

ARTÍCULO CIENTÍFICO

Olga Lucía Mayorga¹,
Elizabeth López R²,
Tito Efraín Díaz³ y
Rolando Barahona¹

ABSTRACT

Title: Growth and hydrolytic enzyme production of the anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis* NFT 101 influenced by carbon sources and two kinds of inoculation

The growth and hydrolytic enzyme production of the anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*, strain NFT 101, isolated from the rumen of an ovine from a tropical ecosystem, was evaluated over a range of carbon sources and using two forms of inoculation. When a zoospore suspension was used as inoculum, the fungus showed growth on xylose, carboxymethylcellulose, powder cellulose, citric pectin, cotton, filter paper and oat straw. No growth was observed on arabinose, xylan or apple pectin. When a colonized straw fragment was used as inoculum, the fungus was able to grow on all carbon sources, with the exception of arabinose. The fungus expressed a complex of hydrolytic enzymes (endoxyylanase, endoglucanase and exopolysaccharidase), which were mainly secreted to the culture medium. However, significant enzymatic activities were observed in the fungal wall fractions, especially that of endoglucanase. The greatest enzymatic activity was that of endoxyylanase, which was around 100 times greater than that of endoglucanase and 1000 higher than those of exoglucanase and exopolysaccharidase. Hydrolytic activities appeared to be constitutive, but enzymatic activity was affected by the type of carbon source and in a lesser degree, by the type of inoculum used. The highest enzymatic activities and fungi growth were found in filtrates from cultures grown on cellulose powder, filter paper, oat straw and xylan, after a period of adaptation.

Key words: anaerobic ruminal fungi, hydrolytic enzymes, endoxyylanase, endoglucanase, exopolysaccharidase.

Recibido: noviembre 30 de 2004.
Aceptado: mayo 2 de 2005.

1. Programa Nacional de Fisiología y Nutrición Animal, CORPOICA, A.A. 240142-Las Palmas, Bogotá. e-mail: lmayorga@corpoica.org.co

2. Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Ciudad Universitaria, Bogotá

3. Subdirección de Investigación Estratégica, CORPOICA, A.A. 240142-Las Palmas, Bogotá.

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

RESUMEN

El crecimiento y producción de enzimas del hongo anaeróbico *Neocallimastix frontalis* NFT 101, aislado del rumen de un ovino de un ecosistema tropical fue evaluado en un rango de fuentes de carbono y variando la forma de inoculación (estados mótil y vegetativo). Cuando se usó una suspensión de zoosporas (estado mótil) como inóculo, el hongo creció sobre xilosa, carboximetilcelulosa, celulosa en polvo, algodón, papel de filtro, pectina cítrica y heno de avena, pero no creció sobre arabinosa, xilano y pectina de manzana. Al inocular con fragmento de heno colonizado (estado vegetativo) hubo crecimiento en todas las fuentes de carbono con excepción de arabinosa. El complejo de enzimas hidrolíticas de este hongo incluyó endoxilanasas, endoglucanasas y exopoligalacturonasas, las que fueron liberadas principalmente al medio de cultivo, aunque se detectó actividad significativa de estas enzimas en la fracción asociada a la pared fungal, especialmente en el caso de la endoglucanasa. La principal actividad enzimática observada fue endoxilanolítica, que fue unas 100 y 1.000 veces mayor a la de endoglucanasa y exopoligalacturonasa, respectivamente. La producción de enzimas hidrolíticas fue constitutiva, pero al igual que el patrón de fermentación, la actividad fue regulada por la fuente de carbono usada en el medio de crecimiento y en menos medida por el estado de desarrollo fungal del inóculo. Dentro de las fuentes de carbono evaluadas las que presentaron un mejor balance entre la actividad enzimática y el crecimiento fungal fueron la celulosa en polvo, el heno de avena, el papel filtro y el xilano, previo proceso de adaptación.

Palabras clave: hongos anaeróbicos ruminales, enzimas hidrolíticas, endoxilanasas, endoglucanasa, exopoliglucanasa.

INTRODUCCIÓN

LOS HONGOS RUMINALES SON simbioses del tracto gastrointestinal de los rumiantes y los únicos hongos con características anaeróbicas descritos hasta el momento. Son los primeros en colonizar sustratos lignocelulósicos y su población y actividad enzimática alcanzan la máxima expresión en dietas ricas en alimentos altamente fibrosos, que pueden llegar a digerir hasta en 70% (Bauchop, 1979). Lo anterior es relevante para condiciones tropicales como las de Colombia, ya que la mayor parte de la base forrajera utilizada para la alimentación de los rumiantes se caracteriza por una baja calidad nutritiva. La habilidad de los microorganismos fibrolíticos para degradar sustratos lignocelulósicos depende de la composición del complejo enzimático, las actividades específicas individuales, la localización, la inducibilidad de las enzimas y la afinidad al sustrato insoluble (Hodrová y col, 1998). Los hongos tienen la capacidad enzimática

de hidrolizar la celulosa, el xilano y sólo algunas especies hidrolizan pectina (Hébraud y Fèvre, 1988). La actividad enzimática frente a estos sustratos varía según su origen filogenético, en especial, por su estructura rizoidal; no obstante, se ha postulado que algunas especies como *Neocallimastix frontalis*, *Piromyces communis* y *Orpinomyces joyonii* son tanto o incluso más eficientes en la digestión de los polisacáridos estructurales que las especies bacterianas celulolíticas más activas (Borneman y Akin, 1990).

Trabajos previos han mostrado que existen diferencias en la expresión enzimática y en el crecimiento fungal de acuerdo con la fuente de carbono (Dijkerman y col., 1997; Teunissen y col.; 1992; Williams y Orpin, 1987; Yanke y col., 1996; Ho y col., 1996; Mountfour y Asher, 1983; y Lowe y col., 1987). Además, la síntesis de glicosil hidrolasas por bacterias y hongos ruminales es inducible ante la presencia de la celulosa y la hemicelu-

losa, a la vez que se ve inhibida por los monosacáridos (Bera y col., 1998), aunque existen reportes que contradicen estos efectos, especialmente en el caso de los hongos ruminales (Gardner y col., 1995).

Williams y Orpin (1987) mostraron que los hongos *Neocallimastix patriciarum* y *Piromonas communis* crecen sobre un amplio rango de polisacáridos y presentan un espectro de actividades enzimáticas, tanto en el estado vegetativo como en las zoosporas. Las glicosidasas hemicelulolíticas (α -L-arabinofuranosidasa, β -D-xilosidasa) son más activas cuando el medio de crecimiento posee xilano, mientras que las α/β -glucosidasas se detectaron sobre maltosa o almidón. A su vez, la actividad de α -glucosidasa del *P. communis* fue muy baja o no detectable cuando el estado vegetativo creció sobre glucosa, β -glucanos, celobiosa y celulosa. Además, los patrones de expresión enzimática fueron iguales para todos los sustratos, lo que sugirió que las pequeñas diferencias podían deberse a la secreción de algunas isoenzimas (Dijkerman y col., 1997; Teunissen y col., 1992; Borneman y col., 1989). Ho y col. (1996) reportaron que cuando los hongos ruminales *Neocallimastix variabilis*, *Piromyces spiralis*, *P. minutus*, y *Caecomyces* crecieron sobre paja y papel filtro; las principales actividades enzimáticas fueron: xilanasa > CMCasa > FTPasa (actividad sobre papel de filtro) en el caso del medio con paja y CMCasa > xilanasa > FTPasa en el caso del papel filtro.

