

# ACTIVIDAD FIBROLÍTICA DE HONGOS RUMINALES AISLADOS DE ECOSISTEMAS TROPICALES

Gualdrón L<sup>1</sup>, Mayorga O, Rodríguez D, Manovacia  
P, Martín A, Carulla J<sup>2</sup>, Barahona R

Animal, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, Colombia  
Departamento de Producción Animal, Universidad  
Nacional de Colombia, Sede Medellín, Colombia  
Programa Nacional de Fisiología y Nutrición animal, C.  
I. Tibaitatá, Corpoica, Mosquera, Colombia  
Convenio Jóvenes Investigadores Colciencias-Corpoica

## RESUMEN

Se evaluó la capacidad de degradación de sustratos altamente fibrosos por 18 aislados fungales ruminales en fermentaciones de 120 horas utilizando como única fuente de carbono pasto colosua (*Bothriochloa pertusa*). Dentro del ensayo se incluyeron aislados pertenecientes a los géneros *Neocallimastix*, *Orpinomyces* y *Piromyces*. De acuerdo con los parámetros del modelo de Gompertz, la fase de adaptación de los aislados fue de 23,8 horas (h)  $\pm$  4,20, con una producción de gas promedio de 195 ml/g sustrato  $\pm$  7,52, con un tiempo en alcanzar la mitad de la producción de gas entre las 35 y 55 h. La mayor tasa máxima de producción de gas (TMPG) fue de 5,7 ml/h, perteneciente a un aislado del género *Orpinomyces*. Se observó una degradación de la materia seca (MS) de 58%  $\pm$  2, y de la fibra en detergente neutro (FDN) de 46%  $\pm$  2 en promedio para todos los aislados fungales. La producción total de ácidos grasos volátiles (AGV) fue de 22,04  $\pm$  1,5 mM, con una proporción molar de ácido acético de 0,93%  $\pm$  0,01 para el promedio de los 18 aislados. Los valores máximos de las actividades enzimática carboximetilcelulasa (CMCasa), celulasa microcristalina y xilanasa fueron 9,56, 1,39 y 303,12 UI respectivamente, confirmando la preferencia de los hongos ruminales hacia los sustratos hemicelulósicos. Se realizó un análisis de factores principales, y los aislados se agruparon por medio de un análisis de conglomerados. Fueron seleccionados cinco aislados fungales los cuales presentaron la mayor diversidad en los parámetros evaluados, principalmente en degradación de MS, FDN y las actividades enzimáticas. Se seleccionó un aislado del género *Neocallimastix*, dos del género *Orpinomyces*, y dos del género *Piromyces*.

**Palabras clave:** celulasa, *Neocallimastix* sp., *Orpinomyces* sp., *Piromyces* sp., xilanasa

## FIBROLYTIC ACTIVITY OF ISOLATED RUMINAL FUNGI FROM TROPICAL ECOSYSTEMS

### ABSTRACT

The ability of eighteen isolated ruminal fungi to degrade highly fibrous substrates was evaluated by fermentations lasting 120 hours. The graminea *Bothriochloa pertusa* was used as the unique carbon source. The experiment involved isolates belonging to the *Neocallimastix*,

1 laguita@yahoo.com

2 jecarullaf@unal.edu.co

Orpinomyces and Piromyces genera. According to the Gompertz model, the establishment phase of the isolated fungi was on average  $23,8 \text{ h} \pm 4,20$ , and reached a gas production level of  $195 \text{ ml/g DM} \pm 7,52$ . The half gas production was achieved between 35 and 55 hours and varied with each ruminal fungi. The highest value of the maximum gas production rate from all the isolated fungi was  $5,7 \text{ ml/h}$ ; this was produced by an isolated of Orpinomyces genus. The degradability of dry matter (DM) and neutral detergent fibre (NDF) of all the isolated fungi was on average  $58\% \pm 2$  and  $46\% \pm 2$ , respectively. With regard to volatile fatty acids (VFA) production all of the isolates were on average  $22,04 \text{ mM} \pm 1,5$ ; with an acetic acid proportion of  $93\% \pm 0,01$ . The highest values of fibrolytic activity for carboxymethyl cellulase, microcrystalline cellulase and xylase were 9,56, 1,39, 303,12 international units (UI), respectively; this confirmed preferences toward hemi-cellulosic substrates by ruminal fungi. Five isolated fungi with the most diversity in the evaluated parameters, principally in terms of degradability of DM, NDF and enzymatic capacity were selected by principal component analysis (PCA), followed by grouping clusters. These isolates were one Neocallimastix, two Orpinomyces and two Piromyces genera.

**Key words:** Celulase, *Neocallimastix* sp., *Orpinomyces* sp., *Piromyces* sp., xilanasase

## INTRODUCCIÓN

Los recursos forrajeros juegan un papel fundamental en la nutrición de rumiantes y proveen más del 90% de la energía consumida por los mismos en todo el mundo (1, 2). El rumiante tiene la capacidad de transformar estos recursos (3) en proteína de alta calidad (4), ya que presentan un sistema único que involucra una lenta fermentación pregástrica llevada a cabo por bacterias, protozoarios y hongos, que proveen al animal hospedero de nutrientes (3).

Sin embargo, la conversión real de los forrajes a productos animales no es muy eficiente, condición aún más crítica en forrajes tropicales, en los cuales la digestibilidad de la MS es aproximadamente 13% menor que para forrajes de zona templada (5, 6) debido, entre otros aspectos, a factores como el mayor contenido de fibra y la presencia de compuestos del metabolismo secundario vegetal como la lignina (7, 6).

Teniendo en cuenta los anteriores aspectos, uno de los retos actuales para la ganadería en general, pero especialmente para la del trópico, es aumentar la eficiencia de utilización de la fibra de los forrajes y materiales toscos utilizados en nutrición. En la búsqueda de alternativas para alcanzar

dicho objetivo se encuentra el uso de enzimas exógenas, las cuales pueden utilizarse directamente sobre la dieta o durante algún tipo de procesamiento del forraje (ensilaje).

La población microbiana ruminal presenta una fuente extensa pero hasta ahora subutilizada de enzimas con potencial industrial (8, 9, 10). Los hongos ruminales son capaces de degradar los polímeros de la pared celular vegetal más resistentes (11), y las celulasas y xilanasas que producen han sido clasificadas dentro de las enzimas fibrolíticas más potentes (8).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar aislados de hongos anaerobios pertenecientes al Banco de Germoplasma de Microorganismos con Interés en Nutrición Animal (ICA-Corpoica-Ministerio de Agricultura de la República de Colombia), haciendo énfasis en la actividad enzimática sobre la pared celular vegetal, y la degradación de compuestos lignocelulósicos, seleccionando cinco aislados promisorios para posteriores investigaciones referentes a la cinética de degradación de dichos compuestos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se llevaron a cabo dos fermentaciones con 18 aislados fungales puros y un inóculo

con fluido ruminal completo (por triplicado para ambos casos), en botellas con una capacidad de 50 ml, a partir de las cuales se realizaron las mediciones de producción de gas y se obtuvieron los extractos utilizados en la evaluación de actividad enzimática.

