

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA “ANTONIO NARRO”

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

**“Efecto de la adición de levadura inactiva, proveniente de la industria cervecera, en la alimentación de ganado Holstein, sobre las poblaciones procariotas presentes en líquido ruminal para la producción de enzimas proteolíticas”**

Por:

TOMÁS LÓPEZ ALTUNAR

T E S I S

Presentada como Requisito Parcial para obtener el Título de:  
INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Buenavista, Saltillo, Coahuila

Junio, 2010

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA "ANTONIO NARRO"

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

**"Efecto de la adición de levadura inactiva, proveniente de la industria  
cervecera, en la alimentación de ganado Holstein, sobre las poblaciones  
procariotas presentes en líquido ruminal para la producción de enzimas  
proteolíticas"**

Presentado por:

**TOMÁS LÓPEZ ALTUNAR**

**TESIS**

Que se Somete a Consideración del H. Jurado Examinador Como Requisito  
Parcial Para Obtener el Título de:

**INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

El presente trabajo ha sido dirigido por el siguiente comité:

Presidente

  
\_\_\_\_\_  
**Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez**

Vocal

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Juan Enrique Mauricio Benavides**

Vocal

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Jesús M. Fuentes Rodríguez**

Vocal

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Antonio Francisco Aguilera Carbó**

Junio, 2010

  
\_\_\_\_\_  
**Ing. José Rodolfo Peña Oranday**  
COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

Junio, 2010



## AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por haberme dado la vida, y por estar siempre conmigo, por haberme bendecido, enseñado el camino y haber permitido terminar mi carrera.

A mi **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro**, “Alma Terra Mater” por todo el apoyo que me brindo tanto académico como hospitalaria durante los años que estuve dentro de esta institución.

A mi asesor de tesis y catedrática ejemplar, a la **Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez**, por haberme brindado la oportunidad de trabajar con ella, por su disposición y confianza, y sobre todo por su paciencia y enseñanza para terminar esta investigación.

A los doctores **Juan Enrique Mauricio Benavidez, Antonio Francisco Aguilera Carbó y Jesús Manuel Fuentes Rodríguez**, por su valioso tiempo y enseñanza para que este trabajo de investigación fuera posible y se concluyera satisfactoriamente.

A la **LCN. Laura Maricela Lara López**, gracias por su apoyo brindado a lo largo de esta investigación.

A todos los maestros del departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, gracias por todo el aprendizaje enseñado y que contribuyeron en mi formación académica.

A **mis amigos**, Ruy Moreno, Raciél Bautista, Jorge Abel, Lidia G, que estos últimos años han sido como mis hermanos, Benito, Claudia, Rebeca, José Juan, José Guadalupe, Cintya, Mónica, Ricardo Mayel, Leo, Gloria, Rufina, José Raquel, Huberto, Pascual, Ismael, José Damasso, Francisco Javier, José Manuel, Alejandra, Fabio, Darinel, Robelio. Por todo el cariño sincero y una amistad incondicional que me brindaron.

## DEDICATORIA

### A mis padres

*Sra. Emília Altunar Altunar*

*Sr. Juan López Morales,*

Por que me dieron la vida y por todo el cariño y amor que me han dado. Le doy gracias a dios por que me haya dado padres como ustedes y sobre todo una madre y amiga a la vez, con un corazón tan grande e inmensamente amorosa que tengo, siempre los llevare en mi corazón. El sueño logrado es de ustedes también.

### A mis hermanos

*Juan Emilio y Alejandra* que han sido como segundo padres para mí, ustedes son mis ejemplos a seguir y sobre todo por enseñarme que todo se puede lograr con fe, fortaleza y esperanza. *Martha, Idelfonso, Carlos, Patricia,* mis hermanos y confidentes a la vez, gracias por estar conmigo en las buenas y en las malas, a veces no encuentro palabras para agradecerles tantas cosas que han hecho por mí.

Mi primer sobrino *Carlos Adalberto* con solo verlo me inspiró fortaleza y que hay mucho por dar y recibir de la vida.

### Mi Familiares

A mi tío *Clemente* por sus grandes consejos que me ha brindado, mi cuñada *Primitiva* por su confianza depositada en mí.

# INDICE GENERAL

<b>RESUMEN</b>	1
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	2
1.1 Antecedentes	3
1.2 Justificación	5
1.3 Hipótesis	6
1.4 Objetivo general	6
1.4.1 Objetivos particulares	7
<b>2. REVISIÓN DE LITERATURA</b>	8
2.1 Rumen	8
2.1.1 Medio ambiente ruminal	9
2.1.2 Poblaciones microbianas	10
2.1.2.1 Bacterias	10
2.1.2.2 protozoos	13
2.1.2.3 Hongos	15
2.1.3 Metabolismo microbiano	15
2.1.3.1 Degradación de la proteína	15
2.2 Subproductos agroindustriales empleados en la alimentación de ganado	17
2.2.1 Subproductos de origen animal	17
2.2.1.1 Industrias lácteas	18
2.2.1.2 Industria pesquera	18
2.2.1.3 Industria frigorífica	19
2.2.1.4 Producción avícola	20
2.2.2 Subproductos de origen vegetal	21
2.2.2.1 Industria aceitera	21
2.2.2.2 Industria molinera	22
2.2.2.3 Industria frutihortícola	23
2.2.2.4 Industria azucarera	23
2.2.2.5 Industria cervecera	24

2.2.2.5.1 Masilla	25
2.2.2.5.2 Levadura	25
2.2.2.5.3.1 Estructura de la levadura Saccharomyces cerevisiae	27
2.2.2.6 Industria vitivinícola	28
2.3 Proteasas	28
2.3.1 Clasificación	28
2.3.2 Fuentes de proteasas	29
2.3.2.1 Proteasas de origen vegetal	29
2.3.2.2 Proteasas de origen animal	29
2.3.2.3 Proteasas de origen microbiano	30
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>32</b>
3.1 Acondicionamiento del ganado Holstein y obtención de líquido Ruminal	32
3.2 Aislamiento de procariontes en agar nutritivo	33
3.3 Caracterización macroscópica de las cepas obtenidas	34
3.4 Aislamiento de procariontes en agar Scheadler	35
3.4.1 Identificación microscópica	36
3.5 Purificación de cepas	36
3.6 Identificación el metabolismo microbiano	36
3.6.1 Agar MacConkey	37
3.6.2 Agar citrato de Simons	37
3.7 Producción de una proteasa	38
3.7.1 Selección (ensayo)	38
3.7.2 Curva de crecimiento en medio líquido específico para anaerobios (Tioglicolato de sodio)	39
3.7.3 Turbidimetría	39

3.7.4 Curva de crecimiento en medio líquido en medio específico para la producción de la enzima	40
3.7.6 Determinación de proteína extracelular por el método de Biuret	41
3.7.7 Cinética enzimática	42
3.7.7.1 Preparación de sustrato	42
3.7.7.2 Condiciones de la cinética	42
3.7.7.3 Cuantificación de proteína (enzima) por el método de Biuret	42
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIONES</b>	<b>44</b>
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>73</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>74</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Figura 1. Fotografía de la identificación de las morfologías macroscópicas microbianas obtenidas de la simbra del líquido ruminal obtenidas en agar nutritivo. A) Caja # 332, B) Caja#932, C) Caja #652 y D) Caja #572.	48
Figura 2. Fotografía de la identificación de las morfologías macroscópicas microbianas obtenidas de la simbra del líquido ruminal obtenidas en agar Scheadler. A) Caja #332, B) Caja #932, C) Caja #652 y D) Caja #572.	50
Figura 3. Morfología microscópica de la colonia 1 de la VLI #332 aislada del líquido ruminal teñido con Gram	54
Figura 4. Morfología microscópica de la colonia 3 de la VLI #332 aislada del líquido ruminal teñido con Gram.	54
Figura 5. Morfología microscópica de la colonia 1 de la VLI #932 aislada del líquido ruminal teñida con Gram.	55
Figura 6. Morfología microscópica de la colonia 2 de la VLI #932 aislada del líquido ruminal teñidas con Gram	56
Figura 7. Morfología microscópica de la colonia 3 de la VLI #932 aislada del líquido ruminal teñidas con Gram	56
Figura 8. Morfología microscópica de la colonia 4 de la VLI #932 aislada del líquido ruminal teñidas con Gram	56
Figura 9. Morfología microscópica de la colonia 5 de la VLI #932 aislada del líquido ruminal teñidas con Gram	57
Figura 10. Morfología microscópica de la colonia 2 de la VLI #652 aislada del líquido ruminal teñidas con Gram	58
Figura 11. Morfología microscópica de la colonia 3 de la VLI #572 aislada del líquido ruminal teñidas con Gram	59
Figura 12. Morfología microscópica de la colonia 4 de la VLI #572 aislada del líquido ruminal teñidas con Gram	59
Figura 13. Fotografías de las cepas puras aisladas y conservadas en tubos en forma de pico de flauta con medio de Agar Scheadler	60



Figura 14. Cepa pura colonia 5 de la VLI #932. Productora de gas	61
Figura 15. Fotografías de algunos resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas realizadas	63
Figura 16. Curva de crecimiento de la cepa 2 de la VLI #652 cultivada en tioglicolato de sodio	66
Figura 17. Curva de crecimiento en medio específico de la cepa 2 de la VLI # 652 (proteasa)	67
Figura 18. Concentración de proteína extracelular en mg a diferentes tiempos de reacción por el método de Biuret de la cepa 2 de la VLI #652	68
Figura 19. Actividad enzimática a diferentes tiempos de fermentación de la cepa 2 de VLI # 652	71

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación de los principales especies bacterianas del rumen según el tipo de sustrato que fermentan	11
Cuadro 2. Clasificación de los principales protozoos ruminales con los sustratos de fermentación preferente	14
Cuadro 3. Dieta de ganado lechero alimentado con levadura	33
Cuadro 4. Composición química del medio sólido específico para el monitoreo de la degradación de la proteasa	38
Cuadro 5. Composición química del medio líquido específico para producir proteasa	41
Cuadro 6. Contenido de los tubos para la cuantificación de proteínas totales por el método de Biuret	43
Cuadro 7. Morfología macroscópica de los microorganismos procariotas ruminales asilados en agar nutritivo	46
Cuadro 8. . Morfología macroscópica y microscópica de los microorganismos aislados en agar Sheadler	52
Cuadro 9. Relación del comportamiento bioquímico de cepas aisladas de rumen bovino, a las 24 y 48 horas de incubación	62
Cuadro 10. Velocidad de formación del producto a diferentes tiempos de fermentación	72

## RESUMEN

El rumen es una cámara de anaerobiosis que provee los nutrientes que permite el crecimiento y desarrollo de los microorganismos ruminales, que tienen la capacidad de utilizar un determinado sustrato; las poblaciones microbianas que viven en el rumen son específicamente bacterias, protozoos y hongos en diferentes concentraciones. En el mundo de la industria se requiere de usos de enzimas animales, vegetales y microbianas, siendo sin lugar a duda y las más utilizadas las enzimas microbianas. La utilización de las enzimas a nivel industrial presenta una serie de ventajas sobre los métodos no biológicos, por lo que representan es una fuente alternativa en la industria alimentaria.

En este trabajo se estudió el efecto de la levadura inactiva proveniente de la industria cervecera en la alimentación de ganado Holstein, sobre las poblaciones de procariotas presentes en líquido ruminal para la producción de enzimas proteolíticas de interés industrial.

En la UAAAN se realizó el estudio de la alimentación de ganado bovino (Holstein) de 4 vacas multíparas, adicionando subproductos de la industria cervecera (levadura inactiva) a su dieta. Se extrajo el líquido ruminal para evaluar la microflora bacteriana mediante una caracterización macro- y microscópica, y aislamiento, empleando medios de cultivo comercial (agar Scheadler) y para la caracterización macroscópica se empleó un medio convencional (aga nutritivo).

Se purificaron y conservaron 10 cepas, a las cuales se les realizó la caracterización bioquímica con McConkey y citrato de Simmons para identificar el comportamiento metabólico de los microorganismos.

Se seleccionó una cepa pura para el estudio enzimático. Se monitoreó la curva de crecimiento microbiano en medio líquido para anaerobios (TGNa), la cual presentó una velocidad específica de crecimiento de 0.0715 DO/h y de 0.0692 DO/h en un medio específico diseñado, empleando como única fuente de carbono leche descremada (caseína).

La determinación de proteína extracelular mediante el método de Biuret presentó su máximo valor a las 24 h de fermentación con una  $V_0$  de 0.0126 mg/mL.h de proteína; mientras que la máxima actividad proteasa se observó a los 30 minutos de reacción con un valor de 0.7469 U en un tiempo 24 h de fermentación.

**Palabras claves:** *microorganismos del líquido ruminal, aislamiento, purificación y actividad proteasa.*

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Antecedentes

En el rumen existen microorganismos que desempeñan un papel vital en la digestión de los alimentos, y el suministro de energía y de aminoácidos para la formación de ácidos grasos volátiles (AGV) y proteína microbiana. Debido a que los productos de la digestión ruminal, se ven afectados por numerosos microbios y la composición de especies, es necesario entender la dinámica poblacional de los diferentes tipos de microorganismos.

La diversidad de microorganismos del rumen es importante porque la presencia de especies distintas aporta un conjunto de genes y complementos de enzimas, así como reacciones bioquímicas precisas, para una conversión máxima de productos alimenticios en células microbianas y productos de fermentación. Existen en el rumen especies que se superponen en su capacidad para utilizar un determinado sustrato aumentando así la eficacia con que es utilizado dicho sustrato (Hobson, 1985).

La concentración de las poblaciones microbianas que viven en el rumen en anaerobiosis, específicamente bacterias, protozoarios y hongos son de  $10^{10}$ ,  $10^6$  y  $10^4$  UFC/mL líquido ruminal, respectivamente (Jouany, 1994). Para permitir que los organismos de crecimiento lento; tales, como los hongos y protozoarios ruminales puedan reproducirse se necesita permanencia prolongada del alimento dentro del rumen (de 48 a 72 horas) y sostener así la concentración de las poblaciones microbianas (Mc Allister, *et al.*, 1994). Los tiempos de multiplicación varían de 5 a 14 horas para los protozoarios (Williams y Coleman 1988) y de 24 a 30 horas para los hongos (Bauchop, 1981; Joblin, 1981).

Es posible que la eficiencia del crecimiento bacteriano este directamente relacionada con la tasa de dilución de las bacterias y/o del contenido ruminal, debido a que las bacterias en el rumen están asociadas a los sólidos

alimenticios, al líquido y la pared ruminal; por lo tanto, la tasa de crecimiento bacteriano puede estar en la relación a la tasa de dilución del líquido (Aguilera, 1988), lo cual se explica porque solamente en cultivos continuos *in vitro* de estado estable, la tasa de crecimiento específico de los microorganismos es igual a la tasa de dilución del cultivo (Bergey, 1979).

Se han reportado estudios de la adición de microorganismos inactivos a la dieta de los animales (ganado Holstein) logrando efectos benéficos en él (Montero-Almora, 2009).

Las levaduras se han administrado a los animales en el alimento durante más de 100 años, ya sea en la forma de una masa fermentada producida en el rancho, subproductos de lavaduras de cervecería o destilería, o productos comerciales elaborados a base de lavaduras específicamente para la alimentación animal. Aun cuando esta práctica de utilizar las levaduras en los alimentos pecuarios ha existido durante mucho tiempo, todavía no hay mucha difusión o existe confusión en la industria para utilizarlas. Pero por donde se observe el uso de levaduras tiene grandes beneficios, ya que la levadura en sí, proporciona vitaminas del complejo B, minerales, es una buena fuente de proteína y de aminoácidos (Llamas, 2008)

Aproximadamente el 40% del peso de la lavadura seca consiste en proteína, la calidad de la proteína de la levadura es excelente, tratándose de una proteína de origen unicelular su calidad es equivalente a la soya, pues ambas son ricas en lisina. Las levaduras son microorganismos unicelulares del reino fungi que suelen medir de 5 a 10 micras, se consideran como organismos facultativos anaeróbicos, lo cual significa que pueden sobrevivir y crecer con o sin oxígeno (García, 2007)

Es por ello que es de suma importancia identificar a los microorganismos del rumen ya que la cantidad de bacterias puede variar por factores ambientales o dietarios, y cuando estos dos parámetros se mantienen, las variaciones derivan de factores específicos de cada animal, tales como: tiempo destinado a

la rumia, cantidad de saliva segregada, consumo de agua y capacidad de avance a la digesta. El estudio básico de los microorganismos en ganado Holstein es primordial, ya que los biotipos mexicanos no están registrados o caracterizados, lo cual nos abre una ventana de oportunidades y posibilidades para registrar y conservar a estos microorganismos ya que pueden generar posteriores aplicaciones en la industria alimentaria; por lo que, es importante realizar la identificación bioquímica y molecular de los microorganismos del rumen bovino ya que el cepario producido de esta investigación será un aliciente para futuras investigaciones; puesto que la industria demanda enzimas de origen microbiano como las proteasas, las cuales son las únicas clases de enzimas que ocupan una posición central con respecto a sus aplicaciones, tanto en campos fisiológicos y comerciales.

Las proteasas son enzimas proteolíticas que catalizan las rupturas de enlaces peptídicos en otras proteínas. Los avances en las técnicas de análisis han demostrado que las proteasa realizan modificaciones muy específicas y selectivas de las proteínas; como la activación de las formas zimogénicas de la proteólisis limitada por las enzimas, coagulación sanguínea y la lisis de la fibrina (formación de coágulos) y procesamiento y transporte de proteínas secretoras a través de las membranas.

## 1.2 Justificación

Existen muchos ámbitos industriales donde se requiere el uso de enzimas animales, vegetales o microbianas. Las enzimas microbianas son sin lugar a duda las más utilizadas y se emplean sobre todo en la obtención de jarabes de glucosa y fructosa y suelen ser enzimas que hidrolizan polímeros, como proteínas y polisacáridos. Todos estos atributos tanto técnicos como económicos, hacen de las enzimas una excelente herramienta para la industria del futuro con un creciente nicho de mercado.

La utilización de las enzimas a nivel industrial, presenta una serie de ventajas: en primer lugar se puede citar su gran especificidad de acción que

evita la producción de reacciones laterales imprevistas, asimismo, se puede trabajar en condiciones moderadas, especialmente de temperatura, lo que provoca alteraciones de los componentes más lábiles; desde el punto de vista de la salud, además las enzimas pueden inactivarse fácilmente cuando se considere que ya han realizado su función.