Esta variabilidad en la expresión enzimática según fuentes de carbono puede estar asociada a factores como la capacidad de adaptación y utilización del hongo sobre la fuente de carbono y su estado de desarrollo. En el presente estudio, se exploró la capacidad del aislado fungal *Neocallimastix frontalis* NFT 101 para usar diferentes fuentes de carbono, empleando dos formas de inoculación: estado mótil (suspensión de zoosporas) y estado vegetativo (fragmento de heno colonizado). Adicionalmente, se midió la expresión enzimática y su distribución en tres fracciones: la extracelular, la asociada con las paredes fungal y citosólica.

Materiales y métodos

Selección del hongo anaerobio ruminal. Para realizar el presente estudio, se seleccionó el aislado *Neocallimastix frontalis*, identificado con el código H10001, referencia NFT 101 perteneciente al Banco de germoplasma de microorganismos

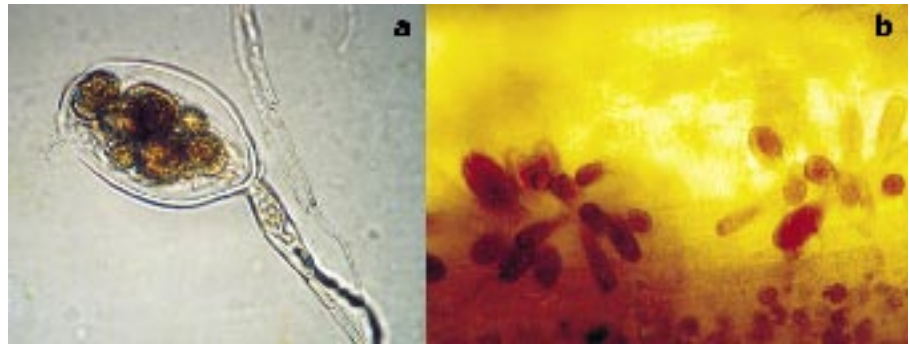


Figura 1. Fotografía de *Neocallimastix frontalis* NFT 101: a. Esporangio maduro; b. Esporangios creciendo sobre heno de avena (fotografías cedidas por la Dra. Elizabeth Martín).

de CORPOICA (Figura 1). Este hongo fue aislado del rumen de un ovino de la raza Black Face X Criollo que se encontraba pastoreando una pradera de *Pennisetum clandestinum* (kikuyo) en un ecosistema de trópico alto. Este hongo fue caracterizado morfológicamente por Cañón (1999) y al momento de iniciar el estudio se encontraba criopreservado a $-172\text{ }^{\circ}\text{C}$ en nitrógeno líquido. La activación del aislado se realizó de acuerdo al protocolo de Cañón (1999); después se propagó y se mantuvo a través de transferencias sucesivas de inóculo cada 72 horas en un medio de cultivo, definido como M1, que contiene la fuente de carbono (que varió según el ensayo) al 0.4%, mezcla de vitaminas, microminerales, fluido ruminal clarificado 25% (V/V), resazurin como indicador redox, HCl-cisteína como agente reductor, neopeptona y hemina como fuentes de nitrógeno, mezcla de antibióticos y una mezcla de buffer fosfato-carbonato para mantener el pH del medio en 6.9. Este medio fue preparado y saturado con atmósfera de CO_2 (Lowe y col., 1985 y Wellman, 1997). Los medios se esterilizaron en autoclave por 20 minutos a 21 lb. y $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ y las inoculaciones se realizaron en condiciones asépticas. La pureza del aislado fue monitoreada en todos los experimentos a través de la detección de zoosporas móviles poliflageladas y crecimiento de colonias fungales monocéntricas en roll-tube medio agar-glucosa-celobiosa al 1% (Cañón, 1999).

Reactivos y sustratos. Todos los reactivos usados fueron grado analítico y las fuentes de carbono glucosa, arabinosa, xilosa, xilano de Birchwood con > 90% de residuos de xilosa, carboximetilcelulosa de baja viscosidad, celulosa en polvo con tamaño de partícula $20\text{ }\mu\text{m}$, ácido poligalacturónico soluble y pectina de manzana de baja metilación fueron de la marca

Sigma Co.; el algodón fue de la marca JBG, papel de filtro (Whatman 1); la pectina cítrica comercial* (ProQuimort®) y heno de avena producido localmente**.

Condiciones de cultivo. Se colocaron 10 ml de medio M1 en tubos Hungate que contenían las diferentes fuentes de carbono al 0.4%. Las condiciones de fermentación fueron: $39\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH 6.9, 72 horas de incubación bajo condiciones de anaerobiosis, saturando los medios con CO_2 . Los tubos se inocularon con 0,5 ml de una suspensión de zoosporas ($3,52 \times 10^{-3}$ zoosporas- ml^{-1}) para el primer ensayo y con un fragmento de heno de avena colonizado ($0,5\text{ cm} \times 0,5\text{ cm}$) para el segundo ensayo. Mediante un blanco que contenía sólo el medio M1, se cuantificó la contribución de los componentes del medio en cuanto AGV y proteínas. Cada tratamiento fue evaluado por triplicado.

Distribución de la actividad enzimática. Al finalizar la incubación se detuvo el crecimiento sometiendo los tubos a congelación ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Posteriormente, el cultivo fue descongelado y centrifugado a 10.000 r.p.m a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 min, y el sobrenadante resultante se denominó 'fracción extracelular'. El pellet se resuspendió en 4 ml de buffer fosfato de potasio (PBS) 100 mM, pH 6.0 y se centrifugó a 10.000 g por 15 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ descartando el sobrenadante. El pellet fue resuspendido en el mismo buffer PBS y sonicado (44 Khz, 50w) a intervalos de 10 segundos en un baño de hielo por 5 minutos. Nuevamente se centrifugó a 10.000 r.p.m. por 15 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y al sobrenadante obtenido se le llamó 'fracción asociada a la pared celular' (Hodrová y Col., 1998). A partir del residuo sólido resultante fue

* Caracterizada por Lozano (1995).

** Caracterizado por el laboratorio de Química del Programa Nacional de Fisiología y Nutrición Animal de CORPOICA, 2000.

extraído todo el contenido de proteína, rompiendo la pared celular fúngica por congelación del residuo sólido en nitrógeno líquido por una hora. Se enjuagó con PBS y se maceró con varilla de vidrio, adicionando 1 ml de buffer de extracción de proteína que contiene Triton-X100. Finalmente, se agitó con vortex por 1 minuto a 4 °C y se centrifugó a 3.000 r.p.m. a 4 °C por 15 minutos, conservando el sobrenadante ('fracción citosólica') y descartando el residuo sólido.

