

CARACTERIZACIÓN DE ADITIVOS ENZIMÁTICOS OBTENIDOS POR MONOCULTIVO (*Aspergillus niger*) Y COCULTIVO (*Aspergillus niger-Saccharomyces cerevisiae*) Y SU EFECTO SOBRE EL COMPORTAMIENTO PRODUCTIVO DE POLLOS DE ENGORDE

Characterization of Enzymatic Additives Obtained by Monoculture (*Aspergillus niger*) and Coculture (*Aspergillus niger-Saccharomyces cerevisiae*) and their Effects on Productive Performance of Broiler Chicks

Annalisse Bertsch^{*1}, Gabriela de J. Domínguez^{*}, Vasco A. de Basilio^{**}, Claudio B. Mazzani^{***},
Odalís del V. Luzón^{***} y Hugo Testi^{****}

^{*}Laboratorio de Biotecnología Agroindustrial. Instituto de Química y Tecnología. ^{**}Instituto de Producción Animal. ^{***}Laboratorio de Micotoxicología. Instituto de Química y Tecnología. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Apdo. 4579. Maracay, 2101, Venezuela
^{****}Matadero Maella C.A., Los Teques, Venezuela

Correo-E: bertscha@gmail.com

Recibido: 15/03/10 - Aprobado: 09/07/10

RESUMEN

Se obtuvieron y caracterizaron las propiedades nutricionales, enzimáticas y ocratoxigénicas de aditivos enzimáticos obtenidos de residuos húmedos del procesamiento de la pasta alimenticia, fermentados mediante el monocultivo de *Aspergillus niger* (A1) y el cocultivo de *Aspergillus niger - Saccharomyces cerevisiae* (A2). Se utilizaron 150 pollitos raza Cobb-500 para evaluar el efecto de la inclusión de los aditivos A1 y A2 en 30 ppm y 3000 ppm, durante 21 d sobre los parámetros productivos, utilizando un diseño completamente aleatorizado. Los resultados demuestran que las actividades de las α -amilasas y glucoamilasas en el A2 fueron superiores en 42% y 69% a las del A1, respectivamente. La composición fisicoquímica y las propiedades enzimáticas de los aditivos, revelaron que éstos están compuestos principalmente por almidón y proteína, con una actividad amilolítica similar 16020 y 15540 (FAU/g), respectivamente. Sin embargo, el A2

ABSTRACT

A study was conducted to obtain and characterize the nutritional, enzymatic, and ocratoxigenic properties of enzyme additives obtained from fermentation of moist residues of commercial production of pasta, of both a monoculture of *Aspergillus niger* (A1) and a mixed culture (coculture) of *Aspergillus niger-Saccharomyces cerevisiae* (A2). The effects on productive performance parameters were assessed, during 21 d. A total of 150 broilers (Cobb-500) were used and fed with diets which included the additives A1 and A2 in the amount of 30 and 3000 ppm, using a completely randomized design. The results show that both α -amylase and glucoamylase activities in A2 were 42 and 69% higher than those of A1, respectively. The physicochemical composition of additives revealed that they are mainly composed of starch and protein. Both A1 and A2 showed a similar amylase activity (15540 and 16020 FAU/g, respectively). However, the A2 exhibited higher

¹ A quien debe dirigirse la correspondencia (To whom correspondence should be addressed)

presentó actividad de glucoamilasa (U/g) y de fitasas (U/g) superior en 58%, respecto al A1. Los niveles de ocratoxina A de 2.10^4 y 2.10^2 ppb para A1 y A2, respectivamente, fueron inferiores a la dosis letales medias (DL_{50}) para pollos y a los límites establecidos por la FAO/OMS. Adicionalmente, la viabilidad de *Aspergillus niger* en A1 y A2 fue de 3.10^3 UFC/mL y de 2.10^2 UFC/mL en las células de levadura, respectivamente. La inclusión de 3000 ppm de A1 y de 30 ppm de A2, mejoró significativamente ($P < 0,05$) la conversión alimenticia (11-13%) y el consumo de alimento (6-8%), al compararse con el grupo control. La ganancia de peso no fue afectada significativamente por los tratamientos.

(Palabras clave: Pollos de engorde, *Aspergillus niger*, *Saccharomyces cerevisiae*; aditivos alimentarios, dieta, fermentación)

INTRODUCCIÓN

Las enzimas carbohidrasas presentan un mercado hoy en día de 550-650 millones de dólares en el mundo (Cowieson, 2010). La inclusión de aditivos enzimáticos es una práctica común en la industria de alimentos para animales debido a que facilitan su digestión y estabilizan la flora intestinal (Cowieson y Adeolat, 2005). En las dietas compuestas por maíz y soya, usadas en la alimentación de pollos de engorde, la incorporación de aditivos que aporten amilasas y fitasas permiten mejorar la digestibilidad de los almidones, grasa y aminoácidos y el comportamiento productivo (Onderci et al., 2006; Feng et al., 2007; Zakaria et al., 2010).

