccionaron con cromatografía de intercambio iónico. A las fracciones activas se les realizó análisis de proteína, carbohidratos y espectrofotometría de infrarrojo. Los resultados mostraron que todas las fracciones ultrafiltradas y tratadas térmicamente incrementaron significativamente ($P < 0.05$) la producción de proteína, concentración de acetato y la actividad carboximetilcelulasas en CBCOR. La cromatografía de exclusión molecular estimó un peso molecular de 6.1 kDa de la fracción activa, mientras las cromatografías de intercambio aniónico y catiónico mostraron una sola fracción activa. El análisis bioquímico y espectro infrarrojo sugieren la naturaleza peptídica del componente prebiótico de An que estimula el CBCOR.

Palabras clave: prebióticos, bacterias anaerobias celulolíticas, *Aspergillus niger*.

Abstract

It has been demonstrated that crude extracts of *Aspergillus niger* (An) used as additives for animal nutrition have enhanced the digestibility of forages on *in vitro* assays. In this work the prebiotic component of An that stimulates the growth of a cellulolytic bacterial consortium from ruminal origin (CBCRO) was characterized. Ultrafiltered fractions of less than 30 kDa, heat treated at 60, 90 and 120 °C were used. The fractions were obtained by ion-exchange chromatography and their average molecular weight was determined by molecular exclusion chromatography. Protein and carbohydrate contents and the infrared spectra were determined on the active fractions. Results showed that all the heat treated ultrafiltered fractions significantly increased ($P < 0.05$) carboxymethylcellulases' activities, and protein and acetate productions of the CBCRO. Molecular exclusion chromatography established that the active fraction had a molecular mass of 6.1 kDa, whereas only one active fraction was detected through ion exchange chromatography. Biochemical analysis and infrared spectra data suggest that the prebiotic component of An has a peptidic nature.

Keywords: prebiotics, cellulolytic anaerobic bacteria, *Aspergillus niger*.

1. Introducción

Los aditivos no bacterianos de tipo microbiológico están basados en su contenido enzimático, medio cultivo, metabolitos y subproductos de fermentación (Beauchemin y col., 2002). Los cultivos de tipo

fúngico más utilizados para mejorar la digestión ruminal son *Aspergillus oryzae* y *Saccharomyces cerevisiae* (Di Francia y col., 2008). Tricarico y col. (2007) encontraron que un suplemento de amilasas producidas por *Aspergillus oryzae* incrementa la productividad ruminal y estimula el crecimiento de

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

bacterias ruminales. El efecto positivo en el crecimiento de bacterias ruminales aumenta la degradación de los carbohidratos estructurales con un incremento en la producción de acetato (Enjalbert y col., 1999). Lee y col. (2000) encontraron que la administración de cultivos de hongos anaerobios de origen ruminal incrementaba la digestibilidad de nutrientes en fermentaciones ruminales *in vivo*. Campos-Montiel y col. (2008) encontraron que otros fermentos de hongos como *Penicillium sp*, *Trichoderma harzianum*, *Aspergillus niger* (An) aumentaron la digestibilidad de forrajes *in vitro* y que este efecto no estaba relacionado con su perfil enzimático. Un estudio realizado con *Aspergillus niger*, en el que se utilizaron fermentos crudos producidos por cultivo sólido, determinó que éstos tenían efectos benéficos en las digestibilidades *in vitro* (Tapingkae y col., 2008). Los fermentos sólidos tienen una mayor concentración de metabolitos en comparación a los encontrados en fermentaciones en medios líquidos (Ruíz-Leza y col., 2007). A la fecha no existen reportes sobre la naturaleza del componente o componentes de fermentos de An cuando es crecido en cultivo sólido, con efectos prebióticos que estimulan microorganismos anaerobios de origen ruminal.

El objetivo de este estudio fue caracterizar los componentes prebióticos de *Aspergillus niger* que estimulan el crecimiento de un consorcio de bacterias celulolíticas de origen ruminal.

2. Materiales y métodos

2.1. Ultrafiltrado de cultivo fúngico

Se utilizó un fermento sólido de *Aspergillus niger* (An) crecido en pulpa de café. La composición proximal del fermento en base seca con 94.2% de materia seca (MS) tuvo un contenido en (%): 65.5, fibra detergente neutro; 9, proteína cruda; 13.2, cenizas; 1.3, extracto etéreo; y 5.2, de extracto libre de nitrógeno. La actividad de carboximetilcelulasa (CMCasa) fue de 200 UI/g, con una máxima actividad enzimática a un pH 5 y una temperatura de 70 °C.