Actividad enzimática. En este estudio se evaluó la expresión de las siguientes enzimas hidrolíticas: exopoligalacturonasa (hidroliza los enlaces glicosídicos α -1-4 del ácido poligalacturónico liberando oligo-D-galacturonatos), endo-1,4- β -xilanasas (que hidroliza los enlaces 1,4- β -D-xilosídicos del xilano liberando oligómeros de xilosa); y endoglucanasa (que hidroliza los enlaces 1,4- β -D-glucosídicos al azar en la celulosa, liberando oligosacáridos). Una Unidad Internacional (UI) se ha definido como la cantidad de enzima necesaria para liberar un μ mol de azúcar/min. Se usaron como sustratos específicos ácido poligalacturónico, carboximetilcelulosa y xilano de Birchwood, respectivamente. Se determinaron los azúcares reductores por el método de Nelson/Somogy (1952) y el contenido de proteína por el método de Lowry (1951).

Para medir la actividad de la exopoligalacturonasa se cuantificó la liberación de grupos reductores a partir de una mezcla de 0,5 ml de ácido poligalacturónico al 0,5 % en buffer de Tris-HCl 40 mM a pH 8,0, incubada con 0,5 ml del extracto enzimático. El medio gelatinizado se centrifugó y en el sobrenadante se determinaron los azúcares reductores utilizando ácido galacturónico como estándar. La endoxilanasas fue medida en una mezcla de reacción de 50 μ L de extracto enzimático, 450 μ L de xilano (6,25 mg·ml⁻¹) en buffer citrato-fosfato, 100 mM pH 6,0 a 50 °C durante un tiempo de reacción de 30 minutos. El xilano no degradado fue removido por microcentrifugación a 10.000 r.p.m. por 5 minutos, y en el sobrenadante se determinaron los azúcares reductores utilizando xilosa como estándar. La actividad de la endoglucanasa, se midió en una mezcla que contenía 0,8 ml carboximetilcelulosa (5,55 mg·ml⁻¹) en solución buffer citrato-fosfato 100 mM, pH 6,0, incubada con 0,2 ml extracto enzimático. Se determinaron los azúcares reductores,

utilizando glucosa como estándar (Yanke y col., 1996). Las enzimas se inactivaron por ebullición durante 10 min.

Cuantificación de ácidos grasos volátiles (AGV). Los AGV fueron separados por cromatografía de gases se cuantificaron usando ácido isocaproico como estándar interno, después de haber acidificado los AGV por el método de Holdeman y col. (1977). Las condiciones cromatográficas fueron: cromatógrafo de gases AutoSystem XL Perkin Elmer con Turbochrom-PE Nelson; columna capilar, longitud 30 m, D.I. 0,32 mm, film 0,25 μ m (Ref: PE-FFAP de Perkin Elmer); como gas de arrastre se usó nitrógeno grado cromatográfico a un flujo de 8 ml/min; detector de ionización de llama (FID); temperatura del detector 200 °C y temperatura del inyector 180 °C. El ácido fórmico fue determinado colorimétricamente (Sleat y Mah, 1984).

Análisis estadístico. El efecto de la fuente de carbono sobre los productos de fermentación (AGV), actividad enzimática y localización de las enzimas fue analizado mediante un análisis de varianza usando la herramienta GLM del programa de SAS® (versión 8.1, 2001) con separación de medias por la prueba de Tukey (alfa = 0,05). Para comparar las respuestas por el tipo de inóculo, se realizó una prueba de ANOVA (alfa = 0,05).

Resultados y análisis

Crecimiento y productos de fermentación. El crecimiento y expresión de la actividad enzimática de *Neocallimastix frontalis* NFT 101 fueron evaluados variando las fuentes de carbono y el tipo de inóculo. Cuando una suspensión de zoosporas fue usada como inóculo, se observó buen crecimiento del hongo sobre xilosa, carboximetilcelulosa, celulosa en polvo, algodón, papel filtro, pectina cítrica y heno de avena, y muy poco o ningún crecimiento sobre arabinosa, xilano y pectina de manzana. A su vez, la inoculación sobre fragmento de heno colonizado permitió el crecimiento sobre todas las fuentes de carbono, excepto la arabinosa. El tiempo de crecimiento fue de 72 horas, el cual se determinó por la producción de formato (Lowe y col., 1987).

Los productos finales de la fermentación (AGV, formato, acetato, propionato y butirato) presentaron diferencias altamente significativas ($P < 0,001$) en respuesta a la fuente de carbono usada. En lo referente a los dos tipos de inóculo

empleados, también se observaron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los productos de la fermentación, con excepción del formato ($P > 0,05$). Los valores más altos fueron obtenidos inoculando con suspensión de zoosporas y crecido en papel de filtro, pectina cítrica y heno de avena (Tabla 1).

En cuanto al patrón de fermentación (calculando los AGV individuales como un porcentaje del total de AGV), los niveles más altos de acetato se observaron sobre heno de avena (60%), pectina cítrica (74%) y pectina de manzana (90%) y los más altos de fórmico sobre celulosa en polvo (76%), algodón (72%) y xilosa (59%). Sobre xilano, CMC y papel de filtro se presentó una proporción de acético y fórmico cercana a 50%, lo hace que se invierta la relación por efecto del tipo de inóculo. Además, estas mismas fuentes de carbono presentaron un mejor balance de los demás ácidos, siendo las que tienen los más altos porcentajes de propionato y butirato, como se observa en el caso del xilano: 9,4% de propionato y % 2,7 de butirato (cálculos no presentados).

Los bajos niveles de ácidos grasos volátiles (AGV) que se observaron cuando el medio de cultivo contenía arabinosa como única fuente de carbono, confirman que éste monosacárido no se utiliza metabólicamente para el crecimiento de *N. frontalis* NFT 101. Esto concuerda con lo reportado por Lowe y col. (1987) y Mountfort y Asher (1989).

Estos resultados indican que la producción de AGV por *N. frontalis* NFT 101, está asociada al estado de crecimiento fungal y a su capacidad de utilización metabólica de los constituyentes monoméricos de los polisacáridos, lo que genera patrones de fermentación dependientes de las fuentes de carbono. Estos resultados concuerdan con los de Rees y col. (1998), quienes afirman que el patrón de los productos de la fermentación depende de la cepa, la especie y las condiciones de crecimiento.

Al comparar los resultados de la Tabla 1, agrupando por tipo de sustrato (monosacáridos, polisacáridos, sustratos celulósicos, xilanósicos y pectinolósicos), resulta difícil observar tendencias, puesto que el crecimiento del hongo y la producción de AGV variaron enormemente entre todas las fuentes de carbono evaluadas. Sin embargo, se puede observar que al crecer sobre los polisacáridos celulósicos CMC, celulosa en polvo y papel filtro, el hongo produjo la mayor

Tabla 1. Producción de ácidos grasos volátiles AGV ($\text{mM} \cdot 10^{-3}$) después de incubar *N. frontalis* NFT 101 por 72 horas sobre diferentes fuentes de carbono y utilizando dos formas de inoculación.