Muchos aditivos se obtienen mediante procesos biotecnológicos que incluyen la fermentación de un sustrato a partir del uso de microorganismos capaces de excretar enzimas específicas (Lagunas et al., 2006). Tradicionalmente, ha predominado el uso de cultivos puros; sin embargo, la aplicación del cocultivo o cultivo mixto permite la combinación de las bondades metabólicas de cada microorganismo aumentando la producción de bioproductos tales como el etanol, hidrógeno, ácidos orgánicos, biopolímeros, pigmentos, compuestos de aroma y antimicrobianos, biomasa o enzimas (Stoilova et al., 2005; Ikram-ul-Haq y Tehmina, 2006; Ghada y Berekaa, 2009; Bader et al., 2010).

glucoamylase and phytase activities (U/g) 58% than the A1. The ocratoxin A levels for A1 (2.10^4 ppb) and A2 (2.10^2 ppb), respectively, were below the median lethal dose (LD_{50}) for chickens and for the limits established by FAO/WHO. Additionally, the viability of *Aspergillus niger* in A1 and A2 was 3.10^3 UFC/mL and of 2.10^2 CFU/mL in yeast cells, respectively. The inclusion of 30 ppm of A1 and 3000 ppm of A2, respectively significantly ($P < 0.05$) improved feed conversion (11-13%) and feed intake (6-8%), when compared to control animals. The treatments did not significantly affect weight gain.

(Key words: Broiler chickens, *Aspergillus niger*, *Saccharomyces cerevisiae*, food additives, diet, enzyme, fermentation)

Se ha reportado que los aditivos microbianos de uso más difundido en las dietas de animales se obtienen mediante cultivos puros de *Saccharomyces cerevisiae* o de *Aspergillus* spp., siendo este último conocido por ser productor de ocratoxinas (SalamKhan et al., 2000). Sin embargo, ambos son considerados microorganismos seguros (*Generally Recognized as Safe, GRAS*) por la FDA lo que se permite su uso en la alimentación animal (Shuster et al., 2002; Mathivanan et al., 2006). En este sentido, *Aspergillus niger* van Tieghem presenta la capacidad de excretar enzimas amilolíticas para hidrolizar el almidón, hasta azúcares simples a partir de sustratos de bajo costo, tal como los residuos del pastificio. Esta última especie puede ser utilizada en cocultivo con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Mujica, 2006).

En relación con la combinación de estos microorganismos en la obtención de aditivos enzimáticos y su efecto en la alimentación animal no ha sido reportada en la literatura. Por tal razón, el presente trabajo tuvo como objetivo la obtención de dos aditivos enzimáticos producto de la fermentación en monocultivo de *A. niger* o con *S. cerevisiae* de desechos del procesamiento de pasta rica en almidón, su caracterización enzimática, bromatológica y ocratoxigénica. Asimismo, se evaluó el efecto de su uso sobre la respuesta productiva en pollos de engorde durante la fase de iniciación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Etapa I. Fermentación del desecho del pastificio

Caracterización de la materia prima. Los desechos de pasta húmeda suministrados por una empresa comercial, fueron conservados a -2°C . Estos residuos fueron analizados en cuanto a su contenido de humedad, cenizas, grasa, proteína cruda, almidón y fibra, de acuerdo a la metodología de la AOAC (*Association of Official Analytical Chemistry*, 1990, por sus siglas en inglés), así como el contenido de azúcares reductores (Nelson, 1944).

Proceso de fermentación. Se utilizó el aislado de *A. niger* ANM-1 perteneciente al cepario del Laboratorio de Micotoxicología de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela (Mujica, 2006). La levadura deshidratada *S. cerevisiae* utilizada fue obtenida comercialmente.

En el pre-cultivo se utilizó una solución salina compuesta por 5 g de sulfato de magnesio, 2 g de sulfato de amonio, 2 g de fosfato de potasio, 2 g de extracto de levadura y 10 g de sustrato (desecho del pastificio) en un litro de agua. El pH fue ajustado a 4,27 (Hanna 8417 Instruments®, México). Se utilizó un inóculo del 10% de suspensión de esporas de *A. niger*, obtenida mediante el raspado con agua destilada estéril de la superficie de una colonia en crecimiento en papa dextrosa agar en cuña de *A. niger* utilizando una ansa de platino. La suspensión formada se filtró con gasas estériles eliminando los restos de micelio y conidioforos. La siembra del hongo fue de 1×10^6 esporas por mililitro, contabilizada con el empleo de un hematocitómetro (cámara de Neubauer). El precultivo, una vez inoculado, fue colocado en una incubadora (Lab. Companion SI-300, Korea) a 37°C y 90 rpm por 48 h. En el caso de la levadura, para el precultivo se utilizó la solución salina descrita anteriormente con la adición de 5 g/L de glucosa. El inóculo fue de 20 g/L de levadura seca.