En hábitats microbianos poco explorados como el rumen existen poblaciones microbianas capaces de producir enzimas, estos microorganismos dependen del rumiante para disponer de las condiciones óptimas para su crecimiento y desarrollo, y el rumiante depende de la dieta que contenga la alimentación que ingiera, ya que este es un factor externo más determinante de las condiciones ruminales y también depende de la actividad biosintética microbiana, para cubrir sus propias necesidades nutritivas (Owens y Zina, 1988).

La adición de levadura inactiva proveniente de la industria cervecera, modifica el tipo de bacterias presentes en el líquido ruminal de ganado, por lo que los microorganismos del líquido ruminal representan una fuente alternativa para la obtención de enzimas extracelulares de interés industrial

### 1.3 Hipótesis

Es posible la caracterización y el aislamiento de microorganismos ruminales de ganado Holstein adicionando levadura inactiva en la alimentación para la producción de enzimas proteasas de interés industrial.

### 1.4 Objetivo general

Determinación microbiológica de las poblaciones procariotas presentes en el líquido ruminal del ganado Holstein, provocado por la adición de levadura de la industria cervecera y la producción de enzimas proteasas.



#### 1.4.1 Objetivos particulares

- Caracterizar macro- y microscópicamente las especies bacterianas aisladas en agar Sheadler AS.
- Purificar y mantener las cepas obtenidas.
- Caracterizar el metabolismo bioquímico (Mc Conkey y citrato de Simmons) de las cepas procariotas obtenidas.
- Emplear un microorganismo procarionte para la producción de una enzima proteasa mediante el diseño de un medio de cultivo inductor.
- Determinar y cuantificar la actividad proteasa mediante técnicas espectrofotométricas.

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Rumen

El rumen es un recipiente de fermentación grande que puede contener de 100 a 120 Kg de materia en digestión. Las partículas de fibra se quedan en el rumen de 20 a 48 horas por que la fermentación bacteriana es un proceso lento.

El rumen provee un ambiente apropiado, con un suministro generoso de alimentos, para el crecimiento y reproducción de los microorganismos. La ausencia de aire (oxígeno) en el rumen favorece el crecimiento de grupos especiales de bacterias, entre ellos las que pueden digerir las paredes de las células de plantas (celulosa) para producir azúcares sencillos (glucosa). Los microbios fermentan glucosa para obtener la energía necesaria para vivir y reproducirse y producen ácidos grasos volátiles (AGV) como productos finales de la fermentación. Los AGV cruzan las paredes del rumen para pasar a la sangre y una vez distribuido por todo el organismo sirve como fuente de energía para el rumiante.

Mientras que crecen los microorganismos del rumen, estos producen aminoácidos, que son los precursores fundamentales de las proteínas. Las bacterias pueden utilizar amoníaco o urea como fuente de nitrógeno para producir aminoácidos. Sin la conversión bacteriana, el amoniaco y la urea son inútiles para la vaca. Sin embargo, las proteínas bacterianas producidas en el rumen son digeridas en el intestino delgado y constituyen la fuente principal de aminoácidos para la vaca (Sánchez, 2001).

El rumen es una cámara de fermentación anaeróbica. La población microbiana se mantiene al ingerir y masticar alimentos con regularidad, añadiendo tampones y eliminando los ácidos producidos, arrastrando los residuos alimenticios no digeribles y los productos microbianos, y manteniendo unas condiciones apropiadas de pH, temperatura y humedad para el

crecimiento microbiano. Estos microorganismos dependen del rumiante para disponer de las condiciones óptimas para su crecimiento y el rumiante depende de los productos de fermentación anaeróbica del alimento fibroso que ingiera y de la actividad biosintética microbiana, para cubrir sus propias necesidades nutritivas (Yakohama y Johnson, 1998).

### 2.1.1 Medio ambiente ruminal

La anaerobiosis en el rumen es una de las mayores limitantes de este ecosistema, el cual ayuda en la conversión de la energía para poder ser empleada por el animal. La cantidad de energía liberada por la reacción de transferencia de electrones depende del último aceptor de los mismos. En microorganismos aeróbicos, el último aceptor de electrones es el oxígeno y la liberación de energía se da en forma de ATP, la cual es mucho mayor que la que se libera cuando el último aceptor de electrones es un compuesto orgánico como en el caso de las bacterias anaeróbicas (Thauer, 1997). Las condiciones anaeróbicas en el rumen se mantienen por la generación de gases durante la fermentación, como CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, y trazas de H<sub>2</sub>. Pequeñas cantidades de oxígeno atrapados en los alimentos consumidos por el animal es utilizado por los microorganismos aerobios facultativos presentes en el rumen; esto hace que se generen y mantengan las condiciones perfectas de anaerobiosis. Sin embargo, solo los microorganismos que son capaces de tolerar potenciales de óxido-reducción bajos (-350 Mv) sobreviven en el rumen y el resto son eliminados por el sistema. La alta capacidad de amortiguación y la presión osmótica limita el crecimiento de microorganismos invasores. Algunos de los microorganismos del rumen producen compuestos antimicrobianos que limitan el crecimiento de microorganismos presentes en este ecosistema (Stewart, 1992; Odenyo, 1994).

### 2.1.2 Poblaciones microbianas

La población microbiana en el rumen es variable, predominando las bacterias y protozoarios ciliados, pero pueden aparecer una cantidad considerable de levaduras. En general, y debido a las condiciones que prevalecen en el rumen, la mayor parte de los microorganismos son anaerobios o anaerobios facultativos.

La mayoría de microorganismos presentes en el rumen funcional son anaeróbicos, y estos pueden ser bacterias, protozoos y hongos. El número relativo de las diferentes especies dependerá de la composición y estructura de la dieta, así como de las múltiples interacciones entre ellos (Ørskov, 1992).

Algunos de los géneros bacterianos más importantes, por su capacidad para degradar a los principales carbohidratos (glúcidos) de los alimentos son: *Bactericidas*, *Ruminococos*, *Sucdnomonas*, ciertos *Clostridios*, *Celobacterias* y *Butirivibri* (Hungate, 1966).

#### 2.1.2.1 Bacterias

En el rumen se encuentra entre  $10^{10}$  y  $10^{11}$  bacterias/ g de contenido ruminal. Estas bacterias se pueden agrupar en 32 géneros y 63 especies, de las cuales 16 géneros y 28 especies se consideran funcionalmente importantes en términos de número y metabolismos (Yakohama y Johnson, 1988). Son el grupo de microorganismos mas abundantes, representan aproximadamente la mitad de la biomasa ruminal, y una mayor proporción de la actividad metabólica ruminal, que esta inversamente relacionada con el tamaño del microorganismo (Ørskov, 1992).

Las bacterias se pueden clasificar en función del sustrato que utilizan, de los productos formados o de sus requerimientos nutricionales. En función de su principal sustrato de fermentación, se puede clasificar en microorganismos que degradan celulosa, hemicelulosa, almidón, azúcares, ácidos intermedios, proteína, pectina o lípidos. En una clasificación más extensa se puede incluir el

grupo de bacterias productoras de metano, de amoniaco, y bacterias con actividad ureasa (Cuadro 1).

Cuadro 1. Clasificación de las principales especies bacterianas del rumen según el tipo de sustrato que fermentan

<b>Principales especies celulolíticas</b>	<b>Principales especies proteolíticas</b>
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	<i>Ruminobacter amylophilus</i>
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	<i>Prevotella ruminicola</i>
<i>Ruminococcus albus</i>	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	<i>Streptococcus bovis</i>
<b>Principales especies hemicelulolíticas</b>	<b>Principales especies ureolíticas</b>
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	<i>Succinivibrio dextrinosolvens</i>
<i>Prevotella ruminicola</i>	<i>Selenomonas sp</i>
<i>Ruminococcus sp</i>	<i>Prevotella ruminicola</i>
	<i>Ruminococcus bromii</i>
	<i>Butyrivibrio sp</i>
	<i>Treponema sp.</i>
<b>Principales especies pectinolíticas</b>	<b>Principales especies productoras de amoniaco</b>
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	<i>Prevotella ruminicola</i>
<i>Prevotella ruminicola</i>	<i>Megasphaera elsdenii</i>
<i>Lachnospira multiparus</i>	<i>Selenomonas ruminantium</i>
<i>Succinivibrio dextrinosolvens</i>	
<i>Treponema bryantii</i>	
<i>Streptococcus bovis</i>	
<b>Principales especies amilolíticas</b>	<b>Principales especies productoras de metano</b>
<i>Ruminobacter amylophilus</i>	<i>Methanobrevibacter ruminantium</i>
<i>Streptococcus bovis</i>	<i>Methanobacterium formicicum</i>
<i>Succinomonas amylolytica</i>	<i>Methanomicrobium mobile</i>
<i>Prevotella ruminicola</i>	

Principales especies utilizadoras de azucares	Principales especies utilizadoras de lípidos
<i>Treponema bryantii</i>	<i>Anaerovibrio lipolytica</i>
<i>Lactobacillus vitulinus</i>	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>
<i>Lactobacillus ruminus</i>	<i>Treponema bryantii</i>
	<i>Eubacterium sp</i>
	<i>Fusocillus sp</i>
	<i>Micrococcus sp</i>

---

#### Principales especies utilizadoras de acidos

*Megasphaera elsdenii*  
*Selenomonas ruminantium*

---

Fuente: Yakohamo y Johnson, 1988.

Esta clasificación no es absoluta, debido a que las bacterias se pueden especializar mucho, poco o nada en cuanto al tipo de sustrato que fermentan y la mayoría de ellas tienen la capacidad de degradar varios sustratos; por ejemplo, la actividad proteolítica se ha descrito en el 38% de las bacterias ruminales (Yakohama y Johnson, 1988). Al haber especies que se superponen en la utilización de un determinado sustrato, aumenta la eficacia de utilización de dicho sustrato y al ser ésta una población diversa, la fermentación será más estable, evitándose grandes fluctuaciones en las cantidades y proporciones de los productos finales formados (Yakohama y Johnson, 1988).

Las bacterias del rumen se han agrupado, según el sustrato que fermentan en forma predominante, de la siguiente manera:

a) Bacterias celulolíticas: son las que producen celulasa, que es una enzima extracelular capaz de hidrolizar los enlaces  $\beta$  de la celulosa, produciendo celobiosa. Algunas de ellas también aprovechan la celobiosa (Bryant, 1953).

b) Bacterias hemicelulolíticas: son bacterias capaces de degradar a las hemicelulosa, liberando pentosas, hexosas y ácidos úricos, convirtiéndolos en glucosa o fructosas (Bryant, 1953).

c) Bacterias amilolíticas: estas utilizan los almidones como sustrato pues poseen una amilasa que hidroliza enlaces  $\alpha$  1-4 produciendo maltosa, que por acción de la maltasa se convierte en glucosa (Bryant, 1953).

d) Bacterias que utilizan azúcares solubles: éstas dependen de la actividad de las anteriores, que son las que producen glucosa, xilosa y otros azúcares solubles a partir de las celulosas, almidones, hemicelulosas, etc, transformándolas en ácidos grasos volátiles (Bryant, 1953).

e) Bacterias lipolíticas: poseen estererasas que hidrolizan a los triglicéridos, fosfolípidos y ésteres de ácidos grasos (Bryant, 1953).

f) Bacterias proteolíticas: producen enzimas hidrolíticas que rompen enlaces peptídicos y finalmente ácidos aminoácidos.

g) Bacterias que utilizan ácidos: actúan sobre los productos finales de la actividad de las bacterias de los grupos anteriores, utilizando como sustrato diferentes tipos de ácidos, por lo que ayudan a su eliminación del medio (Bryant, 1953).

Además hay otros tipos de bacterias capaces de producir amoníaco a partir de los aminoácidos, por mecanismos de desaminación; las metanogénicas que producen metano a partir de hidrógeno y bióxido de carbono y otras que sintetizan vitaminas (Bryant, 1953).

#### 2.1.2.2. Protozoos

Los protozoos constituyen el grupo microbiano con el papel más controvertido en el rumen. El número de protozoos es de  $10^5$ - $10^6$  células/mL de contenido ruminal, siendo la mayoría especies ciliadas. Se puede clasificar en dos subclases, *Entodiniomorfa* y *Holotrica*, (Hungate, 1966) (Cuadro 2). Los protozoos pueden no estar presentes en el rumen o llegar a representar el 2% del peso del contenido ruminal. El 40% del nitrógeno microbiano total y

proporcionar el 60% de los productos de fermentación microbiana. Sin embargo, su contribución al flujo duodenal es mínima debido a tiempos de generación lentos y a una alta retención ruminal mediante su adhesión a las partículas de alimentos o, en el caso de los holótricos, a la pared reticular durante los intervalos entre comidas (Abe y *et. al.*, 1981).

Cuadro 2. Clasificación de los principales protozoos ruminales con los sustratos de fermentación preferente

<b>Subclase</b>	<b>Género</b>	<b>Sustrato fermentado</b>
<i>Holotrica</i>		
	<i>Isotrica</i>	Almidón y azúcares
	<i>Dasytrica</i>	Almidón y azúcares
<i>Entodiniomorfa</i>		
	<i>Entodinium</i>	Almidón
	<i>Epidinium</i>	Almidón y hemicelulosa
	<i>Ophryoscolex</i>	Almidón
	<i>Diplodinium</i>	Celulosa
	<i>Polyplastron</i>	Celulosa
	<i>Eudiplodinium</i>	Celulosa

Fuente: (Hungate, 1966).



### 2.1.2.3 Hongos

Se descubrió su presencia en el rumen en los años 70. Anteriormente la fase móvil o zoosporo era confundida con un protozoo flagelado y la fase vegetativa o esporangio, siempre adherida a las partículas de fibra no era identificada al estudiar el filtrado de líquido ruminal (Ørskov, 1992). Los géneros más frecuentes en el rumen son *Neocallimastix*, *Caecomyces*, *Pyromyces* *Orpinomyces* (Van Soest, 1982).

El hecho de que los hongos no predominen en el rumen se debe a su lento tiempo de generación en comparación con las bacterias, 6-9 Vs 0.5-3.5 h, y su paso a duodeno, aunque no ha sido estimado, también debe ser muy bajo (Varga y Kolver, 1997). En dietas forrajeras pueden representar el 8% de la masa microbiana (Orpin, 1981), pero su número se reduce en dietas ricas en concentrado o en forrajes de alta calidad con tiempos de retención más cortos. Tienen actividad celulasa y hemicelulasa, pero no pueden degradar la pectina y el ácido poligalacturónico (Fonty y Joblin, 1991). No hay evidencia de que degraden la lignina, pero sus rizoides la pueden penetrar y facilitar la degradación de la pared celular (Van Soest, 1982).

### 2.1.3 Metabolismo microbiano

Los carbohidratos y la proteína son los principales sustratos fermentables para la población microbiana. De estos nutrientes obtendrán la energía y los compuestos nitrogenados para su crecimiento.

#### 2.1.3.1 Degradación de la proteína

La proteína es un nutriente esencial en la nutrición de todas las especies animales. En los rumiantes, el objetivo de la nutrición proteica es doble, por una parte satisfacer las necesidades de nitrógeno de los microorganismos ruminales, y por otra, aportar aminoácidos al animal. Las necesidades de los microorganismos se pueden cubrir con fuente de nitrógeno proteico y no

proteico, en cambio, las necesidades del animal solo se puede cubrir con aminoácidos que puedan ser de origen dietario o microbiano.

A diferencia de lo que pasa en monogástricos, el perfil y la calidad de los aminoácidos que llega al duodeno es diferente del aportado en la ración, debido a la degradación ruminal de los aminoácidos dietarios y al aporte de proteína microbiana. Sintetiza a partir de la energía derivada de los carbohidratos y de compuestos nitrogenados simples (Wallace y Cotta, 1988). Esta proteína microbiana junto con la proteína que escapa de la degradación ruminal es directamente disponible para ser digerida y absorbida por el rumiante.

La hidrólisis de la proteína en el rumen es un proceso complejo de varias etapas. En primer lugar se solubiliza la fracción soluble; después se adhieren los microorganismos a la proteína insoluble y en ese punto la cadena peptídica es atacada por diversas exo y endo- proteasas, liberándose péptidos y aminoácidos. Estos péptidos y aminoácidos libres serán absorbidos rápidamente por los microorganismos para ser incorporados directamente a la síntesis proteica o para ser descarboxilados y desaminados produciendo AGV, CO<sub>2</sub>, y amoníaco (Owens y Zinn, 1988).

El rumiante provee los nutrientes que permiten el crecimiento y desarrollo de los microorganismos ruminales. Todo el C, N, P, S y elementos trazas necesarios son aportados por el alimento que consume el animal (Grudsky y Arias, 1983).

Es sabido que la mayoría de los distintos tipos de bacterias existentes en el rumen utilizan al NH<sub>3</sub> como fuente de nitrógeno para sintetizar su proteína. El NH<sub>3</sub> ruminal es aportado por la proteína degradada en rumen, como también por el nitrógeno no proteico dietario y endógeno. Es, por lo tanto, un buen indicador de la disponibilidad de nitrógeno para la biomasa ruminal la concentración de NH<sub>3</sub> en el líquido ruminal (Grudsky y Arias, 1983).

La concentración de promedio de NH<sub>3</sub> ruminal reportada en la literatura fluctúa desde 0.8 a 56.1 mg/100 mL de líquido ruminal, aumentando con el

porcentaje de proteína dietaria. Hasta la fecha, no se ha establecido en forma precisa cuál es la concentración de  $\text{NH}_3$  en el líquido ruminal que permite sustentar un óptimo crecimiento microbiano; sin embargo, algunos autores han observado que concentración entre 5 y 10 mg  $\text{NH}_3$ /100 ml de líquido ruminal, no limitarían el crecimiento microbiano, según resultados obtenidos tanto *in vivo* como *in vitro*; estas concentraciones en el fluido ruminal se obtienen cuando la dieta contiene niveles de proteína cruda cercanos a 11-14% (Grudsky y Arias, 1983).

## 2.2 Subproductos agroindustriales empleados en la alimentación de ganado

De la producción y procesamiento de alimentos para el hombre se originan numerosos subproductos y residuos que pueden ser destinados a la alimentación animal. Un número importante de los mismos tienen características nutritivas diferentes según su origen y el tipo de procesos industriales. En general, presentan la particularidad de ser muy concentrados en uno o más de sus nutrientes (proteínas, lípidos, etc.) por lo que se deben analizar cuidadosamente para así poder combinarlos en forma correcta con otros alimentos en dietas equilibradas (Morales, 1987).

### 2.2.1 Subproductos de origen animal

En términos generales, son alimentos que contienen proteínas de alta calidad con un excelente balance de aminoácidos y muy ricos en minerales y vitaminas. Con excepción de los provenientes de la industria lechera, las proteínas son de baja degradabilidad ruminal (denominadas "by pass"). Para la utilización de este grupo de alimentos, D'Ascanio en 1992 reporta que se deben tener en cuenta las siguientes consideraciones:

- Los subproductos de origen animal normalmente contienen importantes cantidades de grasa y son muy propensos a sufrir procesos de oxidación y rancidez.