Fuentes de carbono	Formato ⁽¹⁾		Acetato ⁽¹⁾		Propionato ⁽¹⁾		Butirato ⁽¹⁾		AGV totales ⁽¹⁾	
	SZ	FC	SZ	FC	SZ	FC	SZ	FC	SZ	FC
Heno	6700 ^{c,d}	5700 ^{c,d}	9850 ^{d,c}	10160 ^a	470 ^{a,b,c}	80 ^{e,d}	180 ^{b,c}	30 ^c	17480 ^b	16140 ^a
Arabinosa	1940 ^{i,e}	110 ^e	-	-	-	-	-	-	2150 ^c	110 ^g
Xilosa	8650 ^{b,c}	7340 ^{b,c}	5300 ^{c,d}	4340 ^{a,b}	700 ^{a,b}	250 ^{c,d}	300 ^{b,a}	50 ^c	15100 ^b	11990 ^{b,c}
Xilano	1170 ^f	970 ^e	710 ^e	1510 ^{d,c}	190 ^{b,c}	300 ^{b,c,d}	90 ^{c,d}	50 ^c	2260 ^c	2870 ^{g,f}
CMC	5620 ^{c,d,e}	4780 ^{c,d}	6750 ^c	3620 ^{a,b}	870 ^a	520 ^b	190 ^{b,c}	160 ^b	13550 ^b	9140 ^{c,d}
Celulosa en polvo	15430 ^a	12850 ^a	2220 ^{d,e}	5260 ^{a,b}	280 ^{b,c}	790 ^a	60 ^{c,d}	270 ^a	18070 ^b	19230 ^a
Algodón	3330 ^{d,e,f}	2730 ^{d,e}	260 ^e	1680 ^c	-	200 ^{c,d,e}	70 ^{c,d}	30 ^c	3740 ^c	4660 ^{e,f}
Papel de filtro	11830 ^{a,b}	10010 ^{a,b}	18080 ^b	2520 ^{b,c}	860 ^a	340 ^{b,c}	450 ^a	90 ^{b,c}	31290 ^a	12990 ^b
Pectina cítrica	6350 ^{c,d}	5380 ^{d,c}	23970 ^a	11970 ^a	200 ^{b,c}	270 ^{c,d}	-	80 ^{b,c}	30540 ^a	17720 ^a
Pectina de manzana	-	110 ^{d,e}	-	1240 ^c	-	-	-	-	60 ^c	1360 ^{g,f}
Promedio de AGV por tipo de inóculo	6102	4998	6714	4230	357	275	116	76	13424	9621

a, b, c, d, e : letras diferentes dentro de la misma columna difieren significativamente ($P < 0,05$).
 SZ: inoculación con suspensión de zoosporas; FC: inoculación con fragmento de heno colonizado.
 - : No detectada. ⁽¹⁾ promedio de tres réplicas.

concentración de formato. A su vez, la producción de AGV sobre algodón fue mucho menor que sobre los otros polisacáridos celulósicos, quizás en respuesta a la compleja estructura molecular de este sustrato.

Expresión de las enzimas. Durante su crecimiento, *N. frontalis* NFT 101 expresó un complejo de enzimas hidrolíticas que

incluyen endoxilanasas, endoglucanasas y exopoligalacturonas. La principal actividad encontrada fue la endoxilanolítica, la que fue alrededor de 100 veces mayor que la de endoglucanasa y unas 1.000 veces superior a la de exopoligalacturonasa (Tabla 2). La producción de enzimas hidrolíticas por *N. frontalis* NFT 101 es aparentemente constitutiva, ya que hubo expresión de todas las enzimas

en todas las fuentes carbono, aunque su nivel fue regulado por la fuente de carbono usada en el medio ($P < 0,05$), mas no por la forma del inóculo ($P > 0,05$; Tabla 2).

No hubo correlación entre la producción de proteína fungal y la actividad enzimática obtenida con las diferentes fuentes de carbono. En promedio, la secreción de proteína fue principalmente

Tabla 2. Producción de enzimas ($\text{UI/ml} \cdot 10^{-3}$) después de incubar *N. frontalis* NFT 101 por 72 horas sobre diferentes fuentes de carbono y utilizando dos formas de inoculación

Fuentes de carbono	Endoxilanasas ⁽¹⁾				Endoglucanasas ⁽¹⁾				Exopoligalacturonas ⁽¹⁾			
	Extracelular		Asc. pared		Extracelular		Asc. pared		Extracelular		Asc. pared	
	SZ	FC	SZ	FC	SZ	FC	SZ	FC	SZ	FC	SZ	FC
Heno	8009 ^d	6385 ^a	1334 ^a	517 ^a	111 ^a	49 ^{a,b,c}	25	19	22.8 ^a	14.7 ^{a,b}	5.1 ^a	1.4 ^{a,b}
Arabinosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xilosa	2634 ^{b,c}	2393 ^{a,b,c}	576 ^{a,b}	365 ^b	46 ^a	3 ^{b,c}	13	17	0.8 ^b	0.6 ^b	0.5 ^b	0.3 ^b
Xilano	-	6151 ^a	-	217 ^{b,c}	2.4 ^b	4 ^{b,c}	8	15	-	101 ^{b,a}	-	1 ^b
CMC	2018 ^{b,c,d}	1995 ^{b,c}	300 ^b	127 ^{b,c}	82 ^a	62 ^{b,a}	69	60	21.7 ^a	23.7 ^a	2.8 ^a	2.6 ^{a,b}
Celulosa en polvo	4141 ^{a,b}	3788 ^{a,b,c}	366 ^{a,b}	322 ^{b,c}	86 ^a	92 ^a	59	37	23.5 ^a	14.3 ^{a,b}	2.7 ^a	3.3 ^a
Algodón	4593 ^{a,b}	2249 ^{b,c}	172 ^b	112 ^{b,c}	52 ^a	7 ^{b,c}	29	32	1.3 ^b	0.2 ^b	0.1 ^b	0.1 ^b
Papel de filtro	5490 ^{a,b,c}	4426 ^{a,b}	207 ^b	161 ^{b,c}	127 ^a	8 ^{a,b,c}	40	34	0.4 ^b	0.2 ^b	-	-
Pectina cítrica	910 ^{d,c}	1016 ^{b,c}	297 ^b	806 ^a	75 ^a	25 ^{a,b,c}	24	23	14.1 ^a	7.6 ^{b,a}	1.9 ^{a,b}	0.6 ^{a,b}
Pectina de manzana	-	309 ^c	-	102 ^{b,c}	2.4 ^b	5 ^{b,c}	8	14	-	2.5 ^b	-	0.6 ^{a,b}
Promedio monosacáridos	1317	1197	288	183	23	2	7	9	0,4	0,3	0,3	0,2
Promedio polisacáridos celulósicos	4061	3115	261	181	87	42	49	41	11,7	9,6	1,4	1,5
Promedio pectinas	455	663	149	454	39	15	16	19	7,1	5,1	1,0	0,6
Promedio por tipo de inoculación	2780	2871	325	273	58	26	28	25	8.5	7.4	1.3	1.0

a, b, c, d : letras diferentes dentro de la misma columna difieren significativamente ($P < 0,05$); Unidad de Actividad Internacional (UI): mmol de azúcar reductor liberado/ min.
 SZ: inoculación con suspensión de zoosporas; FC: Inoculación con fragmento de heno colonizado; - : No detectada. ⁽¹⁾ Promedio de tres réplicas.
 Monosacáridos: xilosa y xilano; Pectinas: cítrica y de manzana; Polisacáridos celulósicos: arabinosa, CMC, celulosa en polvo, heno, algodón, papel de filtro.

extracelular, encontrándose 48 % de la proteína asociada a esta fracción, 37% asociada a la pared y 16% en la fracción citosólica. A su vez, la actividad enzimática varió en estas fracciones, siendo la de menor proporción la observada en el citosol, que fue menor del 1% de la actividad enzimática total (datos no presentados).