Los microorganismos fueron cultivados en un fermentador (Microferm New Brunswick Scientific, EUA), de 4 L de capacidad, a 38°C , 300rpm, aireación de 2vvm, el inóculo fue del 10% y se utilizó el medio antes descrito a pH 4,27 con la adición de 150 g/L del sustrato. Para la obtención del aditivo (A1) la fermentación fue realizada por *A. niger* por 24 h. En el caso del aditivo (A2) inicialmente se llevó

a cabo el cultivo de *A. niger* durante 19 h y luego se inoculó la levadura *Saccharomyces cerevisiae* hasta alcanzar un tiempo total de 48 h de cultivo mixto.

Estudio de la cinética de fermentación. Se realizó la medición de los azúcares reductores y almidón en el caldo en el transcurso de la fermentación, a través de las metodologías antes mencionadas. Se evaluó la actividad enzimática de la α -amilasa en el caldo. Esta fue reportada en unidades amilolíticas (UA/mL), la cual es definida como la capacidad de hidrolizar 1mg de almidón/mL por min a pH 5 y 37°C (Hophins y Bird, 1954). La actividad de la glucoamilasa en el caldo fue reportada en unidades internacionales (UI/mL), definiendo esta unidad como la cantidad de enzima que produce un $1\mu\text{mol}$ de glucosa/mL por min a pH 5 y 60°C a partir de una solución con almidón (1% p/v) (Olmos, 1987).

Etapa II. Procesamiento del caldo de fermentación

El caldo de fermentación fue deshidratado en un secador de bandeja Proctor Schwartz (Philadelphia-EUA) a 50°C por 8 h. El producto seco se caracterizó bromatológicamente en cuanto a humedad, grasa, cenizas, proteínas, glucosa, almidón, fibra cruda (AOAC, 1990; Nelson, 1944). Las actividades enzimáticas de la glucoamilasa, amilasa y de fitasas fueron expresadas por gramo de producto (Hophins y Bird, 1954; Olmos, 1987; Bitar y Reinhold, 1972). Se determinó su contenido de ocratoxina A de acuerdo al método basado en el uso de columnas de inmunoafinidad específicas Ochratest® (Casanova *et al.*, 2006). De igual forma se determinó la viabilidad de las células de levadura y del moho mediante el recuento de las colonias mediante la técnica de incorporación en placas (Mujica, 2006).

Etapa III. Pruebas zootécnicas

El experimento se realizó en la Sección de Aves de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela, Núcleo Maracay, la cual se encuentra a 480 msnm, presentando una temperatura media anual de 25°C y una humedad relativa promedio de 75% (González, 2008). Se utilizó un galpón de 4m de ancho y 8 m de largo, con cuatro salas, de las cuales se utilizaron 15 puestos (1x1m). El galpón posee piso de concreto con puestos separados con malla, con cortinas móviles en todo el perímetro del galpón. Para el suministro del alimento se contó con

comederos de plato, así como bebederos de galón para el suministro de agua durante los primeros 7 d, los cuales luego se reemplazaron por bebederos de campana. Para suministrar calor a los pollitos en la etapa inicial se utilizaron bombillos de 100 Watts. Pasado el d 21, se elevó la cortina del galpón a fin de proporcionar una mayor ventilación y aire fresco.

Se utilizaron 150 pollitos raza Cobb-500, seleccionados mediante una distribución de frecuencia de peso de una población inicial de 300 pollos. En cada uno de los 15 puestos se alojaron 10 pollitos. Se registró un control semanal del peso corporal por grupo de aves y de consumo del alimento en base al peso de los residuos del alimento durante 21 d empleando una balanza electrónica (Thomas Scientific, EUA) con 1g de precisión y capacidad de 65 kg.

Durante la etapa de preiniciación (0-7 d) y la de iniciación (7-21 d) se utilizaron dietas comerciales preiniciadoras e iniciadoras cuya composición formulación y composición bromatológica se muestra en la Tabla 1. Una vez obtenido el alimento experimental se procedió a incorporar en una mezcladora Alfa Laval (Suecia) de 70 kg de capacidad las diferentes proporciones del aditivo enzimático, almacenándolos en bolsas de 15 kg para cada tratamiento.