**Aislados fungales.** El Banco de Germoplasma de Microorganismos con Interés en Nutrición Animal suministró dieciséis aislados fungales, nueve del género *Orpinomyces* y siete del género *Piromyces*, procedentes de muestras de heces frescas de animales de las razas bovinas criollas colombianas Romosinuano, Hartón del Valle y Lucerna. Adicionalmente, se realizó el procedimiento de aislamiento de aislados fungales a partir de heces frescas de animales de la raza Holstein para obtener aislados del género *Neocallimastix*. Para tal efecto se utilizó el protocolo seguido por el Banco de Germoplasma de Microorganismos con Interés en Nutrición Animal.

Durante el tiempo de evaluación, los aislados fungales fueron mantenidos a 39 °C, en anaerobiosis, sin agitación, en el medio de cultivo Bauchop (12) (por cada 100 ml: extracto de levadura, 0,1 g; peptona, 0,1 g; NaHCO<sub>3</sub>, 0,5 g; HCl L-cisteína, 0,3 g; sulfito de sodio, 0,7 g; resazurín, 0,0001 g; solución mineral A, 16,5 ml, solución mineral B, 16,5 ml, fluido ruminal clarificado, 17 ml; agua destilada, 50 ml), utilizando como única fuente de carbono pasto *B. pertusa* (PC 7,1%, FDN 79,7%, FDA 51,4%, hemicelulosa 28,3%, celulosa 38,5%, lignina 10,2%) molido a 2 mm. Posterior a la inoculación se adicionó una solución de antibióticos (streptomycina, 0,25%; ampicilina, 1%; clo-ramfenicol, 0,50% y tetraciclina, 0,20%) y vitaminas del complejo B (por cada 100 ml de solución vitamínica: biotina, 20 mg; ácido fólico, 20 mg; piridoxina monohidroclorada, 100 mg; riboflavina, 50 mg; tiamina, 50 mg; ácido nicotínico, 50 mg; ácido pantoténico, 50 mg; ácido 4- aminobenzóico, 50 mg). La

transferencia al nuevo medio de cultivo se realizó por inoculación con fragmentos de forraje colonizado entre a las 96 h.

**Producción de gas.** La producción de gas fue medida durante las dos fermentaciones en cada una de las tres réplicas por cada aislado fangal, y las tres del inóculo mixto mediante la técnica descrita por Theodorou *et al* (13) utilizando un transductor de presión manual. Las mediciones fueron tomadas a las 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108 y 120 horas de la fermentación.

Los datos de producción de gas acumulado fueron ajustados al modelo exponencial doble de Gompertz  $y=a*\exp(-\exp(b-c*X))$  (14, 15), y se calcularon los parámetros del modelo para cada tratamiento (a, b, c) a partir de los cuales se obtienen los valores: hora al punto de inflexión (HPI) (b/c), ml de gas al punto de inflexión (GPI) (a/e), tasa máxima de producción de gas (TMPG) (ml/h)  $((a*c)/e)$  y fase lag (FL, establecimiento microbial, h)  $\{((a*c)/e) - (a/e) * b/c\} / ((a*c)/e)$ .

**Degradación *in vitro*.** Finalizado el periodo de incubación (120 horas), se recuperó el residuo de cada botella y se determinó la degradación de la MS (DMS) por diferencia de peso. A partir de este residuo se estimó la degradación del FND (DFDN) utilizando el procedimiento reportado por Van Soest (16).

**Actividad enzimática fungal.** Los extractos enzimáticos fueron obtenidos a partir de la fracción líquida del medio de cultivo utilizado para el crecimiento de los diferentes aislados en las fermentaciones de 120 horas. Las muestras fueron tomadas de dos réplicas de cada aislado, depositadas en tubos eppendorf, y mantenidas a -20 °C hasta su uso en las diferentes pruebas.

La actividad enzimática CMCasa celulosa microcristalina y xilanasa fueron estimadas con la metodología reportada por Zhu *et al* (17). Los sustratos de reacción utilizados para la determinación de las actividades CMCasa, celulosa microcristalina y xilanasa

fueron carboximetilcelulosa de baja viscosidad (CMC) (Sigma), celulosa microcristalina y xilano soluble (18) respectivamente [0,6% (p/v) sustrato disuelto en buffer fosfato, pH 6,5]. La mezcla extracto enzimático-sustrato se incubó a 39 °C por 1 h para las actividades CMCasa y celulosa microcristalina y por 30 min para la actividad xilanasa. Los azúcares reductores liberados durante la incubación fueron estimados por el método descrito por Somogyi (19) utilizando un espectrofotómetro (Milton Roy. Spectronic 601) para leer la absorbancia del complejo cobre-azúcar-arsenomolibdato a 540 nm.

Las diferentes actividades enzimáticas fueron expresadas en Unidades Internacionales (UI), una UI es la cantidad de  $\mu$ moles de azúcares reductores liberados min/ml de producto enzimático no diluido, bajo las condiciones del ensayo como lo proponen Colombatto y Beauchemin (20).

Ácidos grasos volátiles (AGV). Las muestras para AGV se analizaron por cromatografía de gases teniendo en cuenta el procedimiento reportado por Peters *et al* (21). Se utilizó un cromatógrafo de gas AutoSystem XL Perkin Elmer adaptado con un detector de ionización de llama y una columna de capilaridad Perkin Elmer FFAP (longitud: 30 m, diámetro: 0,32 mm, membrana: 0,25  $\mu$ m). El gas transportador fue nitrógeno (grado cromatográfico), las temperaturas de detección e inyección fueron 200 °C y 180 °C, respectivamente. Los datos fueron manejados por medio del programa Turbochrom-PE NELSON.

Análisis estadístico. La normalidad del error para cada una de las doce variables incluidas en este estudio fue evaluada mediante el procedimiento de Shapiro-Wilk. El análisis estadístico se realizó mediante el procedimiento GLM de SAS, versión 8 (SAS Inst., Inc., Cary, NC), utilizando un diseño de bloques al azar, en donde la fermentación fue el factor de bloqueo, y los aislados fun-

gales sirvieron como factores de variación. Las medias se compararon utilizando la prueba de Tukey.

Para la selección de los aislados promisorios se realizó un análisis de factores principales utilizando el procedimiento Factor (Method = principal) del paquete estadístico SAS, versión 8 (SAS Inst., Inc., Cary, NC). Posteriormente, se realizó un análisis de conglomerados utilizando el procedimiento Cluster (algoritmo de Ward), del mismo paquete estadístico.

## RESULTADOS

**Aislados fungales.** Se obtuvieron dos aislados fungales clasificados dentro del género *Neocallimastix*, completando los 18 aislados empleados en las fermentaciones.