- Deben ser procesados y almacenados adecuadamente para prevenir el crecimiento y contaminación con microorganismos.
- En general son comparativamente más caros que los subproductos de origen vegetal.

#### 2.2.1.1 Industrias lácteas

De los procesos industriales de la leche se obtiene una amplia variedad de productos para el consumo humano y animal. En líneas generales los subproductos de esta industria son de alta calidad en proteína y aminoácidos, lactosa (azúcar de la leche), minerales y vitaminas. El suero de la leche es uno de los subproductos de mayor volumen y es usado en nuestro país en la producción intensiva de cerdos y, en menor medida, en la crianza artificial de terneros de tambo. Existen también antecedentes de uso en la suplementación de alimentos de vacas lecheras y novillos en pastoreo (De Visser y Steg., 1988).

Además del suero existen otros subproductos como: la albúmina, la caseína, el barrido de la leche en polvo, distintos tipos de sueros tratados (condensados, secos, hidrolizados y fermentados), etc. En general se recomienda que este tipo de subproductos no superen el 25 % del consumo total de materia seca (MS), siendo la principal limitante en la alimentación de rumiantes el costo relativo de estos alimentos (De visser y Steg., 1988).

#### 2.2.1.2 Industria pesquera

Los subproductos de esta industria consisten en los desechos del procesamiento del pescado, conjuntamente con otras especies marinas. Estos alimentos son una fuente muy rica de nutrientes, principalmente proteínas, vitaminas y minerales. Los más comúnmente utilizados son las harinas (con o

sin extracción de aceite) y el soluble de pescado (D'Ascanio, y Peruchena, 1992).

En rumiantes el uso de las harinas se restringe a animales de muy alto mérito genético, siendo considerada como una excelente fuente de proteína no degradable, además de vitaminas y minerales. El contenido proteico puede variar entre 400 y 700 g/Kg dependiendo del tipo de pescado del cual se obtuvo. Desde un punto de vista nutricional, la incorporación de harina de pescado en la dieta de rumiantes se debe realizar a partir de un correcto balance de las fracciones degradables y no degradables de la proteína y en función del requerimiento de los animales. Su uso masivo esta normalmente limitado por el precio (D'Ascanio, y Peruchena, 1992).

#### 2.2.1.3 Industria frigorífica

Dentro de este grupo de subproductos se encuentran las harinas de carne con y sin hueso, harina de plasmas, harina de huesos y las grasas y aceites. Como las harinas de pescado, éstas son muy ricas en proteína de baja degradabilidad ruminal. La utilización de harina de carne y de hueso de origen bovino y ovino para la alimentación de rumiantes, fueron prohibidos por el Servicio Nacional de Sanidad Animal (SENASA; resolución No 252 del 12 de mayo de 1995). Dicha prohibición obedece a medidas de prevención contra la encefalopatía espongiforme bovina, también conocida como “enfermedad de la vaca loca”.

Las harinas sangre y plasma están indicadas para raciones de vacas lecheras de alta producción. Son alimentos de escasa palatabilidad por lo que su incorporación en la dieta debe ser gradual, siendo a menudo mezcladas con melaza. Las grasas y aceites son fuentes muy concentradas de energía que son utilizados para aumentar la concentración energética de las dieta, sobre todo en raciones de vacas de alta producción. Cantidades excesivas en la dieta (más del 9%), puede comprometer la digestión de la fibra y reducir el consumo de alimento (Castillo y Gallardo, 1989).

#### 2.2.1.4 Producción avícola

Los establecimientos intensivos de producción avícola tienen una alta producción de excremento que son comúnmente utilizados como fertilizantes. En la actualidad se ha difundido el uso de dichos excrementos (“cama de pollo” fundamentalmente) para la alimentación de rumiantes. Se entiende por “cama de pollo” al conjunto de excretas y orina de las aves, más restos de alimentos, plumas, huevo y material absorbente. Se caracteriza por ser materiales de bajo valor energético y alto en proteínas, fibra y minerales. La proteína se presenta con una alta proporción de nitrógeno no proteico, por lo que su uso se destina exclusivamente a la alimentación de rumiante (Castillo y Gallardo, 1989).

Existen diferencias substanciales en la composición química de estos materiales en función de su origen, siendo necesario un análisis químico previo a la utilización. La información relacionada con el uso de cama de pollo para animales de carne, indica que estas podrían participar en la dieta en niveles de hasta un 30-40%, aunque existen antecedentes de inclusiones de 60-70% en animales de menores requerimientos. En ganado lechero con químicas producciones intermedias a bajas no deberían sobrepasar un 25-30% del consumo disminuyendo factores a 10-15 en rodeos de alta producción. Además de lo mencionado, se debe considerar por un lado la probable contaminación de estos productos con sustancias químicas (anabólicos, antibióticos, etc.), y por otro, la posibilidad de contaminación con organismos patógenos, principalmente *Salmonella*. Al respecto, las recomendaciones de distintas fuentes bibliográficas indican la posibilidad de ensilado de este tipo de material con las siguientes ventajas: bajo costo, disminución de organismos potencialmente patógenos, mayor palatabilidad y disminución de aromas no deseables (Castillo, y Gallardo. 1989).

### 2.2.2 Subproductos de origen vegetal

Casi todos los tipos de vegetales que son producidos y/o procesados para la alimentación humana tienen algún subproducto que puede ser utilizado para la alimentación animal. En nuestro país estos subproductos son un importante componente en la elaboración de balanceados comerciales o en raciones elaboradas a campo. Un aspecto interesante a destacar es la posible contaminación de alguno de estos alimentos con pesticidas y/o aflatoxinas, constituyendo una de las principales desventajas a considerar en la suplementación de vacas lecheras. Las aflatoxinas son sustancias hepatotóxicas y cancerígenas que, además del daño producido en el animal, se traspasan a la leche (aproximadamente un 10% del total ingerido), siendo la población infantil particularmente sensible a estas micotoxinas. En la actualidad existen fuertes restricciones en los países desarrollados (principalmente la comunidad económica Europea) para importar alimentos contaminados con las sustancias mencionadas (Castillo, y Gallardo, 1989).

#### 2.2.2.1 Industria aceitera

Distintas semillas oleaginosas son producidas en todo el mundo como fuentes de aceites vegetales con distintos usos en la industria o para el consumo humano. El residuo del procesamiento de estas semillas es un producto rico en proteínas de gran valor en la alimentación del ganado en general (aves, cerdos y rumiantes), este grupo de subproductos se presenta normalmente en el comercio en forma de pellets o de harinas. Su valor alimenticio varía con la composición química de la semilla original y con el método de extracción del aceite (por solventes o por medios mecánicos (Ensminger, y Heinemann, 1990).

En general las harinas obtenidas por extracción mecánica, contienen mayor cantidad de aceite y fibra y menor porcentaje de proteínas que aquellas obtenidas por extracción con solventes. Actualmente, los pellets y las harinas más ampliamente utilizadas en el mundo provienen del procesamiento de la

soja, por lo que ésta es usada como estándar comparativo respecto a las otras. Muchas de las harinas de semillas oleaginosas son similares a la de la soja en su composición química, pero su uso se encuentra a veces limitado por problemas de suministro y disponibilidad, factores antinutricionales (por ejemplo gossipol en algodón) o falta de palatabilidad (Ensminger, y Heinemann, 1990).

#### 2.2.2.2 Industria molinera

La mayoría de los granos de cereales son molidos y procesados de alguna manera para ser preparados para el consumo humano. En este proceso se obtienen una amplia variedad de subproductos que pueden ser usados extensivamente en la alimentación animal y que difieren, en función de la intensidad del procesamiento, en su valor nutritivo. Muchos de estos subproductos son una excelente fuente de energía y algunos también tienen elevados contenidos de proteína. Aunque el contenido de Ca y P puede ser bajo, son buenos suplementos en las dietas de vacas lecheras pudiendo participar en un 25 a 50 % (Ensminger, y Heinemann, 1990).

Los más importantes subproductos de la industria molinera son:

- Afrechillos: representa el pericarpio de la semilla y se obtiene en el proceso de separación del almidón. Los de importancia cuantitativa para nuestro país son los de trigo, maíz y arroz. Son por su origen, alimentos con altos contenidos de pared celular. La calidad de los afrechillos depende en gran medida de la eficiencia en el proceso de separación del almidón.
- Gluten: es la sustancia remanente después de la extracción de almidón y el jarabe. Se comercializan en el caso del maíz como “corn gluten feed” y “corn gluten meal”, con contenidos de proteínas de 23 y 60% respectivamente, de baja degradabilidad ruminal (50%). En caso del sorgo, la harina de gluten se la denomina burlanda y posee no menos de 45% de proteína (Ensminger, y Heinemann, 1990)



### 2.2.2.3 Industria frutihortícola

Las frutas y hortalizas suelen ser considerados interesantes recursos en la alimentación del ganado. En líneas generales pueden tener tres orígenes:

- Desechos en la clasificación por calidad, ya sea por tamaño y por daño
- Residuos dejados en el campo, y
- Residuos del enlatado y la producción de jugos.

Debido a la gran diversidad de productos que comprenden este grupo de alimentos, como característica general se podría decir que son pobres en calcio y fósforo, tiene muy buena digestibilidad y concentración energética, alto contenido de azúcares solubles, bajos contenidos de proteína y bajos porcentajes de materia seca. Con la excepción de pellet de pulpa de citrus, proveniente de la producción de jugos, los alimentos derivados de la industria frutihortícola presentan una serie de problemas, como ser altos contenidos de agua, disponibilidad estacional, transporte, almacenaje, manejo y distribución al ganado tiempo de deterioro, etc. Es por ello que su uso debe estar muy bien planificado y en lo posible cerca de las áreas de producción (Ensminger, y Heinemann, 1990).

### 2.2.2.4 Industria azucarera

Este grupo de subproductos se obtiene de las distintas etapas del procesamiento de la caña de azúcar. Los más utilizados en el país son la melaza, como producto secundario del refinamiento del azúcar, y el bagazo, que consiste en las cañas después de la extracción de los jugos azucarados por trituración con rodillos. La melaza es muy palatable y es considerada como una excelente fuente de energía. Si bien en nuestro país fue usada para la fabricación dealconaftas, en la actualidad debería ser tenida en cuenta como un ingrediente importante en las raciones de vacas lecheras. La melaza es un excelente saborizante, mezclada con alimentos molidos, es muy buen aglutinante para el peleteado, estimula la actividad de los microorganismos

ruminales, provee minerales traza y puede ser utilizada como vehículo de urea, minerales y vitaminas (D'Ascanio, y Peruchena, 1992).

En otros países la melaza es normalmente incluida en proporciones variables (entre 3 a 15% de la dieta). Aunque existen antecedentes de mayor participación (superior al 15%), podrían causar que el alimento se torne inmanejable y extremadamente pegajoso (AFRC, 1993).

El bagazo es un subproducto de muy alto contenido de fibra, por lo que tiene una baja digestibilidad (alrededor del 25%) y debe ser considerado como un forraje de emergencia. No debería incluirse en las dietas en proporciones mayores al 10% (AFRC, 1993).

#### 2.2.2.5 Industria cervecera

Existen distintos subproductos provenientes de esta industria, siendo los más comunes la hez de malta (seca y húmeda) y los granos de destilería, principalmente cebada con mezclas de maíz y en algunos casos arroz (seco, húmedo o ensilado). Se deben tener precauciones en el almacenaje, duración y protección de aquellos subproductos húmedos ya que se degradan con facilidad. Estos subproductos son en general muy palatables, ricos en proteínas con una degradabilidad intermedia y son considerados, desde un punto de vista nutricional, como un muy interesante ingrediente en raciones para vacas lecheras. Existen evidencias de reducciones en el consumo y la producción de leche si participan por encima del 20% de la ración ofrecida en base materia seca como granos de destilería húmedos (D'Ascanio, y Peruchena, 1992).

La levadura se obtiene cuando se separa el mosto fermentado y se elimina el sabor amargo a través de varios lavados con álcali diluido y la crema final se deseca, muele y empaqueta. La crema final o lechada, es el subproducto que aun no ha sido desecado y en su estado líquido puede ser utilizado en la alimentación de ganado. Esta crema final de levadura (lechada o licor de cerveza) aumenta el consumo de alimento y la producción de leche, y se le atribuye un valor nutritivo similar a la pasta de soya en las dietas para

ganado productor de leche. Sin embargo, la limitante para la incorporación de la crema final en las dietas de ganado lechero es su bajo contenido de materia seca. Otra limitante importante es el costo que debe pegarse por el flete para trasladarla a la explotación, razón por la cual los ranchos que se localizan cerca de las plantas productoras de cerveza son las más beneficiadas con la utilización de estos subproductos (Llamas, 2008).

#### 2.2.2.5.1 Masilla

Subproducto de la industria cervecera resultante del proceso de prensado y filtración del mosto obtenido tras la sacarificación del grano de cereal (cebada, básicamente) malteado. Es un producto húmedo cuyo contenido en materia seca es de 20-25 %. No se observan diferencias significativas en la composición química correlacionadas con el contenido de materia seca, aunque éste es viable, en el mercado recibe otros nombres como el de cebadilla de cerveza o masilla, y es el término equivalente a lo que el mundo anglosajón conoce como “wet brewers grains” (Llamas, 2008)

El bagazo de cerveza es un subproducto rico en proteína, siendo su contenido proteico promedio de un 24-26% sobre la materia seca. El extracto etéreo representa un 6 %. Es un subproducto rico también en fibra, con un contenido en fibra detergente neutra (FND) del 44% y en fibra detergente ácida (FAD) del 20%, aunque se trata de una fibra muy poco efectiva (18%). El contenido en lignina es de un 5% y el de ceniza de un 7%. En el residuo mineral destaca el contenido en P (6 g/Kg), siendo mas bajo (3 g/Kg) el contenido en Ca (Calsamiglia, 2004).

#### 2.2.2.5.2 Levadura

Las levaduras se han administrado a los animales en el alimento durante mas de 100 años, ya sea en la forma de una masa fermentada producida en el rancho, subproductos de levadura específicamente para la alimentación animal. Aun cuando esta práctica de utilizar las levaduras en los alimentos pecuarios

han existido durante mucho tiempo, todavía no hay mucha difusión o existe confusión en la industria para utilizarlas. Pero por donde se observe el uso de levaduras tiene grandes beneficios, ya que la levadura en sí, proporciona vitamina del complejo B, minerales, es una fuente de proteína y de aminoácidos. Aproximadamente el 40% del peso de la levadura seca consiste en proteína (Llamas, 2008).

La levadura puede ser presentada en diferentes concentraciones de proteína desde levaduras de 30% hasta levaduras de 45%. Hay también diferentes tipo de coloración de las levaduras, que pueden variar debido la característica del proceso de producción, de secado, o hasta mismo debido la época de producción.

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* puede tener 3 variantes, es decir, que sea:

Levadura activa: levadura viable con un conteo de 10 mil a 20 mil millones de células vivas por gramo, esta levadura se utiliza principalmente como probiótico, algunas de sus funciones reportadas por García (2007) son:

- Promotor de crecimiento.
- Mejores animales
- Aumenta la producción de leche materna
- Mayor ganancia de peso
- Conversión de alimenticia a mayor velocidad.
- Reduce el exceso de amoniaco.
- Acción estimulante de la inmunidad.
- Corrige el balance de la población microbiana

Levadura inactiva: esta levadura, tiene casi nula viabilidad, prácticamente  $1.0 \cdot 10^2$  células vivas por gramo. El hecho de hacerse inactiva es para aprovechar otras bondades cuando es fermentada pH bajo, como es el ser apetecible por ciertas especies que no toleran fácilmente consumir alimentos de origen vegetal.

Algunas ventajas que ofrece la levadura inactiva (García 2007) son:

- Fuente natural rica en proteínas
- Mejora la palatabilidad del alimento
- Buen equilibrio de aminoácidos esenciales, con niveles altos de Usina.
- Es una fuente natural de vitaminas del complejo B
- Es un buen complemento del alimento balanceado

Levadura inactiva enriquecida: en esta levadura lo que se trata de aprovechar principalmente, es que se esta enriqueciendo orgánicamente con algún micromineral, lo que se traduce en una mejor biodisponibilidad de este, hay una mejor retención del micromineral orgánico, además que hay una menor posibilidad de intoxicación, siempre y cuando se aplique a las dosis recomendada. En estas levaduras podemos encontrar las enriquecidas con selenio, cromo, hierro, zinc, manganeso, cobre, molibdeno, etc. (García, 2007).

#### 2.2.2.5.2.1. Estructura de *Saccharomyces cerevisiae*

*S. cerevisiae* tiene generalmente una forma elipsoidal, con un diámetro que varía de 5 hasta 10 micrómetros. El tamaño celular aumenta con la edad de la célula. Estructuralmente, la *S. cerevisiae* está compuesta por tres constituyentes:

- Pared celular: Constituidos por polisacáridos (80-90%), glucanos, mananos y pequeños porcentajes de quitina, otros componentes de pared celular son proteínas, lípidos y fosfatos.
- Membrana plasmática: la función es mantener la permeabilidad selectiva y regular la nutrición celular, absorción de carbohidratos, compuestos nitrogenados.
- Material celular o extracto: constituido por componentes intracelulares, el componente celular es rico en inositol, glutamato que tiene efectos positivos sobre la palatabilidad y nucleótidos que tienen beneficios en el sistema inmune.

#### 2.2.2.6 Industria vitivinícola

La pomasa o pulpa de uvas es el residuo de la producción de vino o jugos. Está compuesta principalmente de los tallos, semillas, pulpa y hollejo u orujo de la uva. Es un recurso de baja calidad, alto en fibra y de baja concentración energética. Se recomienda para la alimentación del ganado de carne o en animales no lactantes en proporciones no mayores a unos 20% de la dieta total, previamente equilibradas (Ensminger, y Heinemann, 1990).

### 2.3 Proteasas

Las enzimas son polímeros de aminoácidos que dirigen la actividad catalítica en distintos sistemas biológicos, gracias a su capacidad de acelerar reacciones químicas. Durante los últimos años, utilidad en gran cantidad de industrias han adquirido gran relevancia; siendo las proteasas el grupo de enzimas de mayor importancia industrial y comercial a escala internacional (Haard y col., 2000, Montes y Magaña, 2000). Casi la mitad de las enzimas industriales son proteasas y se utilizan en los detergentes, en procesos de ablandamiento de pieles, en la manufactura de quesos, etc. (Haard y *et. al.*, 2000)

#### 2.3.1 Clasificación

En 1960, Hartley sugirió que era conveniente dividir a las enzimas proteolíticas o proteasas, con base a su mecanismo de acción, en 4 grupos: a) serina-proteasas: b) Aspártico- proteasas c) Sulfhidril-proteasas, también llamadas tiol proteasas o cisteína proteasas y d) metalo-proteasas (Whitaker, 2000).