Los ensayos se realizaron de acuerdo a un diseño completamente aleatorizado, el cual constó de 5 tratamientos con 3 repeticiones cada uno, para un total de 15 unidades experimentales o corrales. Los tratamientos fueron los siguientes: alimento experimental + 0 mg/kg aditivo enzimático (T0); alimento experimental + 30 mg/kg aditivo enzimático A1 (T1); alimento experimental + 3000 mg/kg aditivo enzimático A1 (T2); alimento experimental + 30 mg/kg aditivo enzimático A2 (T3); alimento experimental + 3000 mg/kg aditivo enzimático A2 (T4).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos para consumo de alimento, ganancia de peso y conversión alimenticia para el período 0-21 d fueron sometidos al análisis de varianza (ANAVAR) utilizando un paquete estadístico "StatView". Cuando el ANAVAR detectó diferencias estadísticas entre las medias ($P < 0,05$), las mismas fueron separadas mediante

la prueba de Fisher.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cinética de fermentación

Durante la fermentación, se observó en el caldo la disminución del almidón en 4,3 y 5,3 (mg/100mL) y el incremento en la cantidad de azúcares reductores en 1,04 y 1,8 (mg/100mL) para A1 y A2, respectivamente. El almidón es hidrolizado a glucosa por la acción de las enzimas amilolíticas excretadas por el *A. niger* durante la fermentación. Estas rompen los enlaces que conforman la estructura del almidón, generando la liberación de las moléculas de glucosa (Mujica, 2006). Se evidenció que durante las primeras 20 h, el cultivo de *S. cerevisiae* hidrolizó el 99% del almidón inicialmente presente en el medio de cultivo, mientras que en el caso del monocultivo aún a las 48 h, permanecieron azúcares no hidrolizados en el caldo de cultivo (Figura 1).

La actividad máxima de las α -amilasas en el cocultivo fue 42% superior a las del monocultivo (Figura 2A). Similarmente, la actividad enzimática

Tabla 1. Composición de la Dieta basal iniciadora para pollos de engorde

Ingrediente	Iniciador (%)
Maíz molido	51,66
Harina de soya	40,10
Aceite de soya	3,94
Prem. Min-Vit*	0,35
Sal	0,35
Carbonato de calcio	0,99
Fosfato mono-cálcico	1,97
L-Lisina	0,31
DL-Metionina	0,33
Análisis Químico (% Base seca)	
Proteína cruda	25,49
Fibra cruda	3,66
Grasa	6,64
Ceniza	6,50

* Composición por kg de premezcla: NaCl, 316 g; vitamina A (retinyl palmitate), 1.050.000 UI; colecalciferol, 158.000 UI; vitamina E (dl- α -tocopheryl acetate), 1,580 UI; vitamina B1, 50 mg; vitamina B2, 420 mg; d-ácido pantoténico, 840 mg; vitamina B6, 105 mg; vitamina B12, 1 mg; biotins, 10 mg; niacina, 2,600 mg; vitamina K3, 240 mg; Ácido fólico, 24 mg; cloruro de colina, 52,6 mg; coccidiostatos, 5,3 mg; cobalto, 0,10 mg; cobre, 40 mg; zinc, 60 mg; manganeso, 50 mg; iodo, 1mg; selenio, 0,23 mg

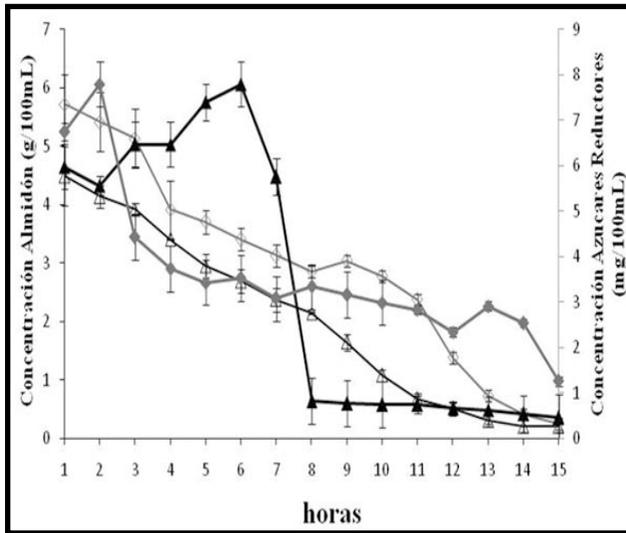


Figura 1. Hidrólisis del almidón en el cocultivo (△), monocultivo (□) ; variación en la concentración de azúcares reductores en el caldo durante el cocultivo (▲) o en el monocultivo (■) durante el proceso de fermentación microbiana

de la glucoamilasa fue 69% superior respecto del monocultivo (Figura 2B).