La producción total de AGV tuvo una correlación positiva con la actividad endoglucanasa ($r=0,62$), pero no con endoxilanasas ($r= 0,37$), ni con exopoligalacturonasa ($r=0,304$). Esto puede deberse a la inhibición que causan algunos productos de la fermentación en el desarrollo fungal y su actividad enzimática. Srivivasan y col. (2001) reportaron que hidrógeno, formato, lactato, acetato y etanol son fuertes inhibidores del crecimiento y de la actividad hidrolítica, mientras que el butirato y el propionato no lo son. Entonces, a mayor acumulación de fórmico y acético, las actividades enzimáticas pueden llegar a disminuir, por lo que las fuentes de carbono cuya fermentación resulte en altas producciones de AGV no son necesariamente las mejores en términos de actividad hidrolítica, como en el caso de la pectina cítrica.

Obviando el hecho que el crecimiento del hongo y la producción de enzimas variaron enormemente entre todas las fuentes de carbono evaluadas, al comparar los resultados de la Tabla 2 agrupados por tipo de sustrato (monosacáridos, polisacáridos celulósicos y pectinas), se observa que la producción de enzimas siguió el patrón esperado. Así, con los sustratos celulósicos se observó significativa actividad endoglucanasa, mientras que con el xilano, alta actividad endoxilanasas. Cabe, sin embargo, anotar que la mayor actividad exopoligalactorunasa no se observó con las pectinas y que el heno es un sustrato sobre el cual se expresaron muy bien todas las actividades enzimáticas evaluadas en este estudio.

Actividad endoxilanasas. Bajo las condiciones de este estudio, *N. frontalis* NFT 101 liberó principalmente xilanasas al medio de cultivo (alrededor de 74%) y una proporción menor de la enzima (25%) se asoció con la pared fungal. El nivel de xilanasas en el citosol representó sólo el 1% de la actividad total. Estas relaciones están de acuerdo con los reportes de Mountfour y Asher (1989) y Yanke y col. (1996), pero difieren de los de Lowe y col. (1987), los cuales reportaron una alta proporción de xilanasas

asociada a la pared fungal de *N. frontalis*. En el presente trabajo sólo se encontró una alta expresión de endoxilanasas asociada a la pared fungal (75 %) en pectina cítrica inoculada con fragmento de heno colonizado. Sin embargo, el modo de crecimiento fungal asegura que las enzimas secretadas se encuentren en la proximidad del sustrato insoluble, en vista de la estrecha asociación entre el hongo y la fuente de carbono.

El heno y el xilano fueron las fuentes de carbono que indujeron la mayor producción de endoxilanasas, lo que está directamente relacionado con la composición química de estas dos fuentes de carbono (xilano > 90% de residuos de xilosa y heno 17,78% de hemicelulosa). También se encontró actividad xilanolítica importante sobre las diferentes formas de celulosa y las fuentes de pectina fueron menos eficientes en inducir la producción de endoxilanasas (Figura 2).

Se ha sugerido que algunas fuentes de carbono, pueden tener pequeñas cantidades de xilosa, como en el caso del papel de filtro, que pueden actuar como un inductor de la xilanasas. Esto también pudo ocurrir en el caso de la pectina cítrica comercial y la pectina de manzana inoculada con fragmento de heno colonizado. No obstante, tanto la producción de endoxilanasas obtenida con el uso de celulosa en polvo altamente purificada y carboximetilcelulosa como el incremento en actividad obtenido sobre xilano y heno de avena, sugieren que la producción de endoxilanasas de *N. frontalis* NFT 101, tiene carácter constitutivo pudiendo ser inducida de acuerdo a las características del sustrato. Estas observaciones coinciden con los reportes de Lowe y

col. (1987), Yanke y col. (1996), Lindner y col., (1994) y Segura y col., (1998).

Con el uso de xilosa, constituyente principal del xilano, la actividad xilanolítica fue menor a la observada sobre xilano y heno. Esto se explica a través de una regulación catabólica que también incluye a la glucosa. De acuerdo con Mountfour y Asher (1983 y 1989), dicha regulación facilita la utilización preferencial de azúcares simples en lugar de los polisacáridos, brindando al hongo una ventaja competitiva cuando hay abundancia de azúcares solubles. En el rumiante, sin embargo, estos niveles son usualmente bajos, y los azúcares solubles se metabolizan rápidamente después de la alimentación del rumiante por acción de toda la microflora ruminal.

Los niveles de producción y actividad xilanolítica máxima (extracelular 8 UI·ml⁻¹ y asociada a la pared 1,33 UI·ml⁻¹ en heno) fueron similares a las obtenidas en extractos crudos por Lowe y col. (1987), Williams y Orpin (1987), Wood y Wilson (1995), Dijkerman y col. (1997), Mountfort y Asher (1987) y Gordon y Phillips (1989) y 10 veces más altos a los reportados por Ho y col. (1996). En sistemas semicontinuos se han obtenido actividades 20 veces más altas (Srinivasan y col., 2001; Dijkerman y col., 1996 y Yanke y col., 1996). Sin embargo, la producción y actividad xilanolítica logradas en este trabajo se comapan con lo conseguido usando microorganismos aerobios que producen activamente estas enzimas, como *Trichoderma harzianum* y *Thermoascus aurantiacus* y superiores a las de *Trichoderma reesei* (Wood y Wilson, 1995). Esto es significativo ya que el alimento para los rumiantes del trópico frecuentemente contiene una proporción

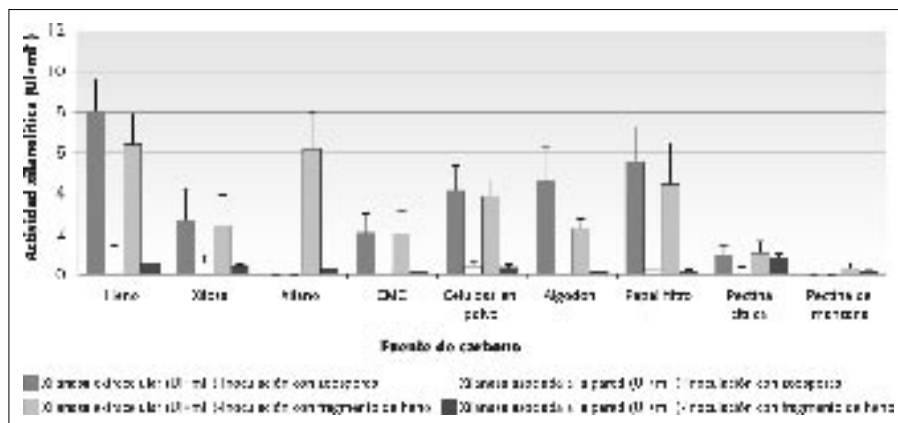


Figura 2. Producción de endoxilanasas en la fracción extracelular y asociada a la pared fungal de *N. frontalis* NFT 101 sobre diferentes fuentes de carbono y variando la forma de inoculación. (Unidad de Actividad Internacional (UI)= mmol de azúcar reductor liberado/min).

sustancial de hemicelulosa. La habilidad de *N. frontalis* NFT 101 para liberar cantidades importantes de xilanas, hace pensar que este hongo se ha adaptado para degradar los tejidos lignocelulósicos de los forrajes tropicales.