La ultrafiltración se realizó homogenizando 10 g de An con agua por 1 h a 25 °C. Posteriormente se filtró en papel Whatman núm. 1. Por último, se ultrafiltró a través ultrafree-PFL Millipore con un peso molecular nominal de 30 kDa.

2.2. Termoestabilidad de los componentes activos

El efecto del calentamiento en las muestras de la levadura fue determinado después de la ultrafiltración a 30 kDa. Se calentaron 10 mL del ultrafiltrado a diferentes temperaturas (60, 90 y 120 °C) por 15 minutos.

2.3. Cromatografía

La estimación del peso molecular de los componentes prebióticos de An se realizó con los ultrafiltrados de 30 kDa por medio de la detección con luz ultravioleta. Se utilizó una columna de Sephadex G-50 de (1.6 x 75 cm) equilibrada con un amortiguador 0.1 M de fosfatos a un pH 7. La elución fue de 15 mL h⁻¹. La colección fue cada 5 mL. A las fracciones se les determinó la absorbancia a 254 nm. El volumen de la columna se estimó con azul de dextrano. Los marcadores moleculares fueron anhídrido carbónico (29 kDa), citocromo c (12.4 kDa) y apronitina (6.5 kDa).

La cromatografía de intercambio aniónico utilizó resina de DEAE-Sephacel, con una columna de (1x35 cm) preequilibrada con una solución 0.1M de carbonato con un pH de 10, el flujo fue de 20 mL/hr y la colección de las fracciones fue cada 5 mL. La absorbancia fue medida a 254 nm. La cromatografía catiónica con las condiciones anteriores, con la longitud de la columna igual que en la colección de las fracciones y con la detección anteriormente descrita, pero con una resina CM-Sephadex G-25, la cual fue preequilibrada con una solución de citrato 0.1 M con un pH 4.

2.4 Análisis bioquímicos

A la fracción de exclusión molecular se le determinó proteína con la técnica de Bradford; azúcares totales con antrona y azúcares reductores por la técnica de Miller (1959).

2.5 Espectrofotometría infrarroja

Las fracciones de la cromatografía de exclusión molecular fueron evaporadas a 60 °C. El sólido fue mezclado con KBr para producir tabletas. Las muestras fueron escaneadas en la región de cercano y medio infrarrojo desde 4400 a 400 cm⁻¹, la resolución fue cada 4 cm⁻¹ con un equipo DigiLab FTS-60 (Bio-Rad, Richmond, CA) (Reeves, 2001).

2.6 Bioensayo con un consorcio de bacterias celulolíticas de origen ruminal

El bioensayo fue realizado con microcosmos, los cuales consistían en botellas anaerobias de 60 mL, que contenían 25 mL de medio de cultivo. El medio estuvo compuesto por (mg/L): 600, Na₂HPO₄; 589, KCl; 100, MgSO₄·7H₂O; 64, CaCl₂; 480, (NH₄)₂SO₄; 4000, NaHCO₃; 1, resazurin; 100, peptona de caseína (pH 6.8); y solución de carboximetilcelulosa estéril (concentración 6 g/L).

Las bacterias anaerobias fueron obtenidas de un biorreactor celulolítico. Los microcosmos fueron incubados durante 24 h a 37 °C. El efecto de los componentes activos fue determinado por el incremento de los siguientes parámetros: proteína, acetato y actividad de carboximetilcelulasa

(Hernández-Díaz y col., 2008). Todos los ultrafiltrados y fracciones fueron adicionadas a nivel de 3% (v/v).

2.7 Análisis Estadístico

Todos los bioensayos con CBCOR fueron realizados en un diseño completamente al azar por triplicado. Las variables de respuesta fueron analizadas por varianza, cuando existieron diferencias significativas ($P < 0.05$) las medias se compararon usando la prueba de Tukey (SAS, 1990).