La alta tasa de hidrólisis de los azúcares por parte de la levadura, posiblemente evitó la activación del mecanismo de regulación fisiológica conocido como represión catabólica que causa la inhibición de la excreción de estas enzimas por *A. niger* (Holker *et al.*, 2004). En el cocultivo de *S. cerevisiae* y *A. niger*, la simbiosis de estos microorganismos resultó en una utilización completa de la glucosa como sustrato común a ambos (Abu *et al.*, 2005). Este comportamiento se ilustra en la Figura 1, en la cual se observa que ambas actividades amilásicas se incrementaron al combinar la acción de los dos microorganismos durante la fermentación respecto al monocultivo.

Caracterización de los aditivos enzimáticos

El rendimiento en el secado para A1 y A2 fue de 19,4 y 43,0 g de producto seco/L de caldo, respectivamente. Este rendimiento de 55,3% para A2 posiblemente sea el resultado del aporte doble en biomasa de los dos microorganismos. Se ha reportado que el uso del cocultivo permite el incremento de los rendimientos, el incremento del control de calidad del producto y la reducción de los costos al permitir la incorporación en el proceso de fermentación de residuos cuya composición es compleja (Bader *et al.*, 2010).

La composición fisicoquímica y las propiedades enzimáticas de los aditivos enzimáticos obtenidos se muestran en la Tabla 2. Se puede observar que ambos productos están compuestos principalmente por proteína, almidón y azúcares. Se obtuvo en ambos casos la disminución del 70-74% del contenido del almidón con respecto a la materia prima, producto de la hidrólisis por las enzimas excretadas por *A. niger* durante el proceso de fermentación (Tabla 2; Nigam y Singh, 1995).

Una vez deshidratados, los aditivos A1 y A2 presentaron actividad amilolítica similar con valores de 16020 y 15540 (FAU/g), respectivamente. En cuanto a la actividad de la glucoamilasa (U/g) ésta fue superior en 58% en el aditivo A2. Adicionalmente, los aditivos presentaron actividad enzimática de fitasas, la cual fue superior en 58% en el aditivo A2. La levadura *S. cerevisiae* tal como el *A. niger* es reportada como un microorganismo capaz de excretar

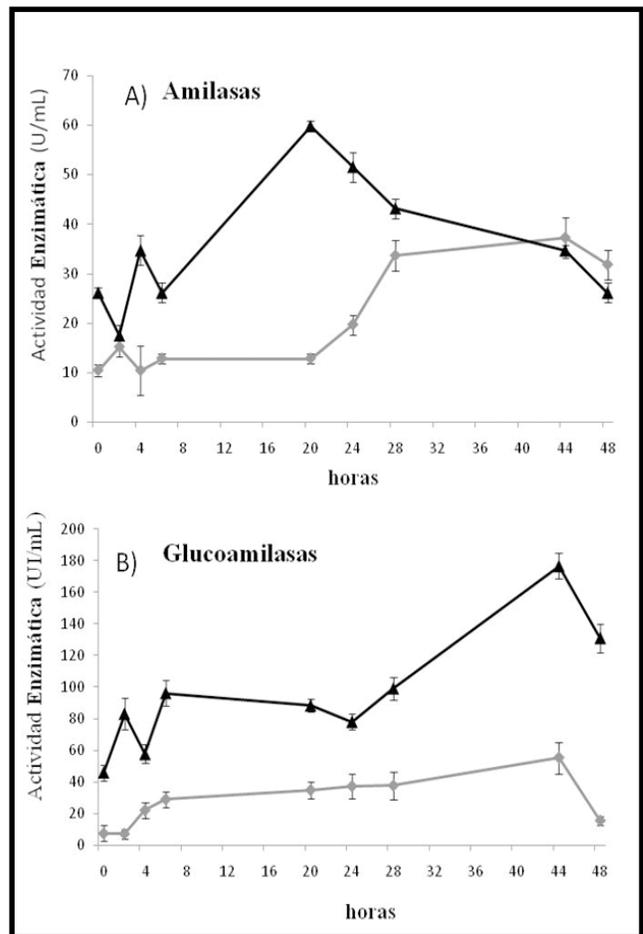


Figura 2. (A) Variación de la actividad enzimática de amilasas; (B) Actividad de las enzimas glucoamilasas en cocultivo (▲) o en monocultivo (□) durante el proceso de fermentación microbiana

Tabla 2. Composición fisicoquímica y propiedades enzimáticas del residuo de procesamiento de pasta y de los aditivos enzimáticos deshidratados