La mayoría de las proteasas comerciales, principalmente la neutral y alcalina, son producidos por organismos que pertenecen al género *Bacillus*. Las proteasas bacterianas neutrales son activos en un rango de pH (pH de 5 a 8) y son relativamente tolerantes a temperaturas bajas. Las proteasas neutrales generan menos hidrólisis de proteínas en los alimentos que las proteínas de los animales, por lo tanto, son más valiosas para su uso en la industria alimentaria,

una proteasa neutra es insensible a los inhibidores de la proteasa neutral de plantas y por lo tanto es útil en la industria cervecera (Whitaker, 2000).

La mayoría de las proteasas bacterianas son neutras por su gran afinidad por los pares de aminoácidos hidrofóbicos, su termotolerancia baja es ventajosa para el control de reacción durante la producción de alimentos de bajo grado de hidrólisis. Algunas de las proteasas neutras pertenecen al tipo de metaloproteasas y requieren de iones metálicos divalentes para su actividad, mientras que otras son proteasas, que nos se ven afectados por los agentes quelantes. Las proteasas bacterianas alcalinas se caracterizan por su alta actividad a pH alcalino, (pH 10) y su amplia especificidad de sustrato. Su temperatura óptima es alrededor de 60°C. Estas propiedades de las proteasas bacterianas alcalinas las hacen adecuadas para su uso en la industria de detergentes (Brock, 1961).

### 2.3.2 Fuentes de proteasas

Dado que las proteasa son fisiológicamente necesarias para la vida misma, se encuentran en una amplia diversidad de fuentes, tales como, plantas, animales y microorganismos.

#### 2.3.2.1 Proteasas de origen vegetal

El uso de plantas como fuente de proteasas se rige por varios factores, tales como disponibilidad de tierras para el cultivo, condiciones climáticas para el crecimiento. La papaína, bromelina, keratinasas y la ficina representan algunos de las proteasa conocidas de origen vegetal (Rao, 1998).

#### 2.3.2.2 Proteasas de origen animal

Las proteasas mas familiares de origen animal son de páncreas, dentro de las que destacan la tripsina, la pepsina y la renina. Estos son preparados en forma pura en grandes cantidades. Sin embargo, su producción depende de la

disponibilidad de ganado, que a su vez se rige por las políticas agrícolas (Rao, 1998).

### 2.3.2.3 Proteasas de origen microbiano

La incapacidad de las planta y animales para satisfacer las demandas actuales de proteasas han logrado un alto interés en las proteasas de origen microbiano. Los microorganismos representan una excelente fuente de enzimas, debido a su amplia diversidad bioquímica y su susceptibilidad a la manipulación genética. Las proteasas microbianas representan aproximadamente el 40 % de las ventas totales a nivel mundial. Las proteasas de origen microbiano son más preferidas que las enzimas de plantas y animales, ya que poseen casi todas las características deseadas para sus aplicaciones biotecnológicas (Rao, 1998). Se han reportado la obtención y purificación de proteasas de diversas fuentes como las de origen:

Bacteriano: La mayoría de las proteasas comerciales, principalmente neutral y alcalino, son producidas por los organismos que pertenecen al género *Bacillus*. Las proteasas neutrales bacterianas son activas en una gama estrecha del pH (el pH 5 a 8) y tiene termotolerancia relativamente bajo. Debido a su índice intermedio de reacción, las proteasas neutrales generan menos amargura en proteínas hidrolizadas del alimento que las proteinasas animales y por lo tanto tienen valores para el uso en la industria alimentaria. Una proteasa neutral, es insensible a los inhibidores naturales de las proteasas de las plantas y es por lo tanto útil en el sector cervecero.

Hongos: Los hongos elaboran una variedad más amplia de enzimas que las bacterias. Por ejemplo, las *oryzae* del *Aspergillus* producen proteasa acidas, neutras y alcalinas. Las proteasas fungicidas son activas sobre una gama ancha del pH (pH 4 a 11) y exhiben especificidad amplia del sustrato. Sin embargo, tienen una tarifa más baja de la reacción y peor tolerancia de calor que las enzimas bacterianas. Las enzimas fungicidas se pueden producir convenientemente en un proceso de fermentación de estado sólido. Las



proteasas ácidas fungicidas tienen un pH óptimo entre 4 y 4.5 y son estables entre pH 2.5 y 6.0. Son particularmente útiles en la industria de la fabricación del queso debido a sus especificidades estrechas del pH y de la temperatura. Proteasas neutras fungicidas son activas en pH 7.0 y son inhibidas por los agentes quelantes.

Virus: Las proteasas virales han ganado la importancia debido a su implicación funcional en el proceso de proteínas de los virus que causan ciertas enfermedades fatales tales como SIDA y cáncer. Las peptidasas de la serina, aspárticas, y de la cisteína se encuentran en varios virus. Todas las peptidasas virus-codificadas son endopeptidasas; no hay metalopeptidasas. Los aspartilproteasa de Retroviral que se requieren para el ensamble y la replicación viral son homodímeros y se expresan como parte del precursor de poliproteínas. La proteasa madura es lanzada por el autólisis del precursor. Una literatura extensa está disponible en la expresión, la purificación, y el análisis enzimático de la proteasa aspártica retroviral y de sus mutantes. La investigación extensa se ha centrado en la estructura tridimensional de proteasas virales y su interacción con los inhibidores sintéticos con objeto de diseñar los inhibidores potentes que pueden combatir implacablemente la extensión y epidemia de la devastación del SIDA. Así, aunque las proteasas sean extensas en naturaleza, los microbios sirven como fuente preferida de estas enzimas debido a su crecimiento rápido, el espacio limitado requerido para su cultivación, y la facilidad con la cual pueden genéticamente ser manipulados para generar las nuevas enzimas con las características alteradas que son deseables para sus varios usos.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se realizó en los laboratorios del Departamento de Producción Animal de la UAAAN, el material biológico (levadura inactiva) fue proporcionado por la empresa Cervecería Cuauhtémoc Moctezuma, N. L. Este trabajo se dividió en 6 etapas, las cuales se describen a continuación:

**ETAPA I: Acondicionamiento de los animales en estudio, mediante una dieta balanceada adicionada de levadura inactiva y obtención de líquido ruminal.**

#### 3.1 Acondicionamiento del ganado Holstein y obtención de líquido ruminal

Se emplearon 4 animales multíparos de la raza Holstein, los cuales fueron sometidos a una dieta balanceada (cuadro 3) durante 120 días adicionada de levadura inactiva proveniente de la industria cervecera (Montero, 2009).

El líquido ruminal (400 mL) se obtuvo mediante el empleo de una bomba nasogástrica, el cual fue transportado en contenedores estériles bajo condiciones anaeróbicas y a una temperatura de  $40\pm 2^{\circ}\text{C}$  para mantener la viabilidad de los microorganismos presentes en él. Inmediatamente el líquido fue filtrado mediante el empleo de tela muselina y finalmente se centrifugó a 3000 rpm por 15 minutos para eliminar la mayor cantidad de materia orgánica presente.

Se realizó el estudio microbiológico lo más pronto posible, esto para evitar modificaciones en la proporción original de las poblaciones microbianas *in vivo*.

Cuadro 3. Dieta de ganado lechero alimentado con levadura

<b>Ingrediente</b>	<b>Kg</b>
Sorgo rolado	34.33
Salvadillo	5
Harinolina	8.37
Semilla de algodón	13
Silo maíz	5
Heno avena	0
Alfalfa	24
<b>Levadura</b>	<b>9</b>
Minerales	0.6
Bicarbonato	0.7
Consumo de Materia Seca	17.33

Fuente: Montero, 2009.

**ETAPA II:** Aislamiento preliminar y caracterización macroscópica de microorganismos procariontes en agar nutritivo

**3.2 Aislamiento de procariotas en agar nutritivo**

Se preparó el agar nutritivo (BIOXON) diluyendo 23 g de agar en 1000 mL de agua destilada, se solubilizó a flama de mechero para posteriormente esterilizarlo en una autoclave (PRESTO) a 121 °C a 15 Lb de presión por un tiempo de 15 min. Una vez esterilizado se vació de 15-20 mL del medio de cultivo en cajas petri. Posteriormente se sembró por el método de vertido en placa con la ayuda de una varilla de vidrio en forma de L llamada espátula de Drigalski-Conradi, (con el objetivo de que la muestra fuera homogénea en todo

el medio y así permitiera el crecimiento de todas las bacterias existentes en el líquido ruminal).

Se realizó una selección de microorganismos de interés en base a su crecimiento homogéneo, para el trabajo de investigación y luego se realizó la resiembra en medios sólidos. Las muestras se acondicionaron en anaerobiosis incubándolos en una incubadora (marca Arsa) a 40 °C por 24 horas para el crecimiento de los microorganismos anaerobios.

Después de 24 h transcurridas se sacaron las cajas de la incubadora y se realizaron resiembras por la técnica de estría abierta cruzada para la obtención de microorganismos parcialmente aislados; los cuales se obtuvieron tomando una asada de las muestras recolectadas de manera que se formara una burbuja uniforme en el ojo de la asa; esta gota fue extendida en un extremo del agar, a la cual se denomina “zona de descarga”, posteriormente se hicieron 3 diluciones por la técnica de estría abierta cruzada, calentando al rojo vivo el asa microbiológica cada vez que se estrió para empezar a lograr las primeras colonias microbianas aisladas. Se incubaron todas las cajas petri en condiciones de anaerobiosis dentro de botes anaeróbicas por 24-96 h a 40 °C.

### 3.3 Caracterización macroscópica de las cepas obtenidas

Una vez que se observó crecimiento uniforme (24-96 h) se registraron las características macroscópicas de las colonias como tamaño, color, forma, elevación, superficie, aspecto, bordes, luz translúcida, luz radiante y consistencia, para poder hacer comparaciones entre tratamientos. Cada colonia obtenida se identificó con un código.

### **ETAPA III: Aislamiento preliminar y caracterización macro- y microscópica de microorganismos procariontes en medios específicos para anaerobios**

#### **3.4 Aislamiento de procariontes en agar Scheadler**

Se empleó el agar Scheadler como medio de cultivo específico para anaerobios, haciendo un llenado de las cajas petrí de 15-20 ml de medio para poder realizar la resiembra, una vez identificadas las colonias bacterianas se prosiguió a resembrar en este medio, por la técnica de estría abierta cruzada para que se obtuvieran colonias parcialmente aisladas; se tomó una asada de las muestras recolectadas de manera que se formara una burbuja uniforme en el ojo de la asa, se extendió en un extremo del medio, la cual también es conocido como una “zona de descarga” se hicieron 3 diluciones, se quemó el asa microbiológica cada vez que se estriaba para evitar posibles contaminaciones del medio ambiente.

Las cajas sembradas se colocaron en un bote donde se realizó la anaerobiosis, se incubaron a 39-40 °C monitoreando a los 24 y 96 horas, dependiendo del crecimiento microbiano y se revisó que el aislamiento fuera favorable para la identificación macroscópica.

Después de que se observó crecimiento bacteriano se realizó la identificación macroscópica donde se registraron las siguientes características; tamaño, color, forma, elevación, superficie, aspecto, bordes, luz translúcida, luz radiante y consistencia. Se realizó la comparación de los resultados obtenidos de los diferentes animales.

Posteriormente se hizo un frotis de todas las colonias identificadas, de la siguiente manera; primero se agregó una gota de agua destilada sobre el portaobjetos y tomando una asada de las colonias bacterianas se realizó una dilución, el frotis se secó con calor, para después teñir las muestras mediante la técnica de Gram.

### 3.4.1 Identificación microscópica

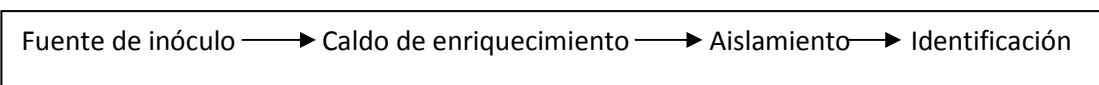
Con la ayuda del microscopio (Westover) a escala de 100X se hizo la identificación correspondiente, donde se lograron observar las células bacterianas que contenía las muestras teñidas, empleando aceite de inmersión para facilitar la observación. Se identificaron diferentes tipos de bacterias clasificándolos en cuanto a forma, tinción, tamaño, etc.

## ETAPA IV: Purificación y mantenimiento de las cepas aisladas

### 3.5 Purificación de cepas

Una vez que se logró observar cepas puras, se mantuvieron en tubos con agar Scheadler en forma de pico de flauta, para su posterior uso. Fueron almacenadas en condiciones anaeróbicas y codificadas.

Un esquema general para el enriquecimiento, aislamiento e identificación de microorganismos que se empleó fue el siguiente:



## ETAPA V: Identificación del metabolismo bioquímico de las cepas bacterianas obtenidas

### 3.6 Identificación del metabolismo microbiano

Se seleccionaron únicamente 10 cepas puras (por su crecimiento homogéneo, tiempo de crecimiento) y se realizó la caracterización del metabolismo bioquímico de las cepas bacterianas seleccionadas.

El agar se preparó en forma de pico de flauta esto con el fin de determinar la existencia de dos cámaras de reacción dentro del mismo tubo. La porción inclinada (pico) expuesta en todas sus superficies al oxígeno es aerobia

y la porción inferior (fondo) esta protegida del aire y es relativamente anaerobia. Las pruebas bioquímicas realizadas fueron las siguientes:

### 3.6.1 Agar MacConkey

Se prepararon 50 g de agar MacConkey en 1000 mL de agua destilada con la ayuda de un matraz Erlenmeyer, el cual se fundió y disolvió a flama de mechero, para después realizar la esterilización a 121 °C, a 15 Lb de presión por 15 minutos. Una vez esterilizado el medio se vació en tubos de 13\*100 mL inclinándolos en forma de pico de flauta.

Se inoculó cada una de las cepas puras y se incubaron a 40 °C por 24-48 horas hasta observar el cambio de color ya que era el tiempo en que reaccionaban las bacterias para adaptarse el medio, por que el agar McConkey es un medio diferencial que permite distinguir entre enterobacterias que hidrolizan lactosa y las que no lo hacen. La hidrólisis de la lactosa produce ácidos orgánicos y las colonias que la hidrolizan adquiriendo un color rojo. Las colonias lactosas negativas permanecen incoloras aunque el medio cambia a amarillo por la subida de pH que origina la utilización de las proteínas (peptona) del medio.

### 3.6.2 Agar citrato de Simmons

Se prepararon 24.2g de agar citrato de Simmons en 1000 mL de agua destilada con la ayuda de un matraz Erlenmeyer, el cual se fundió y disolvió a flama de mechero, para después realizar la esterilización a 121 °C, a 15 Lb de presión por 15 minutos. Una vez esterilizado el medio se vació en tubos de 13\*100 mL en forma de pico de flauta.

ETAPA VI: Empleo de un microorganismo procarionte para la producción de una proteasa, mediante el diseño de un medio de cultivo inductor

### 3.7 Producción de una proteasa

#### 3.7.1 Selección (ensayo):

Se eligió una cepa pura (crecimiento homogéneo y producción de pigmento) codificada con el número 652 col 2 para verificar la degradación de proteínas.

Se diseñó un medio sólido específico (cuadro 4) empleando como fuente de carbono caseína. El medio mineral fue esterilizado a 121°C por 15 min y una vez que alcanzó temperatura ambiente, se adicionó la fuente de carbono empleando leche descremada (Lala) tetrapack agitando suavemente para permitir su homogenización.

Cuadro 4. Composición química del medio sólido específico para el monitoreo de la degradación de la proteasa.

<b>Componentes</b>	<b>Cantidad (%)</b>
Agar bacteriológico	2 %
NaCl	0.5 %
NaNO <sub>3</sub>	0.3 %
KCl	0.5 %
Fuente de carbono (leche descremada)	1 %
MgSO <sub>4</sub>	0.01 %
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2 %

Se prosiguió a vaciar el medio en cajas Petri esperando hasta que se solidificara para poder realizar la siembra por estriado e incubando las cajas a 40 °C en condiciones de anaerobiosis por periodos de tiempo de 24 a 96 h o



hasta observar crecimiento uniforme; posteriormente se realizó la caracterización macro y microscópica del crecimiento celular.

### 3.7.2 Curva de crecimiento en medio líquido específico para anaerobios (tioglicolato de sodio)

Se preparó el medio por duplicado disolviendo 29.5 g de tioglicolato de sodio en 1000 mL de agua destilada, posteriormente se esterilizó. Este medio de cultivos fue seleccionado para favorecer el desarrollo del más amplio espectro de microorganismos posibles. El tioglicolato favorece el crecimiento de microorganismos anaerobios por ser un medio de bajo potencial redox, aunque permite también el desarrollo de microorganismos aerobios, a menos que estos sean facultativos y crezcan con o sin la presencia de oxígeno. Se incubó a 39-40 °C por 24 horas, los tubos con medio fueron envueltos en papel aluminio y tapados a flama de mechero sellándolo parcialmente con parafilm y protegiéndolos de la luz. . El bajo potencial de redox se logra con el agregado de reductores (cisteína y ácido tioglicólico) y un bajo porcentaje de agar que disminuye la difusión del oxígeno. El medio incluye resazurina como indicador del potencial redox. Se considera que el medio está apto para el uso cuando no mas del tercio superior del volumen total esta oxidado (rosado).

Se realizó un inóculo inicial de 50 µL del tubo con cultivo puro de la cepa seleccionada en tubos que contenían 4 mL de medio líquido (tioglicolato Na), se incubaron bajo condiciones anaeróbicas siguiendo una cinética de crecimiento celular tomando alícuotas por tiempos de 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 196 horas . La curva de crecimiento se determinó espectrofotométricamente a una longitud de onda de 590 nm mediante la técnica de turbidimetría.

### 3.7.3 Turbidimetría

Este método da información sobre el contenido de macromoléculas, y no sobre el número de células. En el laboratorio de microbiología se usa un espectrofotómetro y se mide la absorbancia de la suspensión de

microorganismos en comparación con un blanco que es el medio esterilizado, sin inóculos. Cuanto mayor es el número de células en suspensión, menor es el porcentaje de luz que atraviesa el medio. Se cumple una ley similar a la de Lambert-Beer y expresando la relación en términos de masa microbiana y absorbancia, la ecuación es la siguiente:

$$A = k \times W$$

Donde: A= absorbancia

k= constante

W= masa molecular

Para utilizar la medida de la absorbancia como método de recuento, es necesario hacer para cada microorganismo una curva de calibración, midiendo el número de microorganismo por otro método de recuento. El método se emplea fundamentalmente para preparar inóculos cuando se trabaja con cultivos puros.