**Producción de gas.** La mayoría de los aislados no presentaron diferencias en la producción de gas acumulada a las 120 h, debido a las diferencias observadas entre las réplicas de algunos de éstos. Sin embargo, se encontraron diferencias de 22 ml de gas entre los aislados de mayor y menor producción, como se observa en la Tabla 1.

El promedio de producción de gas acumulado a las 120 h de fermentación fue de 194,77 ml. El aislado con mayor la producción de gas acumuló 207,37 ml, siendo superior ( $P < 0,05$ ) al gas acumulado por los aislados de menor producción cuyo rango estuvo entre 187,75 y 185,48 ml de gas. Aun cuando no se realizaron comparaciones teniendo en cuenta el volumen de gas acumulado con el inóculo de fluido ruminal, éste (209,66 ml) fue similar al observado con el aislado con mayor acumulación de gas.

Se observaron diferencias ( $P < 0,05$ ) entre aislados fungales en relación con las horas requeridas para alcanzar el 50% de su producción de gas, como se indica en la Tabla 1. En promedio, los 18 aislados requirieron de 43,08 h, con un rango entre 35,4 y 54,6 horas.

**Tabla 1.** Producción de gas (ml), hora en alcanzar la mitad de la producción de gas, degradación de la materia seca (DMS, %) y degradación de la fibra en detergente neutro (DFDN, %)

Aislado	Gas 120 h (ml)	Hora 50% de gas	DMS (%)	DFDN (%)
Orpi. 1*	187,7 <sup>d</sup>	52,0 <sup>ab</sup>	61,5 <sup>a</sup>	50,8 <sup>a</sup>
Neo. 1†	205,4 <sup>ab</sup>	45,4 <sup>abcd</sup>	57,2 <sup>ab</sup>	43,5 <sup>ab</sup>
Neo. 2†	196,5 <sup>abcd</sup>	53,4 <sup>ab</sup>	55,5 <sup>ab</sup>	44,3 <sup>ab</sup>
Orpi. 2‡	203,7 <sup>abc</sup>	35,4 <sup>e</sup>	58,4 <sup>ab</sup>	48,0 <sup>ab</sup>
Orpi. 3‡	207,4 <sup>a</sup>	43,8 <sup>cde</sup>	58,8 <sup>ab</sup>	45,4 <sup>ab</sup>
Orpi. 4‡	205,4 <sup>ab</sup>	45,3 <sup>abcd</sup>	58,6 <sup>ab</sup>	46,2 <sup>ab</sup>
Orpi. 5‡	191,4 <sup>bcd</sup>	37,3 <sup>de</sup>	57,9 <sup>ab</sup>	44,6 <sup>ab</sup>
Orpi. 6‡	191,6 <sup>bcd</sup>	47,5 <sup>abc</sup>	57,1 <sup>ab</sup>	42,1 <sup>b</sup>
Orpi. 7‡	200,6 <sup>abcd</sup>	42,3 <sup>cde</sup>	57,6 <sup>ab</sup>	46,0 <sup>ab</sup>
Orpi. 8‡	186,2 <sup>d</sup>	39,9 <sup>cde</sup>	56,6 <sup>ab</sup>	47,8 <sup>ab</sup>
Piro. 1†	199,2 <sup>abcd</sup>	36,8 <sup>de</sup>	57,8 <sup>ab</sup>	45,8 <sup>ab</sup>
Piro. 2‡	189,2 <sup>cd</sup>	42,3 <sup>cde</sup>	56,7 <sup>ab</sup>	46,1 <sup>ab</sup>
Piro. 3‡	192,4 <sup>bcd</sup>	40,4 <sup>cde</sup>	57,9 <sup>ab</sup>	44,8 <sup>ab</sup>
Orpi. 9‡	187,8 <sup>d</sup>	54,6 <sup>a</sup>	56,8 <sup>ab</sup>	46,1 <sup>ab</sup>
Piro. 4‡	193,7 <sup>bcd</sup>	38,4 <sup>cde</sup>	58,3 <sup>ab</sup>	48,1 <sup>ab</sup>
Piro. 5‡	185,5 <sup>d</sup>	42,0 <sup>cde</sup>	58,6 <sup>ab</sup>	44,0 <sup>ab</sup>
Piro. 6‡	186,6 <sup>d</sup>	40,8 <sup>cde</sup>	58,7 <sup>a</sup>	44,1 <sup>ab</sup>
Piro. 7‡	193,7 <sup>bcd</sup>	37,8 <sup>cde</sup>	51,3 <sup>b</sup>	44,9 <sup>ab</sup>
FR	209,7	24,1	59,4	48,7

\* Aislados de la costa Caribe colombiana, †aislados de la Sabana de Bogotá, ‡aislados del Valle del Cauca.

Los valores promedios de FR no fueron comparados con los aislados fungales.

Valores medios por columna con diferente letra son significativamente diferentes ( $P < 0,05$ )

Al analizar los datos de producción y acumulación de gas a través del modelo de Gompertz, como se enuncia en la Tabla 2, los aislados fungales presentaron una fase de establecimiento promedio de 23,80 h. Las mayores producciones de gas esperadas (a) tendrían un rango de acumulación de gas entre 206,63 y 207,67 ml/g sustrato. La mayoría de los aislados no presentaron diferencia ( $P > 0,05$ ) en las variables obtenidas

a partir de los parámetros del modelo (FL, HPI, GPI y TMPG). El aislado con la mayor TMPG produce 1,65 ml más de gas por hora que los aislados con menor TMPG. En relación con la HPI, el menor tiempo fue de 30,81 h, en comparación de 48,37 h promedio de los aislados con los valores menores de HPI, observándose una diferencia de 18 h y el GPI presentó una diferencia de 8 mL entre los aislados de mayor y los de menor

**Tabla 2.** Parámetros del modelo de Gompertz para 18 aislados fungales y fluido ruminal (FR) obtenidos a partir de fermentaciones de 120.