Parámetro (Base seca)	Sustrato (Residuo del pastificio)	Aditivo A1	Aditivo A2
		Monocultivo (%)	Cocultivo
Humedad	24,5±0,01	11,8±0,5	27,94±0,01
Almidón	79,9±0,01	21,3±0,01	23,7±0,02
Proteína Cruda	11,9±0,30	33,8±0,7	38,5±0,5
Azúcares reductores	4,1±0,01	24,4±0,02	27,6±0,01
Grasa	2,3±0,02	4,2±0,01	2,9±0,02
Fibra	0,7±0,05	10,3±0,03	1,9±0,02
Ceniza	0,9±0,03	3,9±0,02	5,2±0,02
Actividad fitasas (U/g)	-	2864±0,01	6,819±0,01
Actividad amilasas (FAU/g)	-	16020±111	15540±320
Actividad glucoamilasas (U/g)	-	2220±50	5328±10
Ocratoxina A (ppb)	-	2,2±0,1	6,2±0,01

Los valores representan el promedio ± Desviación estándar

fitasas por lo que tal diferencia entre los aditivos puede ser consecuencia de su presencia (Frontela *et al.*, 2008). Estos nuevos aditivos permiten la presencia de distintos tipos de actividad enzimática, las cuales posiblemente actúen como un complejo multi-enzimático en la alimentación animal. El efecto neto de los productos que aportan amilasas, glucoamilasas y fitasas en conjunto ha sido más relevante en la degradación de los diferentes azúcares de los carbohidratos usados en las dietas para pollos de engorde que el uso de enzimas añadidas en forma individual (Zakaria *et al.*, 2010).

El contenido de ocratoxinas, aunque superior en A2 en las dosis empleadas de 30 y 3000 ppm de los aditivos equivale a valores de $2 \cdot 10^{-4}$ y $2 \cdot 10^{-2} \mu\text{g}$ ocratoxina /kg de alimento (ppb), niveles inferiores a los establecidos para cereales que varían entre 3 y 5 μg ocratoxina /kg (ppb), así como a la dosis letal oral (DL_{50}) de ocratoxina A en pollos de 2-3,4 mg/kg de peso corporal (European Commission, 2002). Por otra parte, la viabilidad de *A. niger* en A1 y A2 fue de $3 \cdot 10^3$ UFC/mL y de $2 \cdot 10^2$ UFC/mL, en las células de la levadura, respectivamente. En este sentido, se ha demostrado que estos microorganismos pueden multiplicarse a la temperatura interna de las aves (37°C) y al pH de la molleja ejerciendo efectos antimicrobianos y probióticos (Koh *et al.*, 2002; Henao *et al.*, 2006).

Pruebas zootécnicas

El comportamiento productivo de los pollos se presenta en la Tabla 3. La ganancia de peso en el periodo en estudio (7-21 d) fue significativa entre dietas ($P < 0,05$). Sin embargo, se puede observar una tendencia a aumentar en 5,9% la ganancia de peso en los tratamientos con 3000 ppm del A1 y 30 ppm de A2, en relación con la ganancia de peso obtenida por el grupo testigo. Resultados similares, han sido reportados con el uso de aditivos multi-enzimáticos en la fase de inicio debido a que la falta de desarrollo del tracto gastrointestinal limita la digestión del alimento por las aves (Olukosi *et al.*, 2007; Berti *et al.*, 2009). En este sentido, Zakaria *et al.* (2010) señalan que con la edad la capacidad digestiva de las aves aumenta, así como la población microbiana con lo cual, el efecto de las enzimas exógenas es más evidente. Otros autores señalan que la mayor influencia ocurre en esta etapa ya que los aditivos enzimáticos contribuyen con las enzimas endógenas, especialmente en animales jóvenes, asistiendo en la digestión de los fitatos y la fibra (Camiruaga *et al.*, 2001). Adicionalmente, el uso de enzimas añadidas puede alterar la fisiología digestiva al modificar la masa intestinal, el tránsito de la ingesta y los procesos de secreción y absorción.

Se evidenció durante el periodo de iniciación (7-21 d) una disminución significativa ($P < 0,05$) del consumo entre los tratamientos con inclusión de 3000

Tabla 3. Parámetros productivos de pollos de engorde de 7 a 21 d de edad alimentados con dietas suplementadas con distintos niveles de los aditivos enzimáticos

Tratamiento	Ganancia de Peso (g)	Consumo de Alimento (g)	Conversión Alimenticia (g/g)
T0	598,73 ± 12,26	1315,30 ± 46,28 ^a	2,19 ± 0,06 ^a
T1	629,63 ± 18,71	1403,56 ± 30,62 ^a	2,23 ± 0,11 ^a
T2	635,50 ± 10,45	1206,83 ± 113,42 ^b	1,90 ± 0,19 ^b
T3	636,50 ± 19,46	1241,30 ± 62,87 ^b	1,95 ± 0,07 ^b
T4	622,73 ± 39,77	1367,60 ± 89,03 ^a	2,20 ± 0,09 ^a

a,b,c: Valores con letras diferentes dentro de la misma columna para cada parámetro productivo indican diferencias significativas en las medias ($P < 0,05$), Los valores representan el promedio ± Desviación estándar

ppm del A1 y 30 ppm de A2, respecto del grupo testigo (Tabla 3). La disminución en el consumo con la adición de aditivos enzimáticos ha sido atribuida a mejoras en la digestibilidad de los aminoácidos y de la energía (Zacharia *et al.*, 2010).