#### 3.7.4 Curva de crecimiento en medio líquido específico para la producción de la enzima

Se preparó el medio líquido específico para inducir al microorganismo a producir la enzima proteasa. En un matraz Erlenmeyer se agregó 150 mL de agua destilada y se disolvió NaCl, NaNO<sub>3</sub>, KCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub> (cuadro 5) y después se solubilizó y esterilizó, posteriormente una vez que alcanzó la temperatura de 40 °C se le agregó la fuente de carbono (caseína), una vez mezclado todos los componente del medio se colocó 4 mL de medio en los tubos de 3\*100 mL por triplicado.

Se realizó una suspensión celular bacteriana (cada ensayo se realizó por triplicado), vaciando 4 mL de medio específico en un tubo, inoculando 10 µl de suspensión en todos los demás tubos; una vez terminada de hacer la

suspensión celular se incubaron los tubos a 40 °C y se monitoreó la cinética a tiempos de 0, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 y 192 horas, para posteriormente leer la absorbancia y obtener la velocidad específica de crecimiento, cada muestra que se sacaba de la incubadora inmediatamente se refrigeraba (Torrey) para inhibir la actividad microbiana

Cuadro 5. Composición química del medio líquido específico para producir proteasa.

<b>Componente</b>	<b>Cantidad (%)</b>
NaCl	0.5 %
NaNO <sub>3</sub>	0.3 %
KCl	0.5 %
Fuente de carbono (leche descremada)	1 %
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2 %
MgSO <sub>4</sub>	0.01 %

### 3.7.5 Determinación de proteína extracelular (enzima) por el método de Biuret

Se empleó un kit para cuantificación de proteínas totales (RANDOX) por el método de Biuret.

Se centrifugaron (SOLBAT) a 4000-5000 rpm por 20 minutos los tubos obtenidos a los diferentes tiempos de fermentación con la finalidad de separar la biomasa y obtener el extracto celular.

Se prepararon tubos de 3\*100 mL para poder realizar la cinética enzimática se hicieron 2 repeticiones para cada tiempo de reacción (0, 5, 10,

15, 30, 45, 60 minutos) de cada tiempo de fermentación (0, 24, 48, 72, 96 y 120 horas)

### 3.7.6 Cinética enzimática

En tubos de ensaye 13\*100 mL se agregó 145  $\mu$ L de sustrato por duplicado, se colocaron en una gradilla a baño María (Napco Model 210<sup>a</sup>) con una temperatura controlada de  $40 \pm 2$ . Posteriormente se añadieron 5  $\mu$ L de extracto enzimático a cada tubo y se dejó actuar por tiempos de reacción de 0, 5, 10, 15, 30, 45, 60 min; la cinética se detuvo adicionando el reactivo de Biuret para proteínas totales, para posteriormente seguir con la técnica establecida por Randox.

#### 3.7.6.1 Preparación de sustrato

Se midieron 0.5 mL de proteína (leche descremada) la cual fue disuelta en 50 mL de agua destilada y se empleó como solución madre de sustrato a concentración conocida.

#### 3.7.6.2 Condiciones de la cinética

Los tubos contenían 145  $\mu$ L de sustrato por duplicado, las cuales se colocaron en baño maría (Napco Model 210A) controlando la temperatura a 40 °C a las que se les agregó 0.5  $\mu$ L de extracto enzimático a los diferentes tiempos de reacción (0, 5, 10, 15, 30, 45, 60 min),

#### 3.7.6.3 Cuantificación de proteína (enzima) por el método de Biuret

Se colocaron los tubos con el sustrato en un gradilla y en baño María a 40 °C, se les agregó 5  $\mu$ l de extracto enzimático al tiempo de reacción que esta establecido (0, 5, 10, 15, 30, 45, 60 min), esto con la ayuda de las micropipetas calibradas (200/1000, 20/200, 2/20, transferpette y V3) , se sacaron los tubos del baño María una vez que se les agregó el extracto enzimático e inmediatamente se les agregó 500 $\mu$ l de reactivo de Biuret, esto para detener la reacción enzimática del microorganismo.

Una unidad de actividad proteasa (U) fue definida como la cantidad de enzima necesaria en mg/mL de proteína para hidrolizar la caseína (leche descremada) al 1% en un tiempo de 60 minutos.

Cuadro 6. Contenido de los tubos para la cuantificación de proteínas totales por el método de Biuret

	Sustrato	H <sub>2</sub> O	Extracto Enzima	Biuret
Blanco Sustrato	145 µl	5 µl	-	500 µl
Blanco Enzima	-	145 µl	5 µl	500 µl
Blanco General	-	150 µl	-	500 µl
Muestras	145 µl	-	5 µl	500 µl

También se preparó un tubo de TP (proteína total) con 10 µl de estándar y 500 µl de Biuret dejándolo en reposo por 30 minutos, y se trabajó con una absorbancia de 456 nm para poder obtener el resultado de esta sustancia.

Para el análisis de datos se empleó la siguiente ecuación:

$$\text{Conc. de Prot. Tot.} = \frac{A_{\text{muestra}}}{A_{\text{patrón}}} \times \text{Conc. Patrón}$$

Conc. Patron = 60 mg/mL

A= absorbancia

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

ETAPA I: Acondicionamiento de los animales en estudio, mediante una dieta balanceada adicionada de levadura inactiva y obtención de líquido ruminal.

### 4.1. Acondicionamiento del ganado Holstein y obtención de líquido ruminal

Para obtener el líquido ruminal se emplearon 4 vacas de la raza Holstein, alimentadas con dietas balanceadas adicionando subproductos de la industria cervecera por periodo de 121 días esto con el propósito de adaptar a la flora microbiana presente en el rumen, un periodo de transición es necesario para la adaptación de las poblaciones microbianas y de las papilas ruminales (Hobson, 1985)

El rumen provee un ambiente apropiado, con un suministro generoso de alimentos, para el crecimiento y reproducción de los microorganismos. La ausencia de aire (oxígeno) en el rumen favorece el crecimiento de grupos especiales de bacterias, entre ellos las que pueden digerir las paredes de las células de plantas (celulosa) para producir azúcares sencillos (glucosa). Los microbios fermentan glucosa para obtener la energía necesaria para vivir y reproducirse y producen ácidos grasos volátiles (AGV) como productos finales de la fermentación. Los AGV cruzan las paredes del rumen para pasar a la sangre y una vez distribuidos por todo el organismo sirven como fuente de energía para el rumiante (Llamas, 2008).

Mientras que crecen los microorganismos del rumen, estos producen aminoácidos, que son los precursores fundamentales de las proteínas. Las bacterias pueden utilizar amoníaco o urea como fuente de nitrógeno para producir aminoácidos. Sin la conversión bacteriana, el amoníaco y la urea son inútiles para la vaca. Sin embargo, las proteínas bacterianas producidas en el

rumen son digeridas en el intestino delgado y constituyen la fuente principal de aminoácidos para la vaca.

## ETAPA II: Aislamiento preliminar y caracterización macroscópica de microorganismos procariontes en agar nutritivo

### 4.2 Aislamiento de procariontes en agar nutritivo

Se prepararon las placas de agar nutritivo en las cuales se pudo observar un crecimiento homogéneo después de 24-48 h de incubación bajo anaerobiosis a 40 °C. El cuadro 7 muestra el crecimiento de los 13 microorganismos aislados donde predominaron las colonias de color blanco y forma circular. Valdés-Sepúlveda (2010) reporta características similares en bacterias aisladas de microorganismos ruminales en animales alimentados con subproductos de la industria cervecera (masilla y levadura).

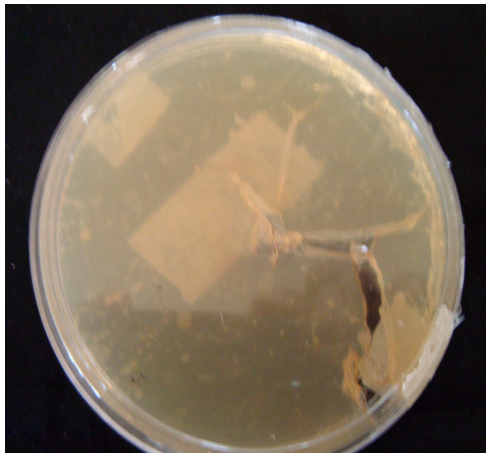
Cuadro 7. Morfología macroscópica de los microorganismos procariotas ruminales aislados en agar nutritivo

<b>Caja # 332 VLI</b>											
Colonia	Tamaño	Color	Formar	Elevación	Superficie	Aspecto	Bordes	Luz refle	Luz trans	Consistencia	N° colonias
1	0.7	Blanca	Irregular	Plana	Rugosa	Seco	Irregular	Mate	Opaca	Dura	9
2	-	Blanca	Irregular	Plana	Rugosa	Seco	Filamentosa	Mate	Opaca	Dura	3
3	0.4	Naranja pálido	Circular	Convexa	Lisa	Húmeda	Enteras	Brillante	Opaca	Suave	6
4	0.3	Naranja	Circular	Convexa	Rugosa	Húmeda	Enteros	Brillante	Opaca	Suave	5
<b>Caja # 932 VLI</b>											
5	-	Blanca	Circular	Plana	Rugosa	Seco	Enteros	Mate	Opaca	Dura	6
6	-	Naranja	Circular	Plana	Rugosa	Seco	Enteros	Mate	Opaca	Dura	10
7	-	Blanca	Irregular	Plana	Rugosa	Seco	Irregular	Mate	Opaca	Dura	6
<b>Caja # 652 VLI</b>											
8	-	Blanca	Irregular	Plana	Lisa	Seco	Irregular	Mate	Opaca	Dura	7
9	-	Blanca	Circular	Plana	Rugosa	Seco	Enteros	Mate	Opaca	Dura	17
10	-	Blanca	Circular	Plana	Rugosa	Seco	Irregular	Mate	Opaca	Dura	5
<b>Caja # 572 VLI</b>											
11	-	Blanca	Circular	Convexa	Lisa	Húmeda	Enteros	Mate	Opaca	Suave	13
12	-	Blanca	Irregular	Plana	Rugosa	Húmeda	Irregular	Mate	Opaca	Suave	7
13	-	Naranja	Circular	Convexa	Lisa	Húmeda	Enteros	Mate	Opaca	Suave	7

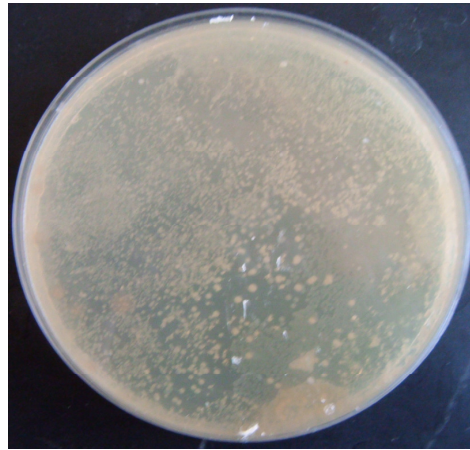
VLI=Vaca Alimentada con levadura inactiva



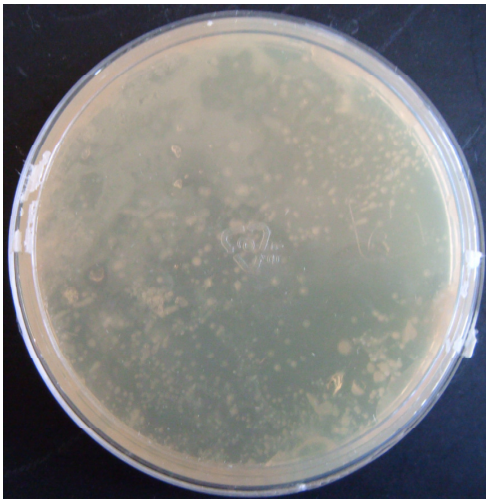
En el cuadro 7 se muestran la identificación macroscópica en agar nutritivo que se realizó de las colonias bacterianas obtenidas de vacas codificadas con números 332, 932, 652 y 572, en donde se pudieron apreciar que hay microorganismos que presentan características similares en cuanto a color, forma, elevación y aspecto; sin embargo, hubo 3 colonias que presentaron morfologías únicas en los 4 animales. Las colonias 1, 7 y 12 coincidieron en la mayoría de los aspectos morfológicos de las muestras 332, 932 y 572; sin embargo la colonia 13 fue diferente en aspecto y consistencia. De las muestras 932 y 652 la morfología macroscópica coincidió en 2 colonias, sin embargo, no es posible afirmar que se trate del mismo microorganismos, ya que no es suficiente información (figuras 5 y 10) para hacerlo; además, las bacterias pertenecen a distintos género y especie y pueden presentar morfologías macroscópicas similares (Valdez-Sepúlveda, 2010). Del total de los microorganismos aislados, se identificaron 8 cepas diferentes morfológicamente en las 4 vacas, pero se puede apreciar en la figura 1 que la forma predominante es la circular, superficie rugosa y color blanco en la mayoría de las bacterias.



A



B



C



D

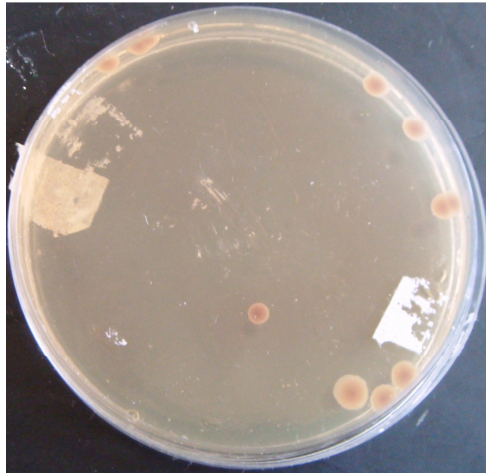
Figura 1. Fotografía de la identificación de las morfologías macroscópicas microbianas obtenidas de la simbra del líquido ruminal obtenidas en agar nutritivo. A) Caja # 332, B) Caja#932, C) Caja #652 y D) Caja #572.

### ETAPA III: Aislamiento preliminar y caracterización macro- y microscópica de microorganismos procariontes en medios específicos para anaerobios

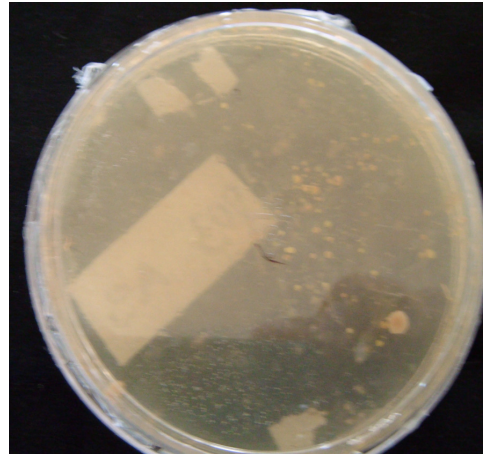
Los resultados obtenidos en el medio específico para anaerobios (agar Scheadler) muestran que la identificación macroscópica de las 17 colonias obtenidas presentan características similares o idénticas (cuadro 8); las características predominantes de las colonias fueron color beige, forma circular y bordes enteros; sin embargo, la características microscópicas muestran bacilos y cocobacilos Gram negativos, así como cocos Gram positivos.

En la VLI # 332 se lograron identificar macroscópicamente 2 colonias similares en su morfología, presentando color, superficie y consistencia suave. Sin embargo, esta información no es suficiente para afirmar que se trate de la misma bacteria.

En el cuadro 8 y figura 2 se pudo apreciar que la mayoría de las colonias son diferentes en sus morfologías caracterizadas, excepto las colonias 1 y 3 de la VLI #332 que presentaron forma circular, color beige, superficie lisa y de elevación convexa, y de la VLI #932 las colonias 3 y 4 fueron similares en la mayoría de sus características macroscópicas; las cuales fueron: color beige, forma circular, superficie rugosa y elevación umbonada. Valdez-Sepulveda, (2010) reporta que las bacterias cultivadas en este medio específico para anaerobios (Scheidler) pueden crecer microorganismos ruminales con las siguientes características macroscópicas: color beige, superficie lisa, elevación convexa o umbonada y superficie rugosa. Desde el punto de vista de la fermentación, el rumen es un ente bastante independiente del animal. No obstante ambos interactúan y, tanto las bacterias como el animal se benefician mutuamente. El rumen posee una serie de características que intervienen en el crecimiento de los organismos (Calsamiglia, 2008).



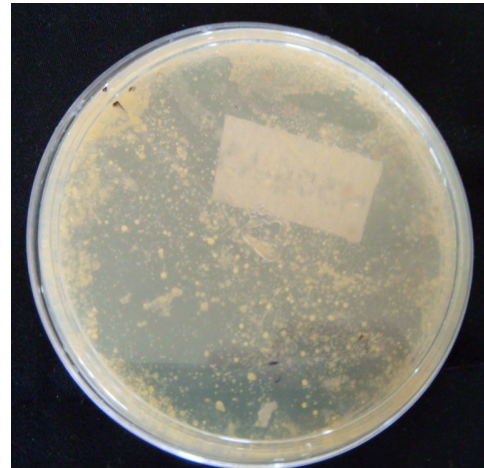
A



B



C



D

Figura 2. Fotografía de la identificación de las morfologías macroscópicas microbianas obtenidas de la simbra del líquido ruminal obtenidas en agar Sheadler. A) Caja #332, B) Caja #932, C) Caja #652 y D) Caja #572.

### 4.3 Identificación microscópica

En la caracterización microscópica de las 2 cepas obtenidas del líquido ruminal de la vaca codificada con el número 332 se obtuvieron cocobacilos cortos y bacilos Gram negativos; de la muestra codificada como 932 se lograron purificar 5 cepas las cuales fueron identificadas como bacilos cortos y bacilos cortos esporulados Gram negativos, respectivamente. De la muestra 652 se purificó una cepa con morfología de cocos Gram positivo y de la muestra 572 se purificaron dos cepas en forma de cocobacilos Gram negativo y bacilos cortos Gram negativo. Finalmente se identificaron y purificaron 10 cepas bacterianas con características diversas.