Actividad endoglucanasa. *N. frontalis* NFT 101 produjo alrededor de 60% de su actividad endoglucanasa en forma extracelular y alrededor de 40% asociada a la pared fungal (Figura 3). Sin embargo, estas proporciones cambiaron según el tipo de inoculación, como fue el caso de algodón, papel de filtro, xilano, xilosa y pectina de manzana, materiales en los que se observó mayor actividad celulasa asociada a la pared cuando la inoculación se hizo con fragmento de heno colonizado. Estos valores están de acuerdo con los informes de Hodrová y col. (1998), Wood y col. (1995) y Yanke y col., (1996), quienes reportaron una proporción mayor de endoglucanasa liberada al medio de cultivo.

Como era de esperar, las fuentes de carbono que indujeron la mayor producción de endoglucanasa fueron los sustratos celulósicos (papel filtro, celulosa en polvo y carboximetilcelulosa). En estas mismas fuentes el 60% de la actividad endoglucanasa fue encontrada en la fracción extracelular.

Estos resultados sugieren que la actividad endoglucanasa está muy asociada con la adhesión del microorganismo al sustrato, su capacidad de degradación de celulosa y su eficiencia de colonización. Asimismo, a través del concepto del 'celulosoma' se ha sugerido que los microorganismos con mayor capacidad de enlace a la fuente de carbono son más eficientes en la degradación del mismo (Schwarz, 2001).

Los niveles de endoglucanasa producidos sobre heno de avena (0,111 UI·ml⁻¹) fueron comparables a los encontrados en los materiales celulósicos, por lo que se concluye que la expresión enzimática no se vio afectada por el nivel de lignina en el heno usado (9,87%). Esto corrobora el papel activo de los hongos ruminales en la colonización y degradación de sustratos muy lignificados (Joblin y Naylor, 1989).

Los niveles de endoglucanasa producidos sobre pectina cítrica comercial (0,075 UI·ml⁻¹) fueron comparables a los obtenidos con los sustratos celulósicos, probablemente debido a trazas de carbohidratos glucosídicos presentes en este producto comercial. Sin embargo, hubo

actividad endoglucanasa en todos los sustratos, por lo que al igual que con la xilanas, esto indicaría una producción basal (constitutiva) de celulasas en este aislado fungal.

Los niveles de actividad endoglucanasa obtenidos con *N. frontalis* NFT 101 se encuentran en el rango reportado en extractos enzimáticos crudos de hongos anaeróbicos (Lowe y col., 1987; Williams y Orpin, 1987; Wood y Wilson, 1995; Dijkerman y col., 1997; Hodrova y col., 1998; Gordon y Phillips, 1989; Tsai y Calza, 1993 y Ho y col., 1996), pero son 20 veces inferiores a la actividad endoglucanasa en bacterias ruminales aisladas de bovinos en ecosistemas tropicales (Arcos, 1998).

La endoglucanasa asociada a la pared fungal presentó un nivel de expresión importante en las diferentes fuentes de carbono, similar a lo que otros autores han encontrado en bacterias y protozoos del rumen (Williams y col., 1984). Esto

implica que tanto la naturaleza del inóculo (móvil o vegetativo), como la fuente de carbono, influyen en la distribución de la actividad de la β-glucanasa y en su nivel de expresión.

Actividad exopoligalacturonasa. Es cierta la capacidad de los hongos ruminales para degradar enzimáticamente la pectina. Orpin (1983) encontró que entre 20 y 40% de la pectina en pajas de trigo fue degradada durante el crecimiento fungal. Los ácidos D-galacturónico y poligalacturónico y la pectina no son fermentados por algunos hongos anaeróbicos ruminales (Gordon y Phillips, 1989). En el presente estudio, *N. frontalis* NFT 101 mostró una acción depolimerizante sobre la pectina (Tabla 2 y Figura 4), la cual fue liberada principalmente (alrededor de 80%) de forma extracelular. Estos valores están de acuerdo a los informes de Gordon y Phillips (1992), pero difieren de los descritos por Kopec-

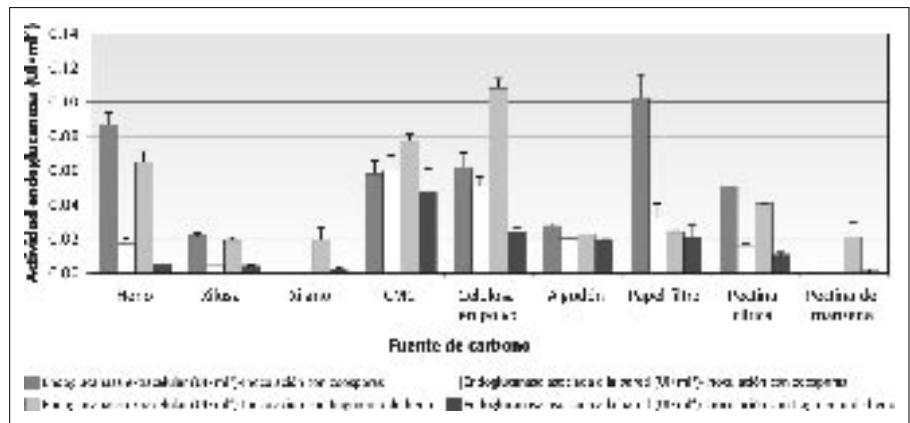


Figura 3. Producción de endoglucanasa en la fracción extracelular y asociada a la pared fungal de *N. frontalis* NFT 101 sobre diferentes fuentes de carbono y variando la forma de inoculación. (Unidad de Actividad Internacional (UI)= mmol de azúcar reductor liberado/min).

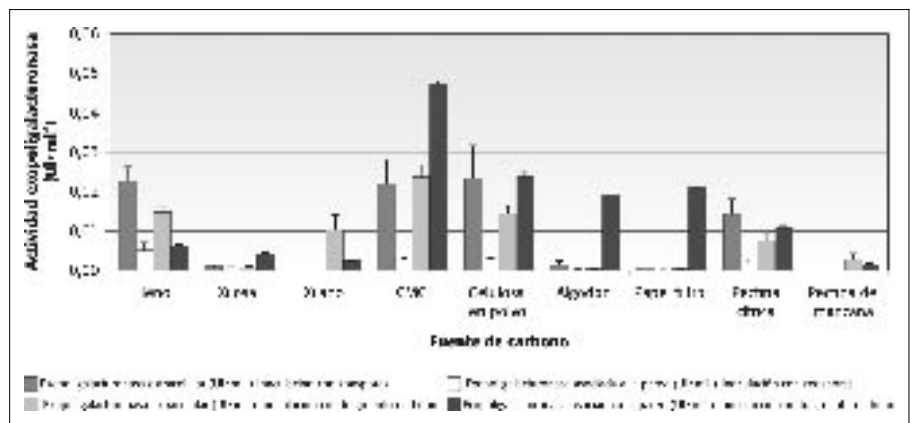


Figura 4. Producción de exopoligalacturonasa en la fracción extracelular y asociada a la pared fungal de *N. frontalis* NFT 101 sobre diferentes fuentes de carbono y variando la forma de inoculación. (Unidad de Actividad Internacional (UI)= mmol de azúcar reductor liberado/min).

ny y Hodrová (1995) los cuales observaron una proporción alta de actividad pectinolítica asociada a la pared fungal en *N. frontalis* sp. H15.