Igualmente, la conversión alimenticia para el periodo de 7-21 d con los tratamientos 3000 ppm del A1 y 30 ppm de A2 fue significativamente menor ($P < 0,05$) que el grupo control, indicando que el uso de los aditivos modificó el ambiente gastrointestinal y mejoró la eficiencia de la utilización del alimento (Lagunas *et al.*, 2006). En dietas basadas en maíz-soya con inclusión de aditivos enzimáticos se ha reportado, el mejoramiento de los parámetros productivos de pollos de engorde al disminuir los efectos adversos de los factores antinutricionales del maíz (almidones resistentes, fitatos, y polisacáridos no almidones y PNA) y en la soya (oligosacáridos, PNA, fitatos), al incrementar la digestibilidad de la proteínas, almidones y grasas (Cowieson, 2005).

En general, estos resultados preliminares indican que la inclusión de 3000 ppm del aditivo A1 o de en 30 ppm del aditivo A2 en dietas iniciadoras para pollos, mejoran la utilización del alimento y reducen el consumo. Considerando que la cantidad del aditivo A2 a incorporar representó el 1% de la requerida para el aditivo A1, es posible sugerir que la utilización de 30 ppm de aditivo A2 representaría una cantidad recomendable para ser incorporada en las dietas iniciadoras ya que al compararla con el aditivo A1, en las cantidades evaluadas, resulta en una mayor actividad enzimática, menor aporte de ocratoxina A y posiblemente en un menor costo de adición a las dietas para pollos de engorde.

CONCLUSIONES

La producción de aditivos multi-enzimáticos (amilasas, glucoamilasas y fitasas) a partir de la fermentación en monocultivo (*A. niger*) o en cocultivo de *A. niger* y *S. cerevisiae* es técnicamente viable. Asimismo, su incorporación en dietas a base de maíz y soya, mejoró significativamente el índice de conversión y consumo de alimento de los pollos de engorde. Se recomienda realizar estudios técnico-económicos y de optimización del proceso biotecnológico a escala industrial y realizar ensayos en la fase de iniciación y crecimiento en los cuales se evalúen los parámetros productivos y digestivos.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (PG-01-00-72003-2008), Proyecto LOCTI. SIDCAI N° 6455, y Maella C.A, a la Sección de Aves del Instituto de Producción Animal de la Facultad de Agronomía.

REFERENCIAS

- Abu, E.A.; Ado, S.A.; James, D.B. 2005. Raw starch degrading amylase production by mixed culture of *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae* grown on sorghum pomace. *African J. Biotechnol.*, 4:785-790.
- Association of Official Analytical Chemistry. 1990. Official Methods of Analysis of the A.O.A.C. 15ed. Washington, D.C.
- Bader, J.; Mast-Gerlach, E.; Popovic, M.K.; Bajpai, R.; Stahl, U. 2010. Relevance of microbial coculture fermentations in biotechnology. *J. Appl. Microbiol., En prensa.* 1-17.