Reportes en la literatura menciona que la adición de levadura *Saccharomyces cerevisiae* incrementa la concentración de bacterias Gram negativas en el contenido ruminal, por lo que estos resultados coinciden con los presentados por Gedek *et al.*, (1993) ya que se observa que al realizar la tinción de Gram, la mayoría de las cepas se tiñeron de color rosa-rojo, lo cual nos indica que los microorganismos son Gram negativos; dicha coloración es debida a que las paredes de estos microorganismos son más delgadas y con mayor cantidad de lípidos.

La cantidad de bacterias puede variar por factores ambientales o dietarios, y cuando estos dos parámetros se mantienen, las variaciones derivan de factores específicos de cada animal, tales como: tiempo destinado a la rumia, cantidad de saliva segregada, consumo de agua y capacidad de avance de la digesta. Esto explica como hasta la 3ª semana de edad las bacterias que aparecen en el rumen de terneros son diferentes a las del vacuno adulto y que entre las semanas 9ª y 13ª la población bacteriana del rumen es prácticamente igual a la del rumiante adulto. Al igual que en los terneros, en los corderos el cambio hacia las especies predominantes que se descubren en las ovejas adultas, tiene lugar a la 6ª semana de edad (Valdez-Sepulveda, 2010).

Cuadro 8. Morfología macroscópica y microscópica de los microorganismos aislados en agar Sheadler

332 VLI												Identif. micro
Colonia	Tamaño	Color	Forma	Elevación	Superficie	Aspecto	Bordes	Luz refle.	Luz trans.	Consistencia	N° colonias	
1	0.7cm	Beige	Circular	Convexa	Lisa	Húmeda	Enteros	Brillante	Opaca	Suave	9	Cocobacilos Gram -
2	0.8 cm	Amarillo palido	Circular	Umbonada	Rugosa	Húmeda	Enteros	Brillante	Opaca	Suave	1	
3	2 mm	Beige	Circular	Convexa	Lisa	Húmeda	Enteros	Brillante	Opaca	Suave	20	Cocobacilos Gram-
4	-	Blanca	Irregular	Plana	Rugosa	Seco	Irregular	Mate	Opaca	Suave	8	
932 VLI												
1	0.6	Naranja	Circular	Convexa	Rugosa	Húmeda	Enteros	Brillante	Opaca	Suave	3	Bacilos Gram -
2	1.4	Naranja	Circular	Convexa	Lisa	Húmeda	Enteros	Brillante	Opaca	Suave	4	Bacilos Gram -
3	1.5	Beige	Circular	Umbonada	Rugosa	Húmeda	Enteros	Brillante	Opaca	Suave	1	Bacilos Gram -
4	0.5	Beige	Circular	Umbonada	Rugosa	Húmeda	Enteros	Mate	Opaca	Suave	3	Bacilos Gram -
5		Beige	Irregular	Umbonada	Rugosa	Humada	Irregulares	Brillante	Opaca	Suave	1	Bacilos Gram -
6	0.6	Beige	Circular	Umbonada	Rugosa	Humada	Irregulares	Brillante	Opaca	Suave	1	

652 VLI												
1	0.7	Café	Circular	Convexa	Lisa	Húmeda	Enteros	Brillante	Opaca	Suave	6	
2	-	Café pálido	Irregular	Convexa	Lisa	Húmeda	Irregular	Brillante	Opaca	Suave	4	Cocos Gram +
3	-	Beige	Irregular	Plana	Rugosa	Húmeda	Enteros	Brillante	Opaca	Suave	2	
572 VLI												
1	0.8	Naranja	Circular	Plana	Lisa	Húmeda	Enteros	Mate	Transparente	Suave	1	
2	-	Naranja	Irregular	Umbonada	Rugosa	Húmeda	Irregular	Mate	Opaca	Suave	2	
3	0.6	Beige	Circular	Plana	Lisa	Húmeda	Enteros	Mate	Opaca	Suave	13	Cocobacilos Gram -
4	-	Beige	Irregular	Convexa	Lisa	Húmeda	Enteros	Brillante	Transparente	Suave	2	Bacilos Gram -

VLI= Vaca alimentada con levadura inactiva

Se puede apreciar en el cuadro 8 que la morfología macroscópica de la colonia 1 de VLI #332 coincide con la morfología de la colonia 3 de VLI #332 presentando color beige, de forma circular, elevación convexa y superficie lisa, pero al realizar la tinción de Gram se pudo observar que se trata de microorganismos de forma de cocobacilos (Gram negativos); sin embargo, la colonia 1 de la VLI #332 es un cocobacilo delgado y de tamaño mediano, mientras que la colonia 3 de la VLI #332 es más corto y ligeramente mas gruesas, de acuerdo con Mateo-Sánchez, *et al.*, (2002) un cocobacilo es Gram negativo, esférico de 0.8-1.0 mm y no motil (figuras 3 y 4).

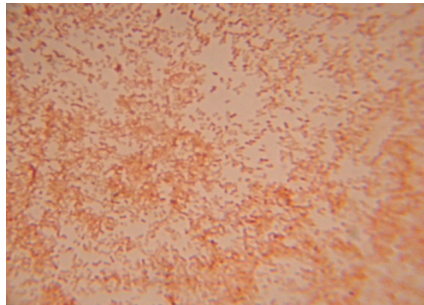


Figura 3. Morfología microscópica de la colonia 1 de la VLI #332 aislada del líquido ruminal teñido con Gram



Figura 4. Morfología microscópica de la colonia 3 de la VLI #332 aislada del líquido ruminal teñido con Gram.

La colonia 1 de la VLI #932 se identificó microscópicamente tratándose de un microorganismo en forma de bacilos cortos Gram negativo, como se muestra en la figura 5, al igual se observó que la colonia 4 de la VLI #572 se identificó



microscópicamente también como bacilos Gram negativos, pero en la caracterización macroscópica presentaron morfología diferentes (figuras 5 y 8).

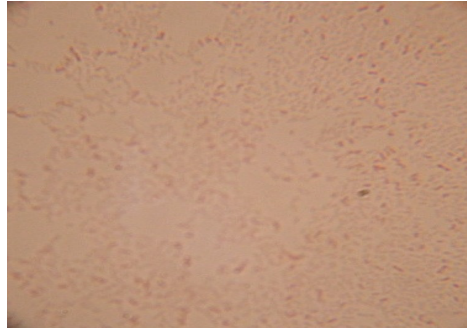


Figura 5. Morfología microscópica de la colonia 1 de la VLI #932 aislada del líquido ruminal teñida con Gram.

La colonia 2 de la VLI #932 se observó microscópicamente y se trató de un microorganismo en forma de bacilos medianos y delgados Gram negativos, al igual que las colonias 3 y 4 de las VLI #932 se tratan de bacilos medianos pero ligeramente mas gruesos que de los microorganismos de la colonia 2 y la identificación macroscópica son completamente diferente como se pueden apreciar en el cuadro 8. Certes (1889), describió una bacteria ruminal en forma de media luna flagelado y las *Selonomonas* que fueron aislados en 1954, así como también Elsdén y Lew (1953), aislaron del rumen una bacteria que tenía la capacidad de fermentar aminoácidos la cual fue clasificada en el genero *Elsdenii de peptostreptococcus*.

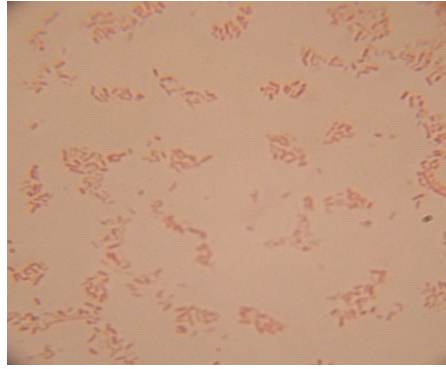


Figura 6. Morfología microscópica de la colonia 2 de la VLI #932 aislada del líquido ruminal teñidas con Gram.

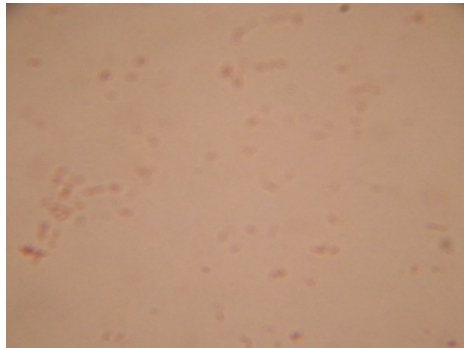


Figura 7. Morfología microscópica de la colonia 3 de la VLI #932 aislada del líquido ruminal teñidas con Gram.

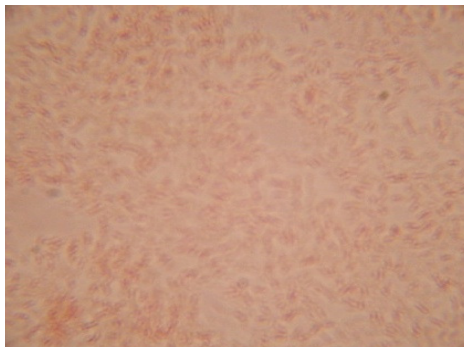


Figura 8. Morfología microscópica de la colonia 4 de la VLI #932 aislada del líquido ruminal teñidas con Gram.

En la colonia 5 de la VLI # 932 se pudo observar que los microorganismos presentaban una forma definida bacilar mediana Gram negativa como se muestra en la figura 9.

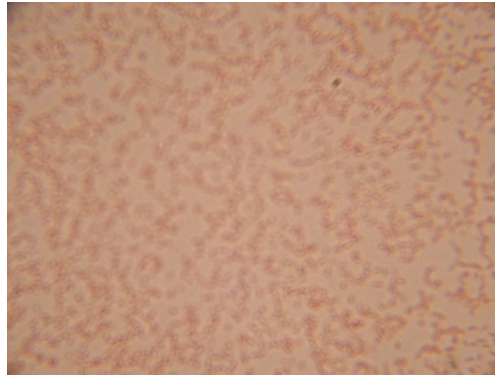


Figura 9. Morfología microscópica de la colonia 5 de la VLI #932 aislada del líquido ruminal teñidas con Gram

La colonia 2 de la VLI #652 se identificó microscópicamente como un microorganismo Gram positivo en forma de cocos presentando una coloración de azul-morada (figura 10), de acuerdo con Valdéz-Sepulveda. (2010) los microorganismos en forma de cocos son Gram positivos con una coloración azul-morada , debido a que las paredes celulares son más gruesas, tienen más peptidoglicano y menos lípidos. Orlajensen en 1919, aisló un coco Gram positivo, facultativo del rumen y fue clasificado como *Streptococo bovis*.

De acuerdo a la revisión de literatura, la colonia 2 de la VLI #652 puede tratarse de un microorganismo de las especies *S. ruminatium spp. Lactylitica* ya que es Gram positivo también. Pero para asegurarse que se tratan de las mismas bacterias se tiene que realizar una identificación bioquímica o biología molecular. Por otra parte, las especies utilizadoras de lactato, como pueden ser *Megasphaera elsdenii*, *S. ruminatium spp. Lactylitica*, puede reducir el riesgo de acidosis convirtiendo parte del lactato a acetato y propionato. *M. elsdenii* es una bacteria Gram negativa que se encuentra en el rumen principalmente de animales jóvenes (Hobson, 1958).

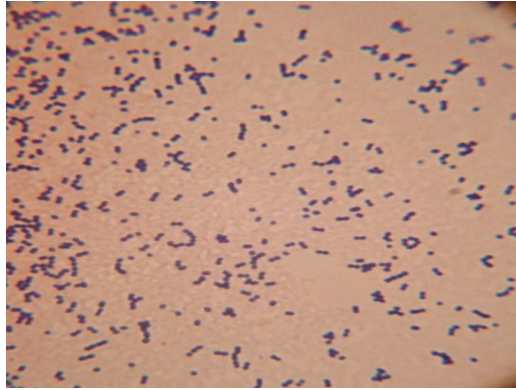


Figura 10. Morfología microscópica de la colonia 2 de la VLI #652 aislada del líquido ruminal teñida con Gram.

En la colonia 3 y 4 de la VLI #572 se pudieron apreciar microscópicamente que se tratan de microorganismos similares de formas bacilares de tamaños medianos, pero de la colonia 3 son bacterias ligeramente más gruesas que los microorganismos de la colonia 4, y presentan las 2 colonias una coloración de Gram negativos. Pero se hizo la caracterización macroscópica (cuadro 8) y se identificaron morfológicamente como microorganismos completamente diferentes. La colonia 3 presenta color beige, forma circular, elevación plana, en tanto, que la colonia 4 presenta coloración beige, de forma irregular y elevación convexa.

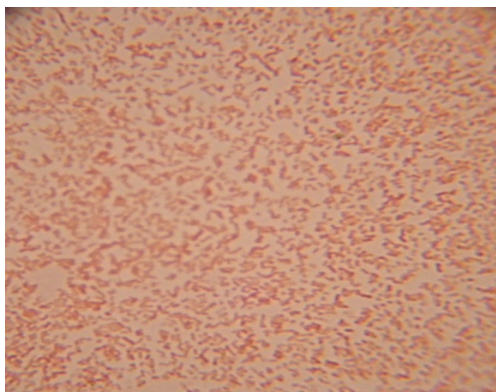


Figura 11. Morfología microscópica de la colonia #3 de la VLI 572 aislada del líquido ruminal teñida con Gram.

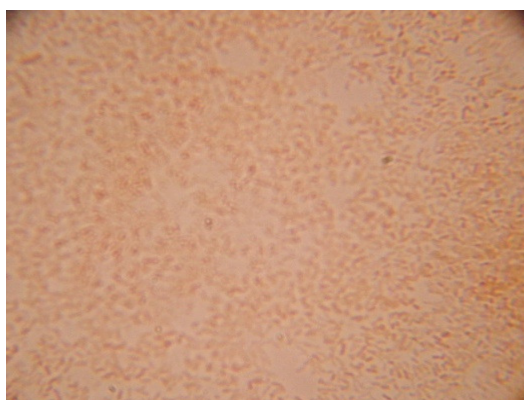


Figura 12. Morfología microscópica de la colonia #4 de la VLI 572 aislada del líquido ruminal teñida con Gram.

Reportes en la literatura menciona algunas bacterias aisladas del rumen de la vaca, Hungate (años 40) desarrollo un medio específico para anaerobios donde obtuvo aislamiento de *coco celulolíticos* gram negativos, en 1950 Bryant y Birkey, aislaron tres bacterias gram negativos las cuales fueron clasificados como *Succinato (bacterioide ruminicola)*, género *Succinivibrio* y *Succinomonas*, en 1956, Bryant aisló una bacteria de forma flagelado que produjo grandes cantidades de ácido butírico, y fue clasificado como *Butirivibrio fibrisolvens*.

#### ETAPA IV: Purificación y mantenimiento de las cepas aisladas

La figura 13 presenta las imágenes de los cultivos puros conservados en AS con forma de pico de flauta, hasta su posterior uso.

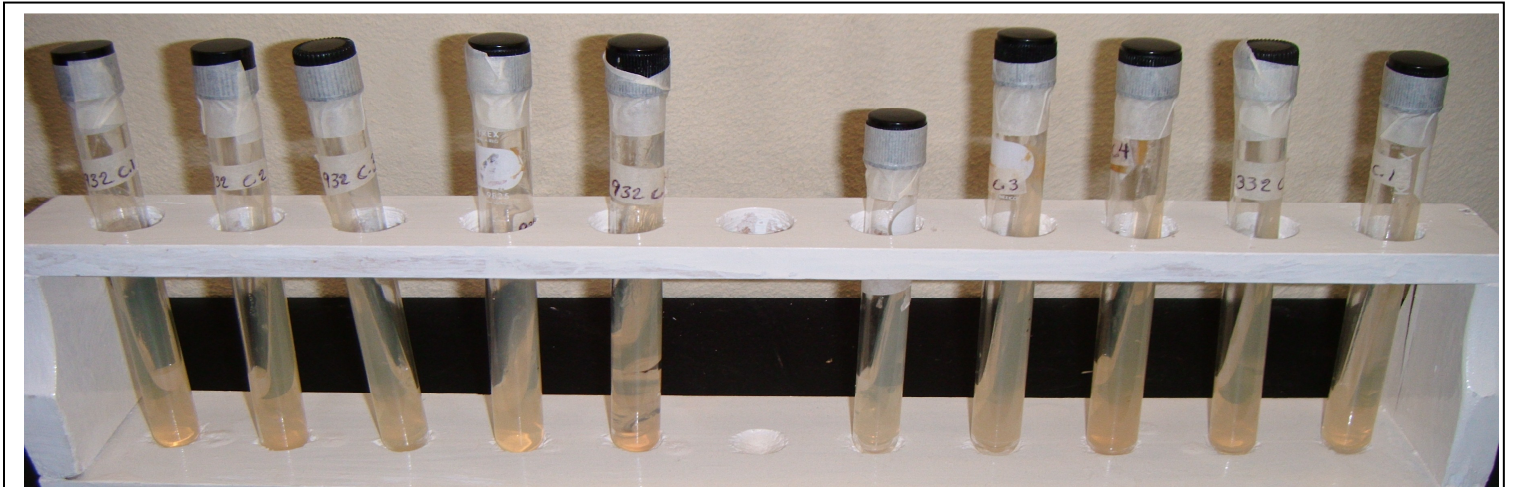


Figura 13. Fotografías de las cepas puras aisladas y conservadas en tubos en forma de pico de flauta con medio de agar Sheadler

Al realizar la siembra de las cepas puras en tubo se observó que los microorganismos de la colonia 5 de la vaca codificada con el número 932, dentro del tubo produjeron gases probablemente por fermentación de las fuentes de carbono presentes en el medio, dejando el medio partido en pedazos como se puede observar en la figura 13.





Figura 14. Fotografía de la cepa pura de la colonia 5 de VLI # 932, productora de gas.

ETAPA V: Identificación del metabolismo bioquímico de las cepas bacterianas obtenidas.

Las pruebas bioquímicas determinan la actividad de una vía metabólica a partir de un sustrato que se incorpora en un medio de cultivo y que la bacteria al crecer incorpora o no.

Cuadro 9. Relación del comportamiento bioquímico de cepas aisladas de rumen bovino, a las 24 y 48 horas de incubación

Cepa	Mac Conkey		Citrato de Simmons	
	48 horas	72 horas	48 horas	72 horas
Cepa 1 caja # 932 VLI	-	-	-	+
Cepa 2 caja # 902 VLI	-	-	-	-
Cepa 3 caja # 902 VLI	+	-	+	
Cepa 4 caja # 902 VLI	-	-		+
Cepa 5 caja # 902 VLI	-	+	-	+
Cepa 1 caja # 332 VLI	-	+	-	+
Cepa 3 caja # 332 VLI	-	+	-	+
Cepa 3 caja # 572 VLI	+		-	+
Cepa 4 caja # 572 VLI	-	+	-	+
Cepa 2 caja # 652 VLI	-	+	-	+

Se hizo la caracterización bioquímica de las 10 cepas puras con la prueba bioquímica MacConkey donde se puede observar que las cepas 932 colonia 1, 2 y 4 no hubo crecimiento bacteriano en las 48 y 72 horas, la cepa 932 colonia 3 y la cepa 572 colonia 3 tuvieron crecimiento a las 48 horas y las demás cepas crecieron a las 72 horas es cuando se observaron cambios de color en las bioquímicas.