Las fuentes de carbono más eficientes para inducir la producción de exopoligalacturonasa (en UI·ml⁻¹) fueron carboximetilcelulosa (0,237), celulosa en polvo (0,0235), pectina cítrica comercial (0,0141) y heno de avena inoculado con suspensión de zoosporas (0,0228). Estos niveles de actividad son 10 veces superiores a los reportados para *Neocallimastix* sp. y *Orpinomyces joyonii* por Kopečný y Hodrová (1995) y 20 veces más bajos a lo reportados para bacterias pectinolíticas del rumen como: *Lachnospira multiparus*, *Prevotella ruminicola* y *Butyrivibrio fibrisolvens* (Duskova y Marounek, 2001). La capacidad exopoligalacturonasa de *N. frontalis* NFT 101 frente a la de microorganismos tradicionalmente pectinolíticos como el *Aspergillus niger* es 100 veces menor (Lozano, 1995).

Los niveles de expresión de exopoligalacturonasa obtenidos sobre las pectinas (de manzana y cítrica comercial) presentaron diferencias significativas ($P > 0,05$), siendo mayores en la pectina cítrica comercial; la cual contiene trazas de azúcares y su actividad enzimática (0,141 UI·ml⁻¹) fue una de las más altas y comparable a lo observado con los sustratos glucosídicos (Figura 4). Esto podría estar asociado con el proceso lento de adaptación del microorganismo a las sustancias pécticas especialmente en la pectina de manzana.

La producción de enzimas pécticas puede ser inducible o constitutiva. Se ha mostrado que la endopoligalacturonasa de *A. niger* es una enzima constitutiva, mientras que la exopoligalacturonasa es inducible. La producción de pectinasa es constitutiva en levaduras porque la pectina y el ácido galacturónico no son requeridos para inducir la expresión. En especies como *K. fragilis* se ha reportado la inducibilidad de la poligalacturonasa en 2% de glucosa + 1,8 % de pectina (Blanco y col., 1999).

En el presente trabajo *N. frontalis* NFT 101 mostró actividad exopoligalacturonasa en todas las fuentes de carbono usadas, principalmente en las celulósicas, pero su producción no se incrementó cuando la única fuente de carbono eran sustancias pécticas. Esto implica que *N. frontalis* NFT 101 expresó la exopoligalacturonasa en forma constitutiva, lo que concuerda con los resultados de Gordon y Phillips (1992), quienes reporta-

ron actividad pectinolítica del tipo liasa en cultivos de hongos ruminales sobre pasto pangola, tamo de trigo, celulosa, xilano y glucosa.

Conclusiones

La forma de inoculación afectó la habilidad de *Neocallimastix frontalis* NFT 101 para crecer sobre algunas fuentes de carbono. Cuando una suspensión de zoosporas se usó como inóculo, el hongo no creció en arabinosa, xilano y pectina de manzana. A su vez, la inoculación con fragmento de heno colonizado permitió el crecimiento en todas las fuentes de carbono con excepción de la arabinosa. Esto podría estar relacionado con las diferentes características morfológicas y de metabolismo del hongo (Orpin, 1983; Gordon y Phillips, 1992), en repuesta a procesos de adaptación que le permiten ser más o menos eficiente en su actividad hidrolítica sobre los sustratos.

Al igual que otros hongos ruminales, *N. frontalis* NFT 101 produjo un complejo de enzimas hidrolíticas las que fueron liberadas principalmente al medio de cultivo, aunque hubo actividad enzimática significativa asociada a la pared fungal, especialmente en el caso de la endoglucanasa. En general, la principal actividad enzimática fue la endoxilanolítica, unas 100 y 1000 veces mayor que la endoglucanasa y la exopoligalacturonasa, respectivamente. Esto sugiere una alta especialización de este hongo para degradar la hemicelulosa y corrobora la importancia de los hongos anaeróbicos en la degradación de sustratos lignocelulósicos en el rumen.

La producción de enzimas hidrolíticas por *N. frontalis* NFT 101 fue de carácter constitutivo, pero dicha producción se vió afectada por la fuente de carbono usada en el medio de crecimiento y en menor grado por el estado de desarrollo fungal del inóculo. Dentro de las fuentes de carbono evaluadas las que presentaron un mejor balance entre la actividad enzimática y el crecimiento fungal fueron la celulosa en polvo, el heno de avena, el papel filtro y el xilano, previo proceso adaptación al sustrato y realizando una inoculación con suspensión de zoosporas. El grado de influencia dependió de la enzima, siendo las más afectadas las endoxilanasas y las exopoligalacturonasas, mientras que las endoglucanasas fueron menos afectadas. Las implicaciones prácticas de estas observaciones deberán ser evaluadas *in vivo*, a fin de incluir en las dietas tropicales

sustancias promotoras del crecimiento y la actividad enzimática fungal a fin de aumentar la degradabilidad y el aprovechamiento de los forrajes fibrosos, tan comunes en condiciones tropicales, por los rumiantes.

Finalmente, no hay coincidencia entre los reportes de literatura y los resultados obtenidos en este trabajo sobre el tipo y forma de las fuentes de carbono que permiten el crecimiento fungal y a su vez la expresión óptima de la actividad enzimática. Esto podría deberse a factores como: (1) un proceso lento de adaptación sobre algunos mono, di y polisacáridos, que implica a la vez una lenta utilización de los productos liberados para la obtención de la energía necesaria para el crecimiento fúngico; (2) la necesidad del hongo de tener un soporte fibroso para colonizar sus rizoides; (3) la no utilización metabólica de algunos monosacáridos constituyentes de la pared celular vegetal por parte de los hongos ruminales y, (4) diferencias metabólicas entre distintos aislados fungales.

BIBLIOGRAFÍA

- Arcos, M. L. 1998.** Aislamiento, conservación y evaluación de la cinética de crecimiento y actividad celulolítica de cepas de *Fibrobacter succinogenes* de bovinos en pastoreo de gramíneas tropicales. Tesis de maestría en Microbiología Industrial, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Bauchop, T. 1979.** Rumen anaerobic fungi of cattle and sheep. *Appl Environ Microbiol*, 38: 148-158.
- Bera, C., Gaudet, G. y Forano, E. 1998.** Regulation of glycosyl-hydrolase gene expression in *Fibrobacter succinogenes* S85. En: Ohmiya, K., Hayashi, K., Sakka, K., Kobayashi, Y., Karita, S. y Kimura, T. (eds.) Genetics, biochemistry and ecology of cellulose degradation. Uni Publishers Co., Ltd., Japan, pp. 541-544.
- Blanco, P., Sieiro, C. y Villa, T. G. 1999.** Mini Review: Production of pectic enzymes in yeasts. *FEMS Microbiol Lett*, 175: 1-9.
- Borneman, W.S., Akin, D. E. y Ljungdahl, L. G. 1989.** Fermentation products and plant cell wall-degrading enzymes produced by monocentric and polycentric anaerobic ruminal fungi. *Appl Environ Microbiol*, 55,5: 1066-73.
- Borneman, W. S. y Akin, D. E. 1990.** Lignocellulose degradation by rumen fungi and bacteria: ultrastructure and cell wall degrading enzymes. En: D.E. Akin, L.G. Ljungdahl, J.R. Wilson y P.J. Harris (eds.). Microbial and plant opportunities to

improve lignocellulose utilization by ruminants. Elsevier, Nueva York. pp. 325-339.