Aislado fungal	Parámetro modelo de Gompertz						
	a	b	c	HPI	GPI	TMPG	FL
Orpi. 1*	190,50 <sup>abc</sup>	8,97 <sup>ab</sup>	0,193 <sup>f</sup>	46,10 <sup>ab</sup>	70,07 <sup>abc</sup>	4,07 <sup>d</sup>	28,97 <sup>ab</sup>
Neo. 1†	206,63 <sup>a</sup>	9,37 <sup>ab</sup>	0,233 <sup>abcde</sup>	40,32 <sup>bcd</sup>	76,00 <sup>a</sup>	5,33 <sup>ab</sup>	26,04 <sup>abcd</sup>
Neo. 2‡	201,67 <sup>ab</sup>	8,57 <sup>ab</sup>	0,180 <sup>f</sup>	47,70 <sup>a</sup>	74,20 <sup>ab</sup>	4,03 <sup>d</sup>	28,95 <sup>ab</sup>
Orpi. 2‡	198,83 <sup>abc</sup>	7,77 <sup>b</sup>	0,253 <sup>ab</sup>	30,81 <sup>e</sup>	73,13 <sup>abc</sup>	5,53 <sup>ab</sup>	17,61 <sup>d</sup>
Orpi. 3‡	207,67 <sup>a</sup>	8,63 <sup>ab</sup>	0,223 <sup>cde</sup>	38,64 <sup>bcde</sup>	76,40 <sup>a</sup>	5,10 <sup>abc</sup>	23,67 <sup>bcd</sup>
Orpi. 4‡	206,63 <sup>a</sup>	9,20 <sup>ab</sup>	0,230 <sup>bcde</sup>	40,12 <sup>bcd</sup>	76,03 <sup>a</sup>	5,23 <sup>ab</sup>	25,60 <sup>bcd</sup>
Orpi. 5‡	191,97 <sup>abc</sup>	7,83 <sup>b</sup>	0,243 <sup>abcd</sup>	32,38 <sup>de</sup>	70,63 <sup>abc</sup>	5,13 <sup>abc</sup>	18,61 <sup>d</sup>
Orpi. 6‡	192,73 <sup>abc</sup>	10,03 <sup>ab</sup>	0,237 <sup>abcde</sup>	42,44 <sup>abc</sup>	70,90 <sup>abc</sup>	5,00 <sup>abc</sup>	28,29 <sup>abc</sup>
Orpi. 7‡	201,67 <sup>ab</sup>	8,03 <sup>b</sup>	0,220 <sup>de</sup>	36,59 <sup>cde</sup>	74,20 <sup>ab</sup>	4,90 <sup>bc</sup>	21,35 <sup>bcd</sup>
Orpi. 8‡	186,53 <sup>bc</sup>	8,40 <sup>ab</sup>	0,243 <sup>abcd</sup>	34,43 <sup>cde</sup>	68,63 <sup>bc</sup>	5,03 <sup>abc</sup>	20,71 <sup>bcd</sup>
Piro. 1†	199,47 <sup>abc</sup>	8,33 <sup>ab</sup>	0,260 <sup>a</sup>	32,11 <sup>de</sup>	66,77 <sup>abc</sup>	5,70 <sup>a</sup>	19,21 <sup>cd</sup>
Piro. 2‡	189,9 <sup>abc</sup>	9,17 <sup>ab</sup>	0,247 <sup>abc</sup>	37,29 <sup>cde</sup>	69,87 <sup>abc</sup>	5,13 <sup>abc</sup>	23,71 <sup>bcd</sup>
Piro. 3‡	192,97 <sup>abc</sup>	9,00 <sup>ab</sup>	0,253 <sup>ab</sup>	35,58 <sup>cde</sup>	71,00 <sup>abc</sup>	5,37 <sup>ab</sup>	22,39 <sup>bcd</sup>
Orpi. 9‡	190,13 <sup>abc</sup>	10,60 <sup>a</sup>	0,217 <sup>e</sup>	49,04 <sup>a</sup>	69,93 <sup>abc</sup>	4,53 <sup>cd</sup>	33,54 <sup>a</sup>
Piro. 4‡	194,17 <sup>abc</sup>	8,67 <sup>ab</sup>	0,257 <sup>ab</sup>	33,86 <sup>cde</sup>	71,43 <sup>abc</sup>	5,47 <sup>ab</sup>	20,82 <sup>bcd</sup>
Piro. 5‡	186,07 <sup>bc</sup>	9,47 <sup>ab</sup>	0,253 <sup>ab</sup>	37,22 <sup>cde</sup>	68,43 <sup>bc</sup>	5,20 <sup>abc</sup>	24,09 <sup>bcd</sup>
Piro. 6‡	183,10 <sup>c</sup>	9,23 <sup>ab</sup>	0,243 <sup>abcd</sup>	37,81 <sup>cde</sup>	67,40 <sup>bc</sup>	4,93 <sup>bc</sup>	24,12 <sup>bcd</sup>
Piro. 7‡	194,20 <sup>abc</sup>	8,77 <sup>ab</sup>	0,260 <sup>a</sup>	33,43 <sup>cde</sup>	71,43 <sup>abc</sup>	5,57 <sup>ab</sup>	20,64 <sup>bcd</sup>
FR	210,47	3,4	0,197	17,46	77,43	4,57	0,67

\* Aislados de la costa Caribe colombiana, †aislados de la Sabana de Bogotá, ‡aislados del Valle del Cauca para cada columna, medias con letra diferente son estadísticamente diferentes ( $P < 0,05$ ). Los parámetros analizados fueron: a) máxima producción de gas, b) coeficiente que da forma a la curva, c) tasa de maduración, tiempo al punto de inflexión (HPI,h), gas al punto de inflexión (GPI, mL), tasa máxima de producción de gas (TMPG, ml/h) y fase de establecimiento microbiano (FL, h). Los valores promedios de FR no fueron comparados con los aislados fungales.

acumulación de gas. Así mismo, el tiempo de establecimiento de los aislados osciló entre 18,11 y 33,54 h.

**Degradación de MS y FDN.** La degradación de la MS varió entre 51,3 y 61,5%, como se muestra en la Tabla 1, presentando diferencia ( $P < 0,05$ ) de 8,8% entre los aislados con las mayores degradaciones y el de menor degradación. Al utilizar fluido ruminal como inóculo la degradación de la MS

fue de 59,39%. El porcentaje de degradación de FDN, presentado en la Tabla 1, mostró una diferencia ( $P < 0,05$ ) de 8,7% entre las medias del aislado con mayor y con menor degradación.

**Actividad enzimática.** Los valores obtenidos para las diferentes actividades enzimáticas por cada aislado fungal se enuncian en la Tabla 3. La actividad CMCasa osciló entre 7,07 y 9,56 UI y la mayoría de aislados

**Tabla 3.** Actividades enzimáticas (UI) carboximetilcelulasa (CMCasa), celulasa microcristalina y xilanasa de 18 aislados fungales y fluido ruminal (FR)