La prueba bioquímica MacConkey cuando es positiva indica la hidrólisis de la lactosa produciendo ácidos orgánicos y las colonias que hidrolizan lactosa adquieren un color rojo, pero aunque las colonias lactosas negativas permanecen incoloras el medio se torna amarillo debido a un incremento en el pH del medio provocada por la alcalinización derivada de la utilización de compuestos proteicos (peptona).



En la identificación bioquímica con citrato de Simmons la cepa 932 colonia 2 no tuvo crecimiento; la cepa 932 colonia 3 tuvo crecimiento a las 48 horas y en todas las demás cepas se observaron crecimiento a las 72 horas, lo que indica que las bacterias que hidrolizan citrato reaccionan a las 72 h.

La utilización de citrato como única fuente de carbono es una prueba útil en la identificación de enterobacterias. Esta se detecta en un medio de cultivo con citrato como única fuente de carbono mediante el crecimiento y la alcalinización del medio. Este aumento de pH se visualiza con el indicador azul de bromotimol que vira al alcalino a pH de 7.6 El medio contiene citrato sódico, fosfato de amonio y azul de bromotimol como indicador; este se tornará azul cuando el medio se alcaliniza. Las bacterias que metabolizan el citrato liberan iones amonio al medio (degradación del fosfato amónico) lo que provoca que este se alcalinice y el indicador vire a azul. Por lo tanto esto indica que las bacterias que fueron positivas son enterobacterias que reaccionan a las 72 hrs o que empiezan a liberar amonio al medio en ese tiempo.

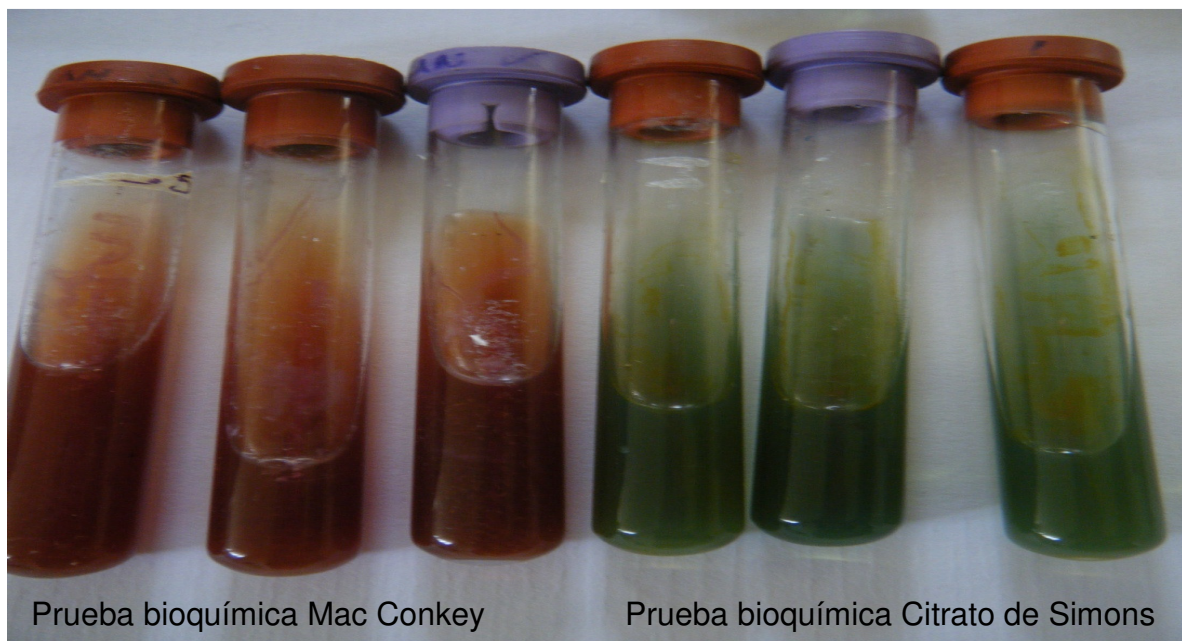


Figura 15. Fotografías de las pruebas bioquímicas realizadas a las cepas puras.

En la fotografía de la figura 15 se muestran los tubos con los medios empleados y el crecimiento microbiano obtenido, como se puede observar, en el medio citrato de Simmons hay un cambio de color el indicador tira de verde a azul de bromotimol, esto es a consecuencia que el crecimiento de enterobacterias liberan iones amonio al medio (degradación de fosfato amonio), produciendo un incremento de pH en el medio.

Considerando los resultados obtenidos se puede mencionar que en la literatura se manejan diferentes microorganismos predominantes en el rumen bovino que podían relacionarse con los datos metabólicos detectados.

*Streptococcus bovis* es una bacteria que normalmente se encuentra en bajo número en el rumen (Mantovani y Russell, 2001). Además *S. bovis* produce acetato, formato y etanol cuando las concentraciones de carbohidratos en la dieta son bajas, pero cuando la disponibilidad de hidratos de carbono altamente fermentable es elevada, tiene una fermentación homoláctica, debido a la inhibición de la enzima piruvato formatoliasa a pH's ácidos (Slyter, 1976). Y las enzimas proteolíticas se localizan periplasmáticamente, asociadas a la membrana celular, excepto en *Butyrivibrio fibrisolvens* que secreta la proteasa extracelularmente (Wallace y Cotta, 1988).

Etapa VI: Empleo de un microorganismo procarionte para la producción de una proteasa, mediante el diseño de un medio de cultivo inductor.

En la figura 16 se puede observar el comportamiento bacteriano presentando una fase de crecimiento logarítmico a las 24 horas con una velocidad específica de 0.0715 DO/h; durante esta fase, su tasa de crecimiento es constante durante este periodo donde el microorganismo dobla su número a intervalos regulares. La población es más uniforme en términos de sus propiedades químicas y fisiológicas: por lo tanto, los cultivos en fase exponencial son usados en estudios bioquímicos y fisiológicos (Prescott, 1996). y presentando una fase estacionario después de las 24 horas prolongándose hasta las 72 horas, como también se puede apreciar que hay un ligero descenso del número de bacterias después de las 72 horas, probablemente esto sea el momento previo a la aparición de la fase de muerte celular, ya que esta todavía no se detecta en la curva, puesto que las lecturas se mantienen hasta las 144 h por falta de nutrientes o la posible acumulación de desechos tóxicos que conllevan la disminución de células viables. Este patrón se mantiene incluso cuando el número total de células simplemente disminuye por falta de nutrientes y después se mueren (Bergey, 2005).

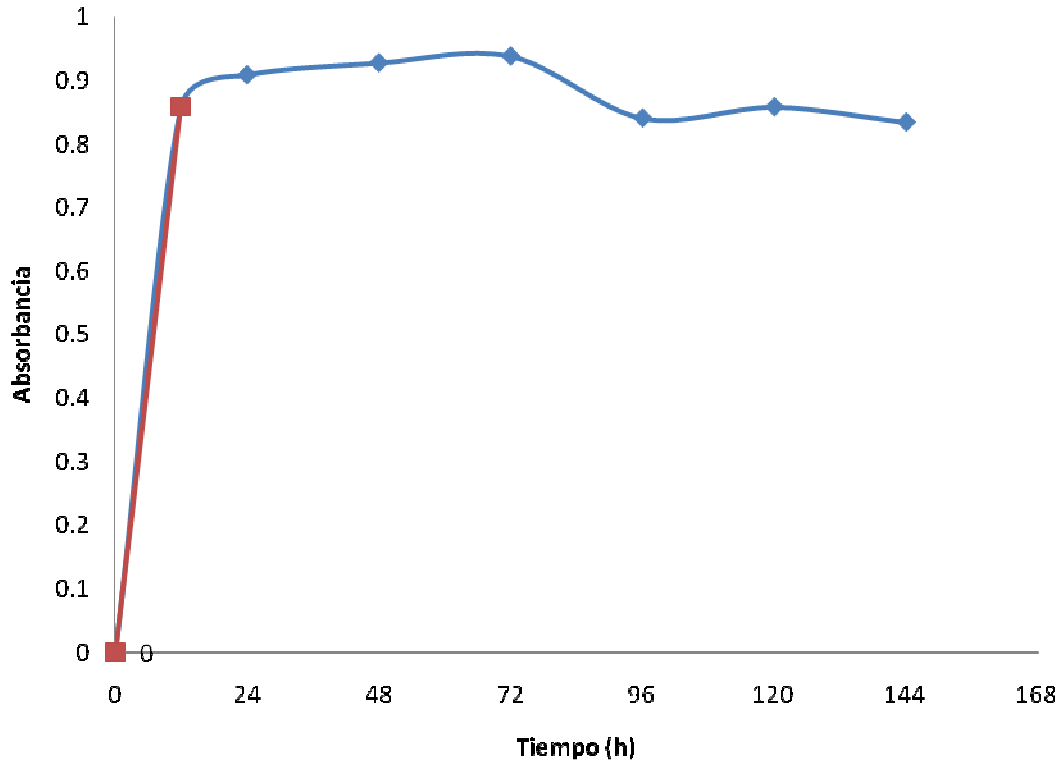


Figura 16. Curva de crecimiento de la cepa 2 de la VLI #652 cultivada en tioglicolato de sodio.

Se preparó un medio específico para inducir al microorganismo a la producción de la enzima proteasa empleando como única fuente de carbono leche descremada. En la figura 17 se puede observar que a las 24 horas el microorganismo alcanza su máximo crecimiento con una velocidad específica de  $\mu=0.0692$  DO/h, pero después de ese tiempo el crecimiento microbiano tiende a disminuir, el comportamiento del microorganismo por el descenso, puede ser que entra en un momento de estrés porque es obligado a adaptarse a un medio específico para que este nos produzca la enzima deseada, pero después de adaptarse al medio este empieza a reproducirse o incrementar otra vez el número de células microbianas, posterior a producir la enzima de manera natural.

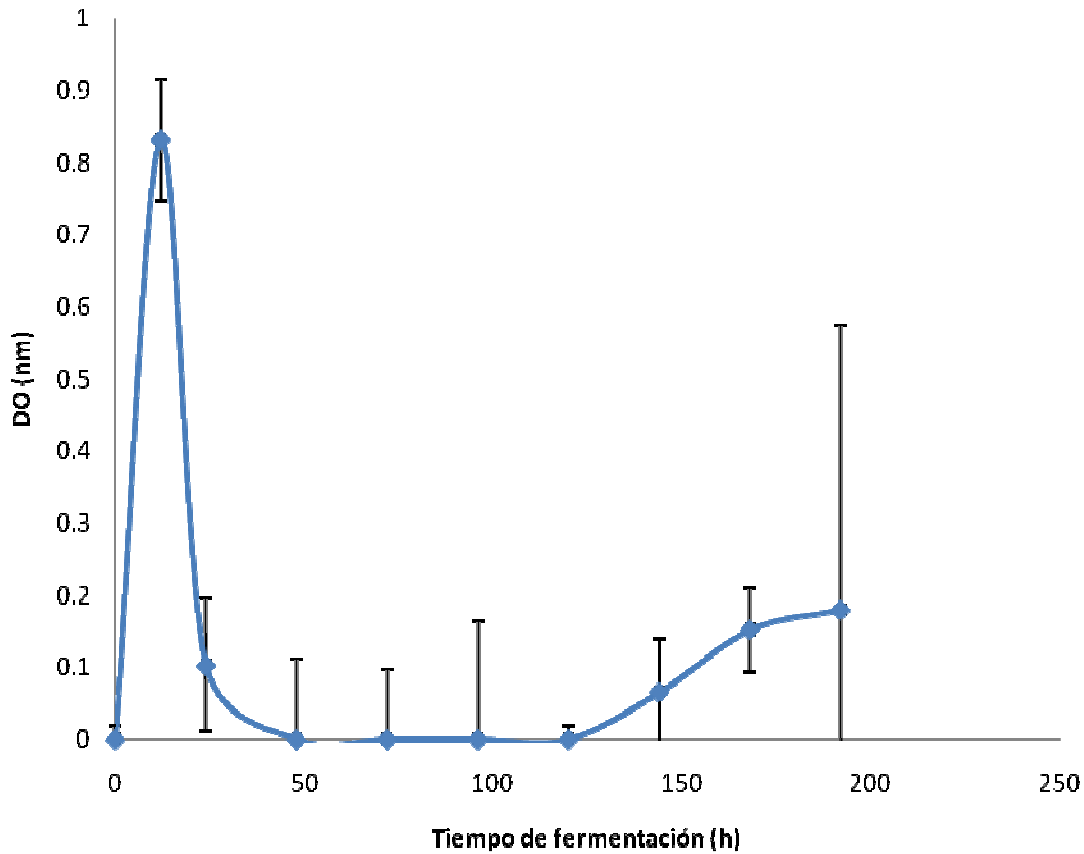


Figura 17. Curva de crecimiento en medio específico de la cepa 2 de la VLI # 652 empleando como fuente de carbono caseína

#### 4.4 Determinar y cuantificar la actividad proteasa mediante técnicas espectrofotométricas.

Las bacterias son responsables de hidrolizar o degradar las macromoléculas que componen los sustratos presentes en los alimentos, como celulosa, hemicelulosa, almidón, azúcares, ácidos intermedios, proteína, pectina o lípidos (Yakohamo y Johnson, 1988). Son el grupo de microorganismos más abundantes y representan más de la mitad de la biomasa ruminal y una mayor proporción de la actividad metabólica ruminal, que está inversamente relacionado con el tamaño del microorganismo. (Ørskov, 1992). Aproximadamente el 75 % de las bacterias se encuentran asociadas a las partículas de alimentos y son

responsables en mayor parte de la degradación ruminal, así mismo hay bacterias que subsisten a partir de nutrientes solubles del líquido ruminal y bacterias anaeróbicas facultativas que están asociadas al epitelio ruminal están especializadas en degradar las células epiteliales sin intervenir activamente en la degradación del sustrato. También tienen gran actividad proteasa y ureasa (Cheng y Costerton, 1980

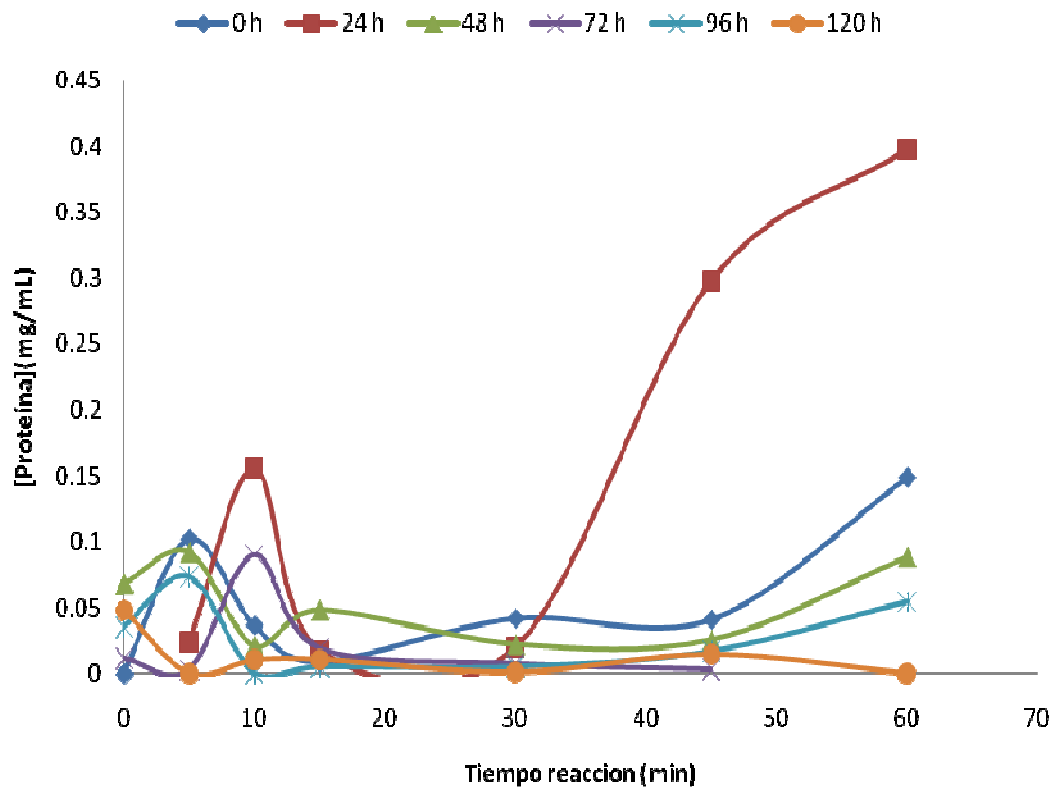


Figura 18. Concentración de proteína extracelular en mg/mL a diferentes tiempos de reacción cuantificada por el método de Biuret de la cepa 2 de la VLI #652

Empleando alícuotas de tiempo cero de fermentación se tiene casi nula concentración de proteína extracelular lo cual es debido a que el microorganismo se encuentra en fase de adaptación al medio y aún no expresa su metabolismo, en esta etapa se presenta una velocidad de formación de producto de  $V_o = 0.002$  mg/mL.h.

Al tiempo de fermentación 24 horas se puede apreciar que el microorganismo que tiende a reaccionar en 5 minutos de haber iniciado la reacción; sin embargo, la máxima actividad se presenta tras 30 minutos de haber iniciado la reacción con una  $V_o$  de 0.0126 mg/mL.h. En la figura 18 se puede apreciar que el máximo crecimiento celular se obtuvo a las 48 h de fermentación, por lo que el microorganismo se encuentra en su máxima expresión metabólica lo que indica la máxima capacidad de producción de enzima.