Cañón, S.Y. 1999. Caracterización del ciclo biológico *in vitro* y criopreservación de un hongo anaerobio ruminal de un ovino. Tesis para optar el título de biólogo, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología.

Dijkerman R., Ledebor J., Op Den Camp H.J.M., Prins R.A. y Van Der Drift C. 1997. The anaerobic fungus *Neocallimastix sp.* Strain L2: growth and production of (hemi)cellulolytic enzymes on a range of carbohydrate substrates. *Curr Microbiol*, 34: 91-96.

Duskova, D. y Marounek, M. 2001. Fermentation of pectin and glucose, and activity of pectin-degrading enzymes in the rumen bacterium *Lachnospira multiparus*. *Lett Appl Microbiol*, 33: 159-163.

Gardner, R. G., Wells, J. E., Russell, J. B. y Wilson, D. B. 1995. The effect of carbohydrates on the expression of the *Prevotella ruminicola* β -1,4-D-endoglucanase. *FEMS Microbiol Lett*, 125: 305-310.

Gordon, G.L.R. y Philips, M.W. 1992. Extracellular pectin lyase produced by *Neocallimastix sp.* LM1, a rumen anaerobic fungus, *Lett Appl Microbiol*, 15: 113-115.

Gordon, G.L.R. y Philips, M.W. 1989. Degradation and utilization of cellulose and straw by three different anaerobic fungi from the ovine rumen. *Appl Environ Microbiol*, 55: 1703-1710.

Hébraud, M. y Fèvre, M. 1988. Characterization of glycosides and polysaccharide hydrolases secreted by the rumen anaerobic fungi *Neocallimastix frontalis*, *Sphaeromonas comunis* and *Piromyces comunis*. *J Gen Microbiol*, 134: 1123-1129.

Ho, Y.W., Wong, M.V.L., Abdullan N., Kudo H., y Jalaludin, S. 1996. Fermentation activities of some new species of anaerobic rumen fungi from Malaysia. *J Gen Appl Microbiol*, 42: 51-59.

Hodrova, B., Kopečný, J. y Kas, J. 1998. Cellulolytic enzymes of rumen anaerobic fungi *Orpinomyces joyonii* and *Caecomyces comunis*. *Res Microbiol*, 149: 417-427.

Holdeman, L. V., Cato, E. P. y More, W. E. C. 1977. Chromatographic procedures for analysis of acid and alcohol products. *Anaerobic Laboratory Manual*, VPI Press, pp 134-178.

Joblin, K. N. y Naylor, G. E. 1989. Fermentation of woods by rumen anaerobic fungi. *FEMS Microbiol Lett*, 65: 111-122.

Kopečný, J. y Hodrová, B. 1995. Pectinolytic enzymes of anaerobic fungi. *Lett Appl Microbiol*, 20: 312-316.

Lindner C., Stulke J. y Hecker, M. 1994. Regulation of xylanolytic enzymes in *Bacillus subtilis*. *Microbiol*, 140: 753-757.

Lowe S.E., Theodorou M.K. y Trinci A. P.J. 1987. Cellulases and xylanase of an anaerobic rumen fungus grown on wheat straw, wheat straw holocellulose, cellulose and xylan. *Appl Environ Microbiol*, 53: 1216-1223.

Lowe, S.E, Theodorou M.K., Trinci A.P.J. y Hespell, R.B. 1985. Growth of anaerobic rumen fungi on defined and semi-defined media lacking rumen fluid, *J Gen Microbiol*, 131: 2225-2229.

Lowry, O.H., Rosebrough, W.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J Biol Chem*, 193: 265-275.

Lozano, A.M. 1995. Estudio sobre endopoligalacturonasa y pectinesterasa de *Aspergillus niger*, Tesis para optar el título de Químico, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

Mountfort, D.O. y Asher R.A. 1983. Role of catabolite regulatory mechanisms in control of carbohydrate utilization by the rumen anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*. *Appl Environ Microbiol*, 46(6): 1331-1338.

Mountfort, D.O. y Asher R.A. 1989. Production of xylanase by the ruminal anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*. *Appl Environ Microbiol*, 55(4): 1016-1022.

Orpin, C.G. 1983. The role of ciliate protozoa and fungi in the rumen digestion of plant cell walls. *Anim Feed Sci Technol*, 10: 121-143.

Rees, E.M.R., Lloyd, D. y Williams A.G. 1998. The effect of differing concentrations of CO₂ and O₂ on the fermentative metabolism of the rumen fungi *Neocallimastix patriciarum* and *Neocallimastix frontalis* L2. *Can J Microbiol*, 44: 819-824.

Schwarz, W. H. 2001. The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol*, 56: 634-649.

Segura B.G.D., Durand R. y Fèvre, M. 1998. Multiplicity and expression of xylanases in the rumen fungus *Neocallimastix frontalis*. *FEMS Microbiol Lett*, 164: 47-53.

Sleat, R. y Mah R.A. 1984. Quantitative method for colorimetric determination of formate in fermentation media. *Appl Environ Microbiol*, 47(4): 884-885.

Somogy, M. 1952. Notes on sugar determination. *J Biol Chem*, 195: 19-23.

Srinivasan, K., Murakami, M., Nakashimada, Y. y Nishio, N. 2001. Efficient production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by the rumen anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis* in a repeated batch culture. *J Bioscience Bioengineering*, 91, 2: 153-158.

Teunissen, M.J., De Kort, G.V., Op Den Camp, H.J. y Huis In 'T Veld, J.H. 1992. Production of cellulolytic and xylanolytic

enzymes during growth of the anaerobic fungus *Piromyces sp.* on different substrates. *J Gen Microbiol*, 138: 1657-64.

Tsai, K.P. y Calza, R.A. 1993. Optimization of protein and cellulase secretion in *Neocallimastix frontalis* EB188. *Appl Microbiol Biotechnol*, 39: 477-482.

Wellman, A. 1997. Descripción de tres hongos ruminales y sus perfiles de crecimiento en sustratos naturales. Tesis para optar el título de Bacterióloga, Facultad de Ciencias, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.

Williams A.G. y Orpin C.G. 1987. Glycoside hydrolase enzymes present in the zoospore and vegetative growth stages of the rumen fungi *Neocallimastix patriciarum*, *Piromonas communis*, and an unidentified isolate, grown on a range of carbohydrates. *Can J Microbiol*, 33(5): 427-34.

Williams, A.G., Withers, S.E. y Coleman, G.S. 1984. Glycoside hydrolases of rumen bacteria and protozoa. *Curr Microbiol*, 10: 287-294.

Wood, T.M., Wilson, C.A. y McCrae, S.I. 1995. The cellulase system of the anaerobic rumen fungus *Neocallimastix frontalis*: studies on the properties of fractions rich in endo-(1-4)- β -D-glucanase activity. *Appl Microbiol Biotechnol*, 44: 177-184.

Yanke, L.J., Selinger, L. B., Lynn, J.R. y Cheng K.J. 1996. Comparison of the influence of carbon substrate on fibrolytic activities of anaerobic rumen fungi. *Anaerobe*, 2: 373-378.