- Berti, J.; Eiko, A.; Saiuri E.; Piracés, F.; Potença, A.; Lachinski, R. 2009. Enzymatic programs for broilers. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 52:233-240.
- Bitar, K.; Reinhold, H. 1972. Phytase and alkaline phosphatase activities in intestinal mucosa of rat, chicken, calf and man. *Biochem. Biophys. Acta.* 268:442-452.
- Camiruaga, M.; García, M.; Elera, R.; Simonetti. 2001. Respuesta productiva de pollos broilers a la adición de enzimas exógenas a dietas basadas en maíz o triticale. *Cienc. Invest. Agr.*, 28:23-36.
- Casanova, R.; Ramírez, J.; Martínez, A. 2006. Determinación de ocratoxina A en café verde venezolano mediante fluorimetría. V Congreso Latinoamericano Micotoxicología Florianopolis, Brazil. 172 p.
- Cowieson, A. 2005. Factors that affect the nutritional value of maize for broilers. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 119:293-305.
- Cowieson, A. 2010. Strategic selection of exogenous enzymes for corn/soy based poultry diets. *J. Poult. Sci.*, 47:1-7.
- Cowieson, A.; Adeolat, O. 2005. Carbohydrases, protease, and phytase have an additive beneficial effect in nutritionally marginal diets for broiler chicks. *Poult. Sci.*, 84:1860-1867.
- European Commission. 2002. Commission regulation (EC) No 472/2002 of 12 March of 2002 amending regulation (EC) No 466/2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuff. *Official J. European Communities*, L75/18-20.
- Frontela, C.; Ros, G.; Martínez, C. 2008. Empleo de fitasas como ingrediente funcional en alimentos. *Arch. Latinoamer. Nutr.*, 58:215-220.
- Feng, J.; Liu, X.; Xu, Z. R.; Wang, J.; Liu, J. X. 2007. Effects of fermented soybean meal on digestive enzyme activities and intestinal morphology in broilers. *Poult. Sci.*, 86:1149-1154.
- Ghada, Y.; Berekaa, M. 2009. Improved production of endoglucanase enzyme by *Aspergillus terreus*: Application of a Plackett-Burman design for optimization of process parameters. *Biotechnol.*, 1:1-8.
- González, A. 2008. Efecto de la reformulación de una dieta con un complejo enzimático de fermentación en estado sólido sobre parámetros productivos y viscosidad intestinal en pollos de engorde. Tesis Ing. Agr. Maracay. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Maracay, Aragua, Venezuela. 30 p.
- Henao, I.; Correa, F.; Marin, G. 2006. Evaluación de métodos de conservación para *Aspergillus niger* con actividad enzimática amilolítica. *Universitas Scientiarum. Rev. Cienc.*, 12:95-96.
- Holker, U.; Hofer, M.; Lenz, J. 2004. Biotecnology advantages of laboratory-scale solid state fermentation. Part I. *Process Biochem.*, 12:24-27.
- Hophins, R.; Bird, R. 1954. The action of some α -amylases on amylose. *Bioch. J.* 56:86-96.
- Ikram-ul-Haq, M.; Tehmina, S. 2006. An innovative approach for hyperproduction of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes by consortium of *Aspergillus niger* MSK-7 and *Trichoderma viride* MSK-10. *African J. Biotechnol.*, 5:609-614.
- Koh, J.H.; Yu, K.W.; Suh, H.J. 2002. Biological activities of *Saccharomyces cerevisiae* and fermented rice bran as feed additives. *Lett. Appl. Microbiol.*, 35:47-51.
- Lagunas, I.; García, B.; Castaño, E.; Regalado, C.; Avila, E. 2006. Producción de enzimas hemicelulolíticas por fermentación sólida y su aplicación en alimentos balanceados para pollos de engorda. *Mex. Vet.*, 37:1-13.
- Mathivanan, R.; Selvaraj, P.; Nanjappan, K. 2006. Feeding of fermented soybean meal on broiler performance. *Poult. Sci.*, 5:868-872.
- Mujica, M. 2006. Bioconversión de los residuos del procesamiento de pasta alimenticia en etanol por *Aspergillus niger* y *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis Ing. Agr. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Maracay, Aragua, Venezuela. pp. 1-32.
- Nelson, N. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.*, 153:375-380.
- Nigam, P.; Singh, D. 1995. Enzyme and microbial systems involved in starch processing. *Enzym. Microb. Tech.*, 17:77-778.
- Olmos, A. 1987. Enzimas. Reportes de biotecnología. Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana de Iztalapa. México. 5:36-39. 1987.
- Olukosi, O.A., Cowieson, A. J.; Adeola, O. 2007. Age-related influence of cocktail of xylanase, amylase, and protease or phytase individually or in combination in broilers. *Poult. Sci.*, 86:77-86.
- Onderci, M.; Sahin, N.; Cikim, G.; Aydin, A.; Ozercan, I.; Aydin, S. 2006. Efficacy of supplementation of α -amylase producing bacterial culture on the performance, nutrient use, and gut morphology of broiler chickens fed a corn-based diet. *Poult. Sci.*, 85:505-510.
- SalamKhan, A.; Khalique, A.; Pasha, T. 2000. Effect of dietary supplementation of various levels of Fermacto® on the performance of broiler chicks. *Int. J. Agr. Biol.*, 2:32-33.
- Schuster, N.; Dunn-Coleman, N.; Frisvad, J.; Dijck,

- P. 2002. On the safety of *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 59:426-435.
- Stoilova, I.; Gargova, S.; Krastanov, A. 2005. Production of enzymes by mixed culture from micelial fungi in solid-state fermentation. *Biotechnol. Bioeng.*, 1:103-108.
- Zakaria, H.; Jalal, M.; Ishmais, M. 2010. The influence of supplemental multi-enzymes feed additive on the performance, carcass characteristics, and meat quality traits of broiler chickens. *Internat. J. Poult. Sci.*, 9:126-133.