Aislado	CMCasa (UI*)	Celulasa microcristalina (UI)	Xilanasa (UI)
<b>Orpi. 1*</b>	8,06 <sup>ab</sup>	1,09 <sup>abc</sup>	300,24 <sup>ab</sup>
<b>Neo. 1†</b>	7,07 <sup>b</sup>	0,67 <sup>abcd</sup>	281,86 <sup>ab</sup>
<b>Neo. 2†</b>	9,56 <sup>a</sup>	0,33 <sup>cd</sup>	232,86 <sup>c</sup>
<b>Orpi. 2‡</b>	8,77 <sup>ab</sup>	0,73 <sup>abcd</sup>	274,26 <sup>abc</sup>
<b>Orpi. 3‡</b>	7,62 <sup>ab</sup>	0,19 <sup>d</sup>	302,38 <sup>a</sup>
<b>Orpi. 4‡</b>	8,70 <sup>ab</sup>	0,48 <sup>cd</sup>	303,12 <sup>a</sup>
<b>Orpi. 5‡</b>	9,01 <sup>ab</sup>	0,95 <sup>abcd</sup>	262,08 <sup>abc</sup>
<b>Orpi. 6‡</b>	8,44 <sup>ab</sup>	0,43 <sup>cd</sup>	296,62 <sup>ab</sup>
<b>Orpi. 7‡</b>	7,72 <sup>ab</sup>	0,48 <sup>cd</sup>	273,42 <sup>abc</sup>
<b>Orpi. 8‡</b>	7,16 <sup>b</sup>	0,12 <sup>d</sup>	270,74 <sup>abc</sup>
<b>Piro. 1‡</b>	8,43 <sup>ab</sup>	0,40 <sup>cd</sup>	273,38 <sup>abc</sup>
<b>Piro. 2‡</b>	8,69 <sup>ab</sup>	0,49 <sup>cd</sup>	286,28 <sup>ab</sup>
<b>Piro. 3‡</b>	9,09 <sup>ab</sup>	0,51 <sup>bcd</sup>	233,06 <sup>c</sup>
<b>Orpi. 9‡</b>	8,37 <sup>ab</sup>	0,60 <sup>abcd</sup>	286,78 <sup>ab</sup>
<b>Piro. 4‡</b>	7,86 <sup>ab</sup>	0,67 <sup>abcd</sup>	278,60 <sup>abc</sup>
<b>Piro. 5‡</b>	7,78 <sup>ab</sup>	0,40 <sup>cd</sup>	252,72 <sup>bc</sup>
<b>Piro. 6‡</b>	7,72 <sup>ab</sup>	1,39 <sup>a</sup>	297,72 <sup>ab</sup>
<b>Piro. 7‡</b>	8,06 <sup>ab</sup>	1,32 <sup>ab</sup>	281,18 <sup>ab</sup>
<b>FR</b>	3,22	0,93	33,66

\* Aislados de la costa Caribe colombiana, †aislados de la Sabana de Bogotá, ‡aislados del Valle del Cauca.

Los valores promedios de FR no fueron comparados con los aislados fungales. Valores medios por columna con diferente letra son significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ).

\* UI=  $\mu$ moles de azúcares reductores liberados min/ml de producto enzimático no diluido, bajo las condiciones del ensayo.

no mostraron diferencias entre sí. Se observó una diferencia ( $P < 0,05$ ) de 2,45 UI entre el aislado con la mayor actividad y los de menor actividad. La actividad celulasa microcristalina osciló entre 0,12 y 1,39 UI, con una diferencia entre el aislado con mayor actividad y los aislados con menor actividad de 1,24 UI (89%). Para efectos comparativos, la actividad celulasa microcristalina observada cuando se usó como inóculo fluido ruminal fue de 0,93 UI, lo cual sitúa a este inóculo

en un punto intermedio superior entre todos los aislados evaluados. El rango de actividad xilanasa fluctuó entre 232,86 y 302,75 UI, encontrándose una diferencia ( $P < 0,05$ ) de 70 UI entre los aislados de mayor y menor actividad.

**Ácidos grasos volátiles.** La acumulación de AGV enunciada en la Tabla 4 fue similar para la mayoría de los aislados y varió para el ácido acético entre 15,41 y 21,86 mM; para el ácido propiónico entre 1,11 y

Tabla 4. Perfil de producción de ácidos grasos volátiles en concentración molar (mM) por 18 aislados fungales y fluido ruminal (FR)

Aislado fungal	Concentración (mM)				
	Acético	Propiónico	Butírico	Isobutírico	AGV totales
Orpi. 1*	15,41 <sup>b</sup>	1,01 <sup>ab</sup>	0,49 <sup>b</sup>	0,20	17,10 <sup>b</sup>
Neo. 1 <sup>†</sup>	21,03 <sup>a</sup>	0,97 <sup>ab</sup>	0,48 <sup>b</sup>	0,18	22,67 <sup>a</sup>
Neo. 2 <sup>†</sup>	19,04 <sup>ab</sup>	0,90 <sup>b</sup>	0,47 <sup>b</sup>	0,17	20,58 <sup>ab</sup>
Orpi. 2 <sup>‡</sup>	20,30 <sup>a</sup>	0,92 <sup>b</sup>	0,47 <sup>b</sup>	0,17	21,86 <sup>a</sup>
Orpi. 3 <sup>‡</sup>	21,32 <sup>a</sup>	0,96 <sup>ab</sup>	0,49 <sup>b</sup>	0,17	22,94 <sup>a</sup>
Orpi. 4 <sup>‡</sup>	20,93 <sup>a</sup>	0,94 <sup>ab</sup>	0,48 <sup>b</sup>	0,17	22,51 <sup>a</sup>
Orpi. 5 <sup>‡</sup>	20,05 <sup>a</sup>	1,11 <sup>a</sup>	0,60 <sup>a</sup>	0,19	21,95 <sup>a</sup>
Orpi. 6 <sup>‡</sup>	19,67 <sup>a</sup>	0,96 <sup>ab</sup>	0,47 <sup>b</sup>	0,18	21,29 <sup>ab</sup>
Orpi. 7 <sup>‡</sup>	20,00 <sup>a</sup>	0,93 <sup>b</sup>	0,46 <sup>b</sup>	0,16	21,55 <sup>a</sup>
Orpi. 8 <sup>‡</sup>	19,14 <sup>ab</sup>	0,92 <sup>b</sup>	0,48 <sup>b</sup>	0,17	20,71 <sup>ab</sup>
Piro. 1 <sup>‡</sup>	21,18 <sup>a</sup>	0,96 <sup>ab</sup>	0,47 <sup>b</sup>	0,17	22,78 <sup>a</sup>
Piro. 2 <sup>‡</sup>	21,14 <sup>a</sup>	0,97 <sup>ab</sup>	0,47 <sup>b</sup>	0,16	22,74 <sup>a</sup>
Piro. 3 <sup>‡</sup>	21,63 <sup>a</sup>	0,99 <sup>ab</sup>	0,48 <sup>b</sup>	0,17	23,27 <sup>a</sup>
Orpi. 9 <sup>‡</sup>	21,23 <sup>a</sup>	0,98 <sup>ab</sup>	0,47 <sup>b</sup>	0,16	22,84 <sup>a</sup>
Piro. 4 <sup>‡</sup>	21,86 <sup>a</sup>	0,99 <sup>ab</sup>	0,47 <sup>b</sup>	0,16	23,49 <sup>a</sup>
Piro. 5 <sup>‡</sup>	20,65 <sup>a</sup>	0,98 <sup>ab</sup>	0,47 <sup>b</sup>	0,16	22,26 <sup>a</sup>
Piro. 6 <sup>‡</sup>	21,10 <sup>a</sup>	0,99 <sup>ab</sup>	0,47 <sup>b</sup>	0,16	22,72 <sup>a</sup>
Piro. 7 <sup>‡</sup>	21,77 <sup>a</sup>	1,01 <sup>ab</sup>	0,47 <sup>b</sup>	0,16	23,42 <sup>a</sup>
FR	32,07	17,54	5,01	0,96	55,57

\*Aislados de la costa Caribe colombiana, <sup>†</sup>aislados de la Sabana de Bogotá, <sup>‡</sup>aislados del Valle del Cauca.