3. Resultados y discusión

El ultrafiltrado de An tuvo efectos prebióticos en la síntesis de proteína, producción de acetato e incrementó en la actividad de carboximetilcelulasas en el CBCOR (Tabla 1). Estos resultados fueron similares a los reportados por Welch y col. (1996) donde encontraron que extractos solubles de *Aspergillus oryzae* estimulan el crecimiento *in vitro* del hongo anaerobio *Neocallimastix frontalis*. Schmidt y col. (2004) mencionaron que filtrados de *Aspergillus oryzae* tenían efectos prebióticos por acelerar la producción y maduración de zoosporas, incrementando las actividades de carboximetilcelulasas del hongo anaerobio *Neocallimastix frontalis*. La adición de un fermento sólido de *Aspergillus niger* incrementó la digestibilidad *in situ* del rastrojo de maíz y la actividad de carboximetilcelulasas en un consorcio microbiano de origen ruminal (Hernández-Díaz y col., 2008).

El calentamiento de los ultrafiltrados no alteró el efecto prebiótico de An. Todos los tratamientos con An tuvieron incrementos significativos ($P < 0.05$) en comparación con el control sin la adición de ultrafiltrado de An en el CBCOR (Tabla 1). Estos resultados son similares a los obtenidos por Lee y col. (2004) donde cultivos de hongos anaerobios (*Piromyces communis*) esterilizados incrementaban el número de bacterias celulolíticas, las actividades enzimáticas de carboximetilcelulasas, xilanasas y la digestión de celulosa en comparación del control sin la adición del cultivo fúngico en ensayos *in vitro* con microorganismos ruminales. Oeztuerk y col. (2005) reportaron que levaduras viables (*Saccharomyces boulardii*) tuvieron los mismos efectos en la estimulación del metabolismo microbiano que sus esterilizados. Estos reportes refuerzan los encontrados en este trabajo donde los componentes de los cultivos fúngicos con efectos prebióticos en ensayos con microorganismos ruminales no se ven afectados por calentamientos de 120 °C.

La cromatografía de exclusión molecular mostró una sola fracción que apareció después de los marcadores de pesos moleculares. La ecuación encontrada para estimar los pesos moleculares fue $\text{Log Peso Molecular} = -0.65 (V/V_0) + 5.3$. La fracción de An tuvo $(V/V_0) = 2.33$, que corresponde a un peso molecular de 6.1 ± 0.55 kDa.

Tabla 1. Efecto del calentamiento en los ultrafiltrados de *Aspergillus niger* en proteína, actividad de carboximetilcelulasas y acetato en el consorcio de bacterias celulolíticas de origen ruminal.

Tratamientos	Proteína (mg/L)	Actividad CMCasa	Acetato (μmol/L)
Control	51.2 ^a	252 ^a	11.4 ^a
Ultrafiltrado	58.7 ^b	270 ^b	15.2 ^b
60 °C	56.9 ^b	292 ^b	16.8 ^b
90 °C	56.7 ^b	284 ^b	15.9 ^b
120 °C	58.5 ^b	288 ^b	16.4 ^b
ES	1.26	5.1	0.7

Control = Sin la adición del cultivo fúngico; ES = Error estándar

a, b = Medidas en la misma columna con diferente superíndice tienen diferencias significativas ($P < 0.05$).

CMCasa = La actividad de carboximetilcelulasas es expresada como nanomoles de glucosa por minuto por mililitro.

Tabla 2. Efecto de las fracciones obtenidas por cromatografía de exclusión molecular intercambio aniónico y catiónico de *Aspergillus niger* en proteína, actividad de carboximetilcelulasas y acetato en el consorcio de bacterias celulolíticas de origen ruminal.

Tratamiento	Proteína (mg/L)	Actividad CMCasa	Acetato (μmol/L)
Control	47.23 ^a	224 ^a	13.7 ^a
Ultrafiltrado	58.6 ^c	295 ^c	21.1 ^c
Fracción con peso molecular de 6.1 kDa	54.6 ^b	270 ^{bc}	17.1 ^b
Fracción de la cromatografía intercambio aniónico	52.2 ^b	268 ^{bc}	17.3 ^b
Fracción de la cromatografía de intercambio catiónico	52.4 ^b	259 ^b	18.4 ^{bc}
ES	1.2	6.2	0.64

Control = Sin la adición del cultivo fúngico; ES = Error estándar

a, b = Medidas en la misma columna con diferente superíndice tienen diferencias significativas ($P < 0.05$).

CMCasa = La actividad de carboximetilcelulasas es expresada como nanomoles de glucosa por minuto por mililitro.