En el tiempo de fermentación de 48 hrs y al minuto 0 cero de reacción se puede ver que ya hay concentración de proteína extracelular por que la bacteria empieza a adaptarse al medio y a producir la proteasa, pero también hay una disminución de actividad a los 10 minutos hasta después de 30 min de reacción empieza a reaccionar otra vez teniendo una velocidad de formación de  $V_o = 0.001$  mg/mL.h

Tiempo de fermentación 72 hrs hay una mínima reacción al minuto 0, teniendo mas concentración de proteína a los 10 min de reacción, pero después de 15 min se puede observar que tiene una mínima concentración de proteína con una velocidad de formación de  $V_o = 0.009$  mg/mL.h

Tiempo de fermentación 96 hrs se puede apreciar que hay reacción desde a los min 0 a 5 min de reacción después de 10 minutos hay una disminución de concentración de proteína extracelular hasta después de 30 minutos hay otra vez una reacción de enzima con una velocidad de formación  $V_o = 0.0008$  mg/mL.h

Tiempo de fermentación 120 hrs se puede apreciar que la concentración de proteína es muy poco es a lo mejor por que la bacteria ha producido las proteínas nencesarias en los tiempos anteriores y a este tiempo se termina también los

nutrientes del medio se puede observar en la figura 18 que después de los 60 minutos tiende a disminuir la línea, lo cual indica que ya no hay producción de enzima, la velocidad de formación del producto es de  $V_o = 0.0003 \text{ mg/mL.h}$

Las enzimas proteolíticas se localizan periplasmáticamente, asociadas a la membrana celular, excepto en *Butyrivibrio fibrisolvens* que secreta la proteasa extracelularmente (Wallace y Cotta, 1988). Para degradar la proteína insoluble, las bacterias deben adherirse al sustrato, por lo que tendrán rápido acceso a los productos de degradación (Owens y Zinn, 1988).

En datos de literatura se menciona con mayor frecuencia a la bacteria proteolítica *Prevotella ruminicola*, como la más abundante en todo tipo de dietas, la que tiene varias actividades proteolíticas, y que puede incorporar péptidos de un determinado tamaño directamente a su síntesis proteica, es incapaz de utilizar aminoácidos libres (Cotta y Hespell, 1986).



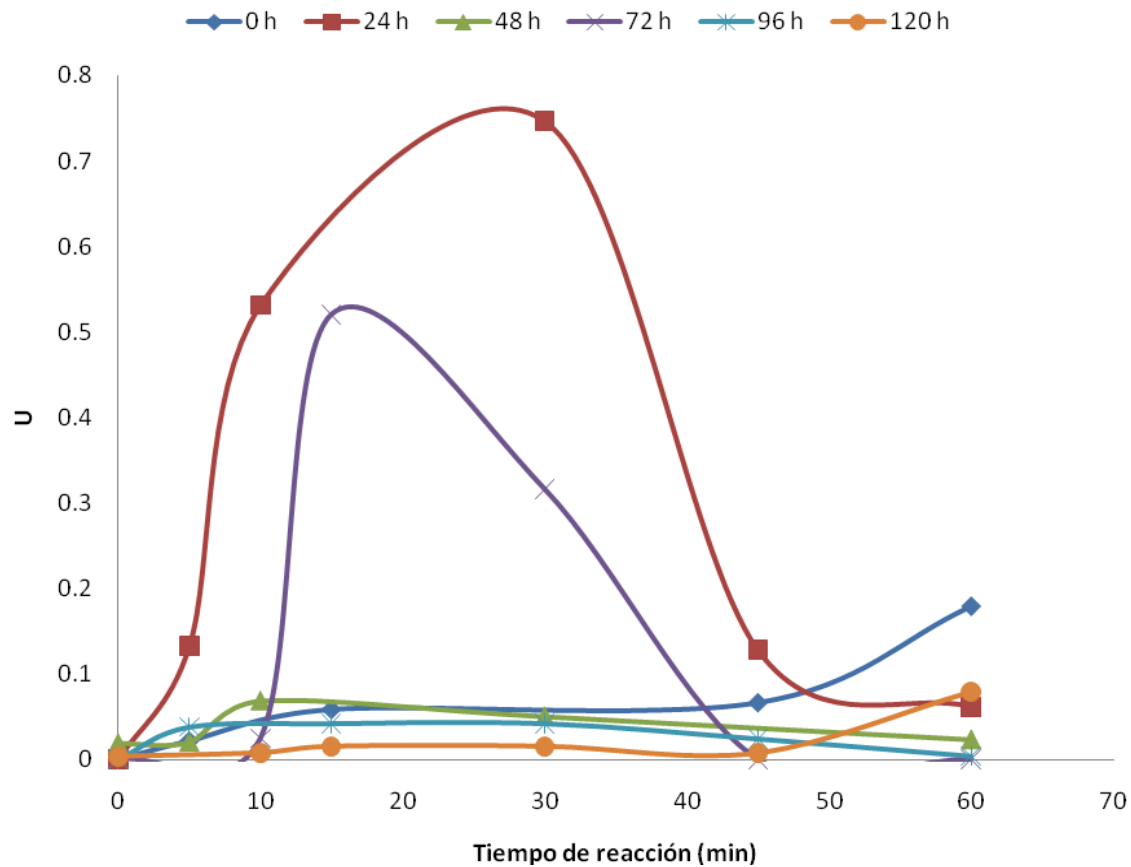


Figura 19. Actividad enzimática a diferentes tiempos de fermentación de la cepa 2 de VLI # 652

Como se puede apreciar en la figura 19 la mayor actividad enzimática se presenta a las 24 h de reacción con una actividad de 0.7469 U, formando una campana de Gausse, la actividad de enzima en similar a las 72 h de fermentación pero este presenta la máxima actividad a los 15 min de reacción con un valor de 0.5205 U, al tiempo de fermentación de 0 h la actividad se mantiene hasta los 45 min de reacción, después como se puede observar en la figura 19 la línea tiende a elevarse lo que indica que después de este tiempo la actividad enzimática aumenta, por lo que se recomienda realizar un monitoreo por más tiempo de reacción para seguir el curso de la reacción.

Como se mencionó anteriormente en la grafica de la figura 18 la mayor concentración de proteína expresada en mg/mL.h se obtuvo a las 24 h de fermentación obteniendo una velocidad inicial de  $V_o = 0.0126$  mg/mL.h (cuadro 10) y con una actividad enzimática de 0.7469 U.

Cuadro 10. Velocidades de formación del producto.

<b>Tiempo de fermentación</b>	<b><math>V_o</math> (mg/mL.h)</b>
0	0.002
<b>24</b>	<b>0.0126</b>
48	0.001
72	0.009
96	0.0008
120	0.0003

## 5. CONCLUSIONES

Acondicionar a los animales en estudio, mediante una dieta balanceada subproductos agroindustriales de la industria cervecera (levadura) modifica la población bacteriana que existe en el rumen bovino, pudiendo obtener bacterias anaerobias y anaerobias facultativas.

Se lograron aislar 13 microorganismos empleando como medio de cultivo agar nutritivo, las cuales se identificaron macroscópicamente en donde se observaron que predominan microorganismos de colores blancas, bordes enteros y forma circular. Así, como también se aislaron 17 microorganismos empleando un medio específico para bacterias anaeróbicas (agar Scheadler), se identificaron macroscópicamente predominando características; color beige, formas circulares, bordes enteros. Y en la identificación microscópica se lograron identificar bacterias en forma de bacilos Gram negativos, cocobacilos Gram negativos y cocos Gram positivos.

La mayoría de las cepas caracterizadas bioquímicamente poseen la capacidad de metabolizar la lactosa (a excepción de la cepa 2 de la caja # 902), como de igual forma la mayoría, también pueden emplear el citrato como fuente de carbono con excepción de las cepas 1, 2 y 4 de la caja # 902.

Se indujo la producción de una proteasa extracelular empleando leche descremada como única fuente de carbono; dicha enzima demostró buena capacidad de hidrolizar proteína a las 24 h de fermentación con una velocidad de formación de producto  $V_0=0.0126 \text{ h}^{-1}$  y lo cual puede tener gran aplicabilidad en diferentes campos industriales..

La curva de crecimiento en medio líquido específico mostró una fase exponencial a las 24 horas con una velocidad específica de  $\mu=0.692 \text{ DO/h}$ , mientras que en el medio líquido convencional el crecimiento máximo también fue a las 24 h pero con un velocidad específica de  $\mu=0.0715 \text{ DO/h}$ .

## 6. LITERATURAS CITADAS

1. Abe, M., T. Iriki, N. tobe, y H. Shibui. 1981. Sequestration of Holotrich protozoa in the retículo-rumen of cattle. *Appl. Env. Microbiol.* 41:758-765.
2. AFRC, 1993. Energy and Protein Requirements of Ruminants. *Agri. Food Res Council Tech. Comm. on Responses to Nutrients.* CAB. International. Wallingford. UK. *J. Anim Sci.* 2007. 85:1014-1023
3. Baret, A. J., 1994. Proteolytic Enzyme. Serine and Cysteine Peptidases, *Methods Enzymol.* 248: 183.
4. Barker, H. A. 1961. Fermentations of nitrogenous organic compounds, p. 151-207. *In* I. C. Gunsalus and R. Y. Stanier (ed.), *The bacteria*, vol. 2. Academic Press Inc., New York, NY.
5. Binnie, C., L. Liao, E. Walczyk, and L. T. Malck. 1996. Isolation and Characterization of a Gene Encoding a Chymotrypsin-like Serine Protease From *Streptomyces Lividans* 66. (*an. J. Microbiol.* 42: 284-288.).
6. Brock, T. D. (dir y Trad). 1961. *Milestones in Microbiology.* Pentice-Hall. Inc., Englewood Cliffs, N. J. *academic Medicine: July 1961-vol 36-Issue 7-* ppg 847
7. Bryant, M. P. and L. A. Burkey. 1953. Number and Some Predominant Groups of Bacteria in the Rumen of Cows Fed Different Ration. *J. Dairy SCI.* 36: 218-224.
8. Bryant, M. P. and Small, N., Characteristics of two new genera of anaerobe curved rods isolated from the rumen of cattle. *J. Bacteriol.*, 1956, 72, 22–26.
9. Boyer, K., B. M. Stummann, and K. W. Henningsen. 1992. cDNA cloning and sequencing of the bean yellow mosaic virus nuclear inclusion protein genes. *Plant Mol. Biol.* 18:1203-1205.

10. Calsamiglia, S., I. K. Yoon y M. D. Stern. 1994. Effect of various incubation times on in situ estimation of ruminal crude protein degradation. *J. Anim. Sci.* 72 (suppl. 1): 171 Abstract.
11. Calsamiglia S., Cardozo, P. W., Ferret, A. and Banch A. 2008. Changes in rumen microbial fermentation are due to combined effect of type of diet and pH. *J. Anim. Sci.* 86: 702-711.
12. Castillo, A. R. y M. R. Gallardo. 1989. Alimentos no Tropicales, Consideraciones. Practicas para Utilización. Información para Extensión No 88. EEA Rafael INTA.
13. Cheng, K. J., y J. W. Costerton, 1980. Adherent rumen bacteria: their role in the digestion of plant material, urea and epithelial cells. *Digestive physiology metabolism in ruminants*. Ed. RUCKEBUSCH, Y. & THIVEND, P., 227-250. Lancaster: MTP Press.
14. Cotta, M. A., y J. B. Russell. 1982. Effect of peptides and amino acids on efficiency of rumen bacterial protein synthesis in continuous culture. *J. Dairy Sci.* 65:226-234.
15. D'Ascanio, G. y C. O. Peruchena. 1992, Caracterización de los Principales Residuos y Subproductos\* Agroindustriales Producidos en el Noreste de Santa Fe. Publicación Miscelánea 7. EEA Reconquista INTA.
16. Dawson, K. A., Newman, K. E., Boling, J. A. 1990. Effects of microbial supplements containing yeast and lactobacilli on roughage-fed ruminal microbial activities. *J. Anim. Sci.* 68:3392-3398.
17. Visser, S., F. A. Exterkate, C. J. Slangen, and G. J. De Veer. 1986. Comparative study of action of cell wall proteinases from various strains of *Streptococcus cremoris* on bovine a- and k-casein. *Appl. Environ. Microbiol.* 52:1162-1166.

18. Ensminger, M.E.; Oldfield, J. E, and W. W. Heinemann, 1990. By-Products Feeds-Crop Residuos. In: Feeds & Nutrition, The Ensminger Publishing Company. Second Edition, Clovis, California, USA. Pp 90-95.
19. Frobisher, M. 1969. Microbiología. 4ed. Barcelona, Salvat.
20. Grudsky P. Roberto., Arias B. José Luis. 1983. Aspectos generales de la microbiología del rumen. Monografías de Medicina Veterinaria, Vol. 5 (2).
21. Harrison, G. A.; Hemken, R. W.; Dawson, K. A.; Harmon, R. J., Barker, K. B. 1988. Influence of addition of yeast culture supplement to diets of lactating cows on ruminal fermentation and microbial populations. *J. Dairy Sci.* 71:2967-2975.
22. Hobson, P. N. and Howard, B. H., Microbial transformations. In *Handbuch der Tierernährung*, Verlag Paul Parey, Hamburg, 1969, vol. I. 130. Allison, M. J., Dawson, K. A., Mayberry, W. R. and Foss, J. G., *Oxalobacter formigenes* gen. nov. sp. nov.: oxalate degrading anaerobes that inhabit gastrointestinal tract. *Arch. Microbiol.*, 1985, 141, 1–7.
23. Hungate, R. E. 1966. The rumen and its microbes. 1ra. Edition Academic Press. New York.
24. Hungate, R. E., Studies on cellulose fermentation 1. The culture and physiology of an anaerobic cellulose digesting bacterium. *J. Bacteriol.*, 1944, 48, 499–513.
25. Hungate, R. E., The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. *Bacteriol. Rev.*, 1950, 14, 1–49.
26. Kamra, D. N. (2005) Rumen microbial ecosystem. *Current science*. 89:1-10  
Hobson, P. N., *The Rumen Microbial Eco-system*, Elsevier Applied Science, London, 1989.

27. Llamas Riverola, J. A., 2008 Concentración de Ácidos Grasos Volátiles en Líquido Ruminal de Toretos Charolais en Engorda Alimentados con Diferentes Niveles de Macilla y Levadura de Cerveza. Tesis de licenciatura. UAAAN. Buenavista, Saltillo, Coahuila. México,
28. McAllister TK, Bae HD, Muir A, Yanke LJ, Cheng KJ (1994). Effect of birdsfoot condensed tannins on endoglucanase activity and the digestion of cellulose filter paper by ruminal fungi. *Can J Microbiol* 40:298–305.
29. McAllister, T. A., R. C. Phillips, L. M. Rode, y K. J. Cheng. 1993. Effect of the protein matrix on the digestion of cereal grains by ruminal microorganisms. *J. Anim. Sci.* 71:205-212.
30. Mc Donald, P.: Edwards, R. A & J. F. D. Greenhalgh- 1988. *Animal Nutrition*, 4<sup>th</sup> Edition. Longman Scientific & Technical Ed. Essex, UK.
31. Morales, S. M. 1987. Desechos y Subproductos Agroindustriales como Recursos Alimenticios para Rumiantes. En: *Alimentación Invernal del Ganado Bovino*, J. J. Egaña Ed. Universidad de Chile. Santiago Chile.
32. Nava Cuéllar, Cuautémoc y Díaz Cruz, Antonio. 2001. "Introducción a la Digestión Ruminal". Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. Tesis de licenciatura. Edo. México
33. Orpin, C. G. 1979. Chemotaxis in rumen ciliate protozoa. *Proc. Soc. Gen. Microbiol.* 7:32-36.
34. Orpin, C. G 1981. Isolation of cellulolytic phycomycete fungi from the caecum of the horse. *J. Gen. Microbiol.* 123:287-296.
35. Orskov. E. R. 1992. Protein nutrition in ruminants. Academic Press Limited. 24-28 Oval Road. London NW17DX. UK.

- 36.Orskov, E. R., D. Benzie y R. N. B, Kay. 1970. The effects of feeding procedure on closure of the oesophageal Groove in Young sheep. Br. J. Nutr. 24:785-795.
- 37.Owens, F. N., y R. Zinn. 1988. Peptide transport in bacteria: Methods, mutants and energy coupling. Biochem. Soc. Trans. 11:794-798.
- 38.Pollock, M. R. y Richmond, N. H. 1965 (eds.): Function and Structure in Microorganism. Cambridge University Press, Cambridge.
- 39.Rao, M. B., and V. V. Deshpande. September 1998. Proteases and their applications in biotechnology. *In* A. Varna (ed.), Microbes: for health, wealth and sustainable environment, in press. Malhotra Publishing House, New Delhi, India. 62:597-635.
- 40.Robinson, P.H, Garret, J. E 1998. Effect of yeast cultura (*Saccharomyces cerevisiae*) on adaptation of cows to postpartum diets and on lactational performance. J. Anim. Sci. 77:988-999.
- 41.Rodríguez, A y Valencia E. 2008. Microbiología ruminal ruminantia. Vol: 3, No 1.
- 42.Ruiz, M. E.: Ruiz A. y D. Pezo. 1980. Estrategias para el Uso de Residuos de Cosecha en la Alimentación Animal. En: Memorias del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Turrialba, Costa Rica.
- 43.Spooner, E. T. C. y Strocker, B. A. D.1956. (eds.): Bacterial Anatomy. Cambridge University Press.
- 44.Standard Methods for the examination of Dairy Products, APHA, 16 th Ed., 1992.



45. Sánchez Alcantar, G., 2001. Utilización del Contenido Ruminal en Dietas para becerros de Reemplazo. Tesis de Doctorado. UAAAN. Buenavista, Saltillo, Coahuila. México.
46. Valdez-Sepulveda L.G., 2010. Studio microbiológico del líquido ruminal del ganado Holstein alimentado con dietas enriquecidas con productos de la industria cervecera (masilla y levadura). Tesis de licenciatura. UAAAN. Coahuila. México.
47. Van Soest, P. J. 1982. Nutritional ecology of the ruminant animal. Cornell University Press, Inthaca, New York.
48. Varga, G. A., y E. S. Kolver. 1997. Microbial and animal limitations to fiber digestion and utilisation. Conference: New developments in forage science contributing to enhanced fiber utilisation by ruminants. J. Nutr. 127:819S-823S.
49. Warner, A. G. I. 1962. Some Factors Influencing the Rumen Microbial Population J. Gen. Microbial. 28: 129-146.
50. Wallace, R. J. 1991. Rumen Proteolysis and its Control. Pag. 131-150 en: Rumen microbial metabolism and ruminant digestion. J. P. Jouany, Ed. INRA editions, Paris.
51. Yamagata. Y., and E. Ichishima. 1995. A New Alkaline Serine Protease From Alkalophilic Bacillus Sp: Cloning Sequencing and Characterization of an Intracellular Protease. Curr. Microbiol. 30: 357-366.
52. Yokohama, M. T., y K. A. Johnson. 1988. Microbiología del rumen e intestino. Pag. 137-158 en: el rumiante, fisiología digestiva y nutrición. C. D. Church, Ed. Editorial Acribial. Zaragoza, España.