Los valores promedios de FR no fueron comparados con los aislados fungales.

Valores medios por columna con diferente letra son significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ).

0,90 mM; para el ácido butírico entre 0,46 y 0,60 mM, y para el ácido isobutírico entre 0,16 y 0,20 mM; siendo el ácido acético el principal AGV producido. Como referencia la producción de ácido acético, propiónico, butírico e isobutírico observada con fluido ruminal fue de 32,07, 17,54, 5,01 y 0,96 mM respectivamente, obteniendo una producción total de AGV de 55,57 mM, 34 mM más que el promedio de los 18 aislados fungales.

La producción de AGV en proporción molar (datos no mostrados), presentó poca variabilidad entre la mayoría de los aislados, con excepción de un aislado que presentó diferencia en la proporción de todos los AGV respecto a los demás.

**Selección de aislados.** Los datos obtenidos con las 12 variables se analizaron usando el procedimiento de factores principales de SAS. Se tomaron siete factores con los cuales se predijo el 93,06% de la variabili-

dad del conjunto de datos originales. Posteriormente, se realizó el análisis de conglomerados a partir del cual se seleccionaron doce grupos, dentro de los cuales se realizó un proceso de selección a fin de identificar cinco aislados. El método utilizado consistió en la comparación de medias para cada una de las variables incluidas dentro del estudio, utilizando como criterio la mayor diversidad en los parámetros evaluados, con especial atención en la degradación de FDN y en la actividad enzimática. Cuatro de los cinco aislados presentaron los mayores valores para las diferentes variables (degradaciones,

producción de gas, actividades enzimáticas, producción de AGV), y uno de ellos representó los valores promedio de todos los aislados. De los cinco aislados seleccionados dos pertenecían al género *Orpinomyces*, uno obtenido de un animal de la región Caribe y el otro de la región del Valle del Cauca, dos del género *Piromyces*, aislados de animales de la región del Valle del Cauca, y un *Neocallimastix*, aislado de un animal de la Sabana de Bogotá. Los valores de las diferentes variables de cada uno de los aislados seleccionados se enuncian en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Caracterización de los aislados fungales seleccionados como promisorios a partir del análisis de conglomerados

	<b>Orpi. 1</b>	<b>Neo. 1</b>	<b>Orpi. 2</b>	<b>Piro. 2</b>	<b>Piro. 7</b>	<b>Promedio<sup>1</sup></b>
<b>Producción de gas</b>						
Prod gas 120 h (mL)	187,7	205,4	203,7	189,2	193,7	<b>58,49</b>
Hora a la mitad de prod gas	52,00	45,42	35,40	42,25	37,83	<b>43,08</b>
<b>Degradaciones</b>						
Degradación MS (%)	61,54	57,24	58,41	56,73	51,34	<b>57,52</b>
Degradación FDN (%)	50,80	43,45	48,00	46,12	44,91	<b>45,69</b>
<b>Actividades enzimáticas</b>						
Actividad CMCasa (UI)	8,06	7,07	8,77	8,69	8,06	<b>8,23</b>
Actividad MICROCasa (UI)	1,09	0,67	0,73	0,49	1,32	<b>0,63</b>
Actividad XILANasa (UI)	300,24	281,86	274,25	286,27	281,17	<b>277,07</b>
<b>Ácidos grasos volátiles</b>						
AGV totales (mM)	17,10	22,67	21,86	22,74	23,42	<b>22,04</b>
Acético (mM)	15,41	21,03	20,30	21,14	21,77	<b>20,41</b>
Propiónico (mM)	1,01	0,97	0,92	0,97	1,01	<b>0,97</b>

<sup>1</sup> Valores promedio de todos los aislados evaluados en este estudio.

## DISCUSIÓN

Tiempos similares de establecimiento de aislados fungales ruminales a los encontrados en este estudio fueron reportados por Mayorga (22) (20 horas) y por Theodorou *et al* (23) (23-27 h) en aislados del género *Neocallimastix*. Así mismo, Li y Heath (24) y Ho *et al* (25), reportaron una fase de establecimiento de 24 horas en estudios con aislados fungales monocéntricos de los géneros *Neocallimastix*, *Piromyces* y *Caecomyces*, utilizando diferentes sustratos de crecimiento. Sin embargo, aun cuando el tiempo de establecimiento y desarrollo de los aislados fungales ruminales es lento, en comparación con la población bacteriana, diferencias de 15 horas de adaptación entre aislados de este estudio sugieren que algunos de los aislados fungales evaluados presentan características metabólicas especiales que les permiten adaptarse más rápidamente a sustratos altamente fibrosos (FDN  $\approx$  80%). De igual forma, la variación entre aislados en la acumulación de gas, mostrada por la diferencia de 17 horas en el tiempo requerido para llegar a la mitad de la producción de gas, demuestra también la variabilidad en la actividad sobre el sustrato entre aislados una vez éstos se han establecido. Estas diferencias se presentan entre géneros y dentro de géneros fungales como lo reportan Sijtsma y Tan (26) y Paul *et al* (9), y son confirmadas en nuestro estudio ya que los aislados con menor y mayor tiempo de adaptación corresponden al género *Orpinomyces*, y fueron obtenidos de animales de la misma zona agroecológica (Valle del Cauca).

Al analizar los valores de FL, HPI, GPI y TMPG obtenidos con el modelo de Gompertz se puede observar que los aislados con menor FL y HPI, no acumulan la mayor cantidad de gas al lograr este punto, ni tampoco presentan las mayores TMPG; así mismo, los aislados con una FL más pro-

longada tampoco muestran la menor TMPG ni GPI, lo cual indica que aunque un aislado requiera de un menor tiempo de adaptación a un sustrato, no necesariamente logra la mayor acumulación de gas, el mayor valor de TMPG, ni tampoco mantener esa tasa a través del tiempo.

En este trabajo, en la degradación de la MS y del FDN se obtuvieron valores similares a los reportados por otros autores, como Akin *et al* (27), con valores para tallos de pasto Bermuda (*Cynodon dactylon*) de 45%, y de las hojas del mismo de 70%. Así mismo, Theodorou *et al* (23) reportaron degradación del 50% de la pared celular de heno de ryegrass y Joblin y Williams (28), y degradaciones de 37% en tallos de alfalfa. Para algunos aislados del presente estudio, la degradación de FDN representó el 85% de la MS degradada, mientras que para otros solamente representó el 75%. Aunque estos valores en general son altos, estas variaciones generaron una correlación baja ( $r^2=0,16$ ) entre los valores de desaparición de MS y de FDN. Tampoco se encontró correlación positiva entre la degradación de la MS, y la degradación del FDN con la acumulación de gas, ni con el tiempo para alcanzar la mitad de la producción de gas, lo que sugiere que aunque los procesos de desaparición de MS y de aparición de gas están relacionados, no están vinculados por relaciones lineales como lo sugiere Williams (29).