La fracción de 6.1 kDa tuvo efectos prebióticos al estimular la producción de proteína, incrementar la concentración de acetato y aumentar la actividad de carboximetilcelulasas en el CBCOR (Tabla 2). Estos efectos prebióticos fueron significativamente diferentes ($P < 0.05$) al testigo sin adición de An. Harper y col. (1996) reportaron que los componentes de *Aspergillus oryzae* que aceleraban la fisiología de hongos anaerobios (*Neocallimastix frontalis*, *Piromyces communis* y *Orpinomyces* ssp) tenían pesos moleculares por arriba del corte de 2 kDa determinados por HPLC. Los componentes prebióticos de An en este estudio y los componentes

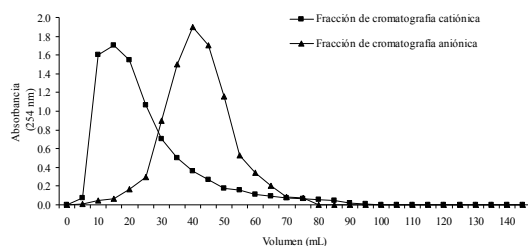


Fig. 1. Fracciones obtenidas de la cromatografía de intercambio catiónico y aniónico.

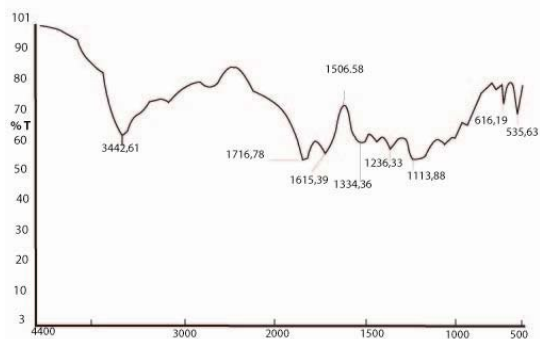


Fig. 2. Espectro infrarrojo obtenido en las fracciones de exclusión molecular, intercambio catiónico y aniónico.

de *Aspergillus oryzae* utilizados por Harper y col. (1996) también absorbieron luz ultravioleta a 254 nm lo que sugiere que son de la misma naturaleza química ya que ambos hongos pertenecen al mismo género. Campos-Montiel y col. (2008) reportaron que cultivos de hongos de los géneros *Aspergillus*, *Trichoderma* y *Penicillium* tuvieron efectos similares al incrementar la digestibilidad de diferentes forrajes en ensayos *in vitro* cuando fueron utilizados como aditivos para mejorar la fermentación ruminal. El peso molecular de 6.1 kDa del componente prebiótico de An que estimula en el CBCOR excluye a pequeñas moléculas como ácidos orgánicos, vitaminas y aminoácidos como lo sugirieron Callaway y Martin (1997). El peso molecular y la termoestabilidad hasta 120 °C de los componentes activos de An también excluyen a las enzimas. Estos resultados apoyan los sugeridos por Campos-Montiel y col. (2008) en los cuales no se encontró correlación entre las actividades enzimáticas de An y el incremento de la digestibilidad *in vitro* de diferentes forrajes.

Las cromatografías de intercambio iónico también mostraron un solo pico (Fig. 1) lo que sugiere que podría ser un solo componente, ya que esta técnica separa compuestos con mínimas diferencias en sus constituyentes. Estas fracciones también tuvieron los mismos efectos prebióticos en el CBCOR (Tabla 2).

El análisis bioquímico detectó proteína en las fracciones activas obtenidas en las tres cromatografía

Tabla 3. Análisis de proteína, azúcares totales y azúcares reductores de las fracciones obtenidas por cromatografía de exclusión molecular intercambio aniónico y catiónico de ultrafiltrados de *Aspergillus niger*.

Fracciones de cromatografía	Proteína (mg/L)	Azúcares totales (mg/L)	Azúcares reductores (mg/L)
Exclusión molecular de 6.1 kDa	1.5 ± 0.19	ND	ND
Intercambio aniónico	1.9 ± 0.31	ND	ND
Intercambio catiónico	1.7 ± 0.22	ND	ND

ND= No detectado

fías pero no detectó azúcares totales ni azúcares reductores (Tabla 3).