El análisis de las actividades enzimáticas obtenidas con los 18 aislados permite confirmar la afinidad de los aislados fungales anaerobios por la degradación de la fibra observada en éste y otros ensayos (11, 12, 30, 31). La actividad CMCasa (endocelulasa) obtenida con cualquiera de los aislados fungales fue muy superior a la obtenida cuando se usó el fluido ruminal completo como inóculo, cuya actividad fue solamente de 3,22 UI, menos del 50% de lo observado con el hongo de menor actividad CMCasa. La ac-

tividad enzimática celulosa microcristalina (exocelulasa) presentó los menores valores entre todas las actividades evaluadas en este experimento, lo cual puede obedecer a la naturaleza recalcitrante de esta celulosa. Debe recordarse que los sustratos celulósicos y hemicelulósicos a los cuales normalmente están enfrentados los microorganismos ruminales en nuestras condiciones tropicales no son de tan difícil degradación, ni tan homogéneos en su estructura química como la celulosa microcristalina, donde el ataque enzimático solo sucede en los extremos de la molécula.

A diferencia de la actividad celulolítica, la actividad xilanolítica mostró los mayores valores. En promedio, los 18 aislados presentaron una actividad 7,5 veces mayor (277 UI) a la observada con el inóculo de fluido ruminal (36,7 UI). Esto corrobora las observaciones de Mayorga *et al* (32), quienes reportaron con el hongo *Neocallimastix frontalis* NFT 101 una actividad endoxilanolítica 100 y 1000 veces mayor a la actividad CMCasa y exopoligalacturonasa, respectivamente. Por su parte, Barahona *et al* (33) reportaron valores de actividades enzimáticas alrededor de 109 UI de CMCasa, y de unos 350 UI de xilanasa a partir de un extracto puro del hongo anaeróbico *Neocallimastix hurleyensis*. Así mismo, Paul *et al* (9) reportaron que el extracto crudo obtenido de la fermentación de un hongo aislado del toro azul salvaje (*Boselaphus tragocamelus*) presentó una actividad enzimática CMCasa de 75 UI y xilanasa de 367,5 UI. Sin embargo, otros autores como Tripathi *et al* (34) reportan actividades enzimáticas CMCasa al rededor del doble que las actividades xilanasa en aislados fungales de toro azul salvaje.

Aun cuando la degradación del sustrato (MS y FDN) fue similar para los aislados puros y para el inóculo con FR, la acumulación de AGV difirió en 34 mM menos para los aislados fungales. Esta diferencia

puede deberse a que no fue cuantificada la acumulación de ácido fórmico, el cual puede representar valores cercanos al 50% de los AGV totales, como lo reporta Mayorga (22), cuando el hongo crece sobre sustratos fibrosos.

Al analizar cada uno de los AGV respecto a su proporción molar, se encontró que el comportamiento del único aislado proveniente de la costa Caribe colombiana (Orpi. 1) difirió de los demás. La proporción de ácido acético fue menor ( $P < 0,05$ ) a la de los demás aislados, y la proporción de los demás AGV cuantificados (propiónico, butírico e isobutírico) fue mayor; a su vez, este aislado fue el de menor producción de gas, pero el que obtuvo las mayores degradaciones de MS y FDN (61,54 y 50,80%, respectivamente), sugiriendo características metabólicas especiales.

Es importante tener en cuenta que en los cultivos puros de hongos, además de los compuestos gaseosos ( $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2$ ) y de los AGV, se produce etanol y los ácidos fórmico, láctico y succínico (35, 24, 36, 37, 38), algunos de los cuales incorporan hidrógeno del medio durante el transcurso de las vías metabólicas en las que son intermediarios o productos finales (37,38), éstos no son cuantificados a través de la medición de la producción de gas. Por tanto, la producción de gas no siempre sería un indicativo preciso de la actividad real del hongo sobre el sustrato. Así mismo, Brown *et al* (39) reportan que en fermentaciones en las cuales se produce mayor cantidad de ácido propiónico, la producción de gas que se mantiene para ser cuantificado es menor.

## CONCLUSIONES

Aun cuando los parámetros del modelo exponencial de Gompertz son un indicativo del comportamiento individual de cada aislado fungal, y nos permiten predecir para una hora específica la producción de gas

esperada; para efectos prácticos de selección se deben tener en cuenta todos los parámetros obtenidos en conjunto, además de otros de mayor relevancia biológica, como la degradación del sustrato (MS y FDN), y las actividades enzimáticas.

Con base en las observaciones de acumulación de gas de los diferentes aislados, la comparación de la actividad enzimática y las degradaciones debe realizarse no solamente en el punto final de la fermentación, sino en puntos intermedios, lo cual permitirá caracterizar la dinámica temporal de las mismas para cada uno de los aislados, y obtener las relaciones entre las actividades y la degradación de la MS y del FDN, la producción de gas y, de ser posible, tener en cuenta el crecimiento del hongo.

Todos los aislados fungales mostraron una especialización hacia la degradación de hemicelulosa, ya que la mayor actividad enzimática observada fue la xilanolítica (277 UI en promedio), la cual presentó valores 34 veces mayores que la actividad CMCasa, y 440 veces mayores que la actividad observada sobre celulosa microcristalina. La actividad xilanasas en relación con la presentada por el inóculo mixto de FR fue 34 veces mayor.

Se recomienda, en estudios posteriores, la evaluación de diferentes sustratos para el crecimiento fangal, y la evaluación de las actividades enzimáticas de los extractos producidos con los mismos. Así mismo, se sugiere la inclusión de pruebas para evaluar la actividad de remoción de lignina de estos aislados, a fin de poder asociarla con las degradaciones de FDN observadas en los mismos.

## AGRADECIMIENTOS

A la International Fundation for Science (IFS) por los recursos aportados para el desarrollo de esta investigación.

## REFERENCIAS

1. Fitzhugh HA, Hodgson HJ, Scoville OJ, Nguyen TD, Byerley TC. The role of ruminants in support of man: Winrock Report. Morrilton (ARK): Winrock Foundation; 1978.
2. Wilkins RJ. Forages and their role in animal systems. En: Givens DI, Owen E, Axford RFE, Omed HM, editores. Forage evaluation in ruminant nutrition. Oxford: CABI, Publishing; p. 1-14; 2000.
3. McSweeney CS, Dalrymple BP, Gobius KS, Kennedy PM, Krause DO, Mackie RI, *et al* The application of rumen biotechnology to improve the nutritive value of fibrous feeds-tuffs: pre- and post-ingestion. Livestock Production Science; 59:265-283; 1999.
4. Varga GA, Kolver ES. Microbial and animal limitations to fiber digestion and utilization. Conference: New Developments in Forage Science Contributing to Enhanced Fiber Utilization by Ruminants. J Nutr; 127:819S-823S; 1997.
5. Minson DL. Forage in Ruminant Nutrition, San Diego (CA): Academic Press; 1990.
6. Jung HG, Deetz DA. Cell wall lignification and degradability. En: Jung HG, Buxton DR, Hatfield RD, Ralph J, editores. Forage cell wall structure and digestibility. Madison: American Society of Agronomy; p. 315-346; 1993.
7. Wilson JR. Organization of forage plant tissues. En: Jung H, Buxton DR, Hatfield RD, Ralph J, editores. Forage cell wall structure and digestibility. Madison: American Society of Agronomy; p. 1-32; 1993.
8. Selinger LB, Forsberg CW, Cheng K-J. The rumen: A unique source of enzymes for enhancing livestock production. Anaerobe; 2:263-284; 1996.
9. Paul SS, Kamra DN, Sastry VRB, Sahu NP, Agarwal N. Effect of administration of an anaerobic gut fungus isolated from wild blue bull (*Boselaphus tragocamelus*) to buffaloes (*Bubalus bubalis*) on in vivo ruminal fermentation and digestion of nutrients. Anim Fd Sci Technol; 115:143-157; 2004.