La espectrofotometría de infrarrojo cercano dio información sobre la absorción de enlaces entre C u O e H; y N e H encontrados en proteínas, carbohidratos, péptidos, etc. (Malley, 1998). Los resultados de las fracciones obtenidas en la cromatografía de exclusión molecular, intercambio aniónico y catiónico mostraron el mismo espectro con un pico a 3400 cm⁻¹ que podría ser OH o NH, el pico de 1700 cm⁻¹ que podría ser el grupo funcional COOH y el pico de 1600 cm⁻¹ que podría ser H-N-H (Fig. 2) lo cual, sugiere que son los mismos compuestos con grupos funcionales característicos de los péptidos. Estos resultados fueron similares a los reportados por Welch y col. (1996) donde encontraron que extractos solubles de *Aspergillus oryzae* estimulan el crecimiento *in vitro* del hongo anaerobio *Neocallimastix frontalis*.

Conclusiones

La caracterización de los ultrafiltrados de An mostraron que son termoresistentes, con peso molecular de 6.1 kDa y de naturaleza peptídica, los cuales tienen efectos prebióticos al incrementar la síntesis de proteína, concentración de acetato y la actividad carboximetilcelulasa en el consorcio de bacterias celulolíticas de origen ruminal.

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.
- Callaway, E.S. y Martin, S.A. (1997). Effects of a of *Saccharomyces cerevisiae* culture on ruminal bacteria that utilize lactate and digest cellulose. *Journal of Dairy Science* 80, 2035-2044.

- Campos-Montiel, R. G., Pimentel-Gonzalez, D. J., Hernández-Fuentes, A. D., Alfaro Rodríguez, R.H. y Viniegra González, G. (2008). Influence of fungal cultures on *in vitro* ruminal assays with different substrates. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 7, 215-221.
- 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 (1-2), 67-77.
- Enjalbert, F., Garrett, J.E., Moncoulon, R., Bayourthe, C. y Chicoteau, P. (1999). Effects of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on ruminal digestion in non-lactating dairy cows. *Animal Feed Science and Technology* 76, 195-206.
- Fu, C.J., Feldon, E.E.D., Lehmkuhler, J.W. y Kerley, M.S. (2001). Ruminal peptide concentration required to optimize microbial growth and efficiency. *Journal of Animal Science* 79, 1305-1312.
- 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 and Biotechnology* 45, 817-821.
- Hernández-Díaz, R., Pimentel-González, D.J., Figueira, A.C., Viniegra-González, G. y Campos-Montiel, R.G. (2008). Influence of an aerobic fungus grown on solid culture on ruminal degradability and on a mixture culture of anaerobic cellulolytic bacteria. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* DOI: 10.1111/j.1439-0396.2008.00912.x
- 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 and 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 and Technology* 115, 215-226.
- Malley, D.F. (1998). Near-infrared spectroscopy as a potential method for routine sediment analysis in improve rapidity and efficiency. *Water Science and Technology* 37, 181-188.
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31, 426-428.
- Oeztuerk, H., Schroeder, B., Beyerbach, M. y Breves, G. (2005). Influence of living and autoclaved yeast *Saccharomyces boulardii* on *in vitro* ruminal microbial metabolism. *Journal of Dairy Science* 88, 2594-2600.
- Reeves, J.B. (2001). Mid-infrared diffuse reflectance spectroscopy for the analysis of poultry manures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 2193-2197.
- 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 and Biotechnology* 63, 431-437.
- Tapingkae, W., Yachai, M., Visessanguan, W., Pongtanya, P. y Pongpiachan, P. (2008). Influence of crude xylanase from *Aspergillus niger* FAS128 on the *in vitro* digestibility and production performance of piglets. *Animal Feed Science and Technology* 140, 125-138.
- Tricarico, J.M., Abney, M.D., Galyean, M.L., Rivera, J.D., Hanson, K.C., McLeod, K.R. y Harmon, D.L. (2007). Effects of a dietary *Aspergillus oryzae* extract containing α -amylase activity on performance and carcass characteristics of finishing beef cattle. *Journal of Animal Science* 85, 802-811.
- Welch, R.D., Tsai, K.P., Harper, E.G., Chang, J.S. y Calza, R.E. (1996). The effect of *Aspergillus oryzae* fermentation extract on the anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis* EB 188 effects on physiology. *Applied Microbiology and Biotechnology* 45, 811-816.