10. Lee SS, Choi CK, Ahn BH, Moon YH, Kim CH, Ha JK. *In vitro* stimulation of rumen microbial fermentation by a rumen anaerobic fungal culture. *Anim Fd Sci Technol*; 115:215-226; 2004.
11. Akin E, Borneman W. Role of rumen fungi in fiber degradation. *J Dairy Sci*; 73:3023-3032; 1990.
12. Bauchop T. Rumen anaerobic fungi of cattle and sheep. *Appl Environ Microbiol*; 38:148-158; 1979.
13. Theodorou M, Williams B, Dhanoa M, McAllan A, France J. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim Fd Sci Technol*; 48:185-197; 1994.
14. Zullinger E, Ricklefs R, Redford K, Mace G. Fitting sigmoidal equations to mammalian growth curves. *J Mamm*; 65:607-636; 1984.
15. Begall S. The application of the Gompertz model to describe body growth. *Growth, Development & Aging*; 61:61-67; 1997.
16. Van Soest PJ, Wine RH. Use of detergents in the analysis of fibrous feed. IV The determination of plant cell wall constituents. *J Assoc Off Agr Chem*; 50:50-55; 1967.
17. Zhu WY, Theodorou MK, Nielsen BB, Trinci APJ. Dilution rate increases production of plant cell-wall degrading enzymes by anaerobic fungi in continuous-flow culture. *Anaerobe*; 3:49-59; 1996.
18. Ghangas GS, Hu Y-J, Wilson DB. Cloning of a *Thermomonospora fusca* xylanase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Streptomyces lividans*. *J Bacteriol*; 171:2963-2969; 1989.
19. Somogyi N. Notes on sugar determination. *J Biol Chem*; 195:19-23; 1952.
20. Beauchemin K. A proposed methodology to standardize the determination of enzymic activities present in enzyme additives used in ruminant diets. *Can J Anim Sci*; 83:559-568; 2003.
21. Leedle J, Paulissen J. Factors affecting the *in vitro* production of VFA by mixed bacterial population from the bovine rumen. *J Anim Sci*; 67:1593-1602; 1989.
22. Mayorga OL. Estudio y caracterización del complejo de enzimas degradadoras de la pared celular producidas por el hongo anaeróbico ruminal *Neocallimastix frontalis*. [tesis maestría]. Bogotá: Univ. Nacional de Colombia; 2002.
23. Theodorou MK, Longland AC, Dhanoa MS, Lowe SE, Trinci APJ. Growth of *Neocallimastix* sp. strain R1 on Italian ryegrass hay: removal of neutral sugars from plant cell walls. *Appl Environ Microbiol*; 55:1363-1367; 1989.
24. Li J, Heath I. *Chytridiomycetous* gut fungi, oft overlooked contributors to herbivore digestion. *Can J Microbiol*; 39:1003-1013; 1993.
25. Ho W, Wong M, Abdullan N, Kudo H, Jalaludin S. Fermentation activities of some new species of anaerobic rumen fungi from Malaysia. *J Gen Appl Microbiol*; 42:51-59; 1996.
26. Sijtsma L, Tan B. Degradation and utilization of grass cell walls by anaerobic fungi isolated from yak, llama and sheep. *Anim Fd Sci Technol*; 44:221-236; 1993.
27. Akin DE, Borneman WS, Windham WR. Degradation of leaf blades and stems by monocentric and polycentric isolates of ruminal fungi. *Anim Fd Sci Technol*; 31:205-221; 1990.
28. Joblin K, Williams A. Effect of cocultivation of ruminal chytrid fungi with *Methanobrevibacter - smithii* on lucerne stem degradation and extracellular fungal enzyme activities. *Lett Appl Microbiol*; 12:121-124; 1991.
29. Williams B A. Cumulative gas production – techniques for forage evaluation. En: Givens DI, Owen E, Axford RFE, Omed HM, editores. *Forage evaluation in ruminant nutrition*. Oxford: CABI, Publishing; p. 189-213; 2000.
30. Bauchop T. The anaerobic fungi in rumen fiber digestion. *Agric Environ*; 6:339; 1981.
31. Munn EA, Orpin CG, Hall FJ. Ultrastructural studies of the free zoospore of the rumen

- phycomycete *Neocallimastix frontalis*. J Gen Microbiol; 125:311; 1981.
32. Mayorga OL, López E, Díaz T, Barahona R. Efecto de la fuente de carbono y el tipo de inóculo sobre la producción de enzimas hidrolíticas del hongo anaeróbico ruminal *Neocallimastix frontalis* NFT 101. Revista Corpoica; 6:12-19; 2005.
  33. Barahona R, Sanchez S, Lascano C, Owen E, Morris P, Theodorou M. Effect of condensed tannins from tropical legumes on the activity of fibrolytic enzymes from the rumen fungus *Neocallimastix hurleyensis*. Enzyme Microb Technol; 39:281-288; 2006.
  34. Tripathi V, Sehgal J, Puniya A, Singh K. Hydrolytic activities of anaerobic fungi from wild blue bull (*Boselaphus tragocamelus*). Anaerobe. In press.
  35. Borneman WS, Akin D E, Ljungdahl LG. Fermentation products and plant cell wall degrading enzymes produced by monocentric and polycentric anaerobic ruminal fungi. Appl Environ Microbiol; 55:1066-1073; 1989.
  36. Phillips M, Gordon G. Carbohydrate fermentation by three species of polycentric ruminal fungi from cattle and water buffalo in tropical Australia. Anaerobe; 1:41-47; 1995.
  37. Orpin CG, Joblin KN. The rumen anaerobic fungi. En: Hobson PN, editor. The rumen microbial ecosystem. 2 ed. Londres: Blackie Academic & Professional Press; p. 140-189; 1997.
  38. Russel J. Rumen microbiology and its role in ruminant nutrition. Ithaca (NY): Russel Publishing Co.; 2002.
  39. Brown V, Rymer C, Agne, R, Givens D. Relationship between in vitro gas production profiles of forages and in vivo rumen fermentation patterns in beef steers fed those forages. Anim Fd Sci Technol; 98:13-24; 2002.