

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
ANTONIO NARRO**

**DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL  
DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**



**Estudio microbiológico de poblaciones fúngicas presentes en el líquido ruminal  
empleando levadura de cervecería en la alimentación de vacas Holstein**

Por:

**MARÍA ELENA MARTÍNEZ MORGADO**

Tesis

Presentada como Requisito Parcial para Obtener el Título de:

**INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

Buenvista Saltillo, Coahuila, México

Marzo 2011

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA "ANTONIO NARRO"  
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL  
DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

**Estudio microbiológico de poblaciones fúngicas presentes en el líquido ruminal  
empleando levadura de cerveza en la alimentación de vacas Holstein**

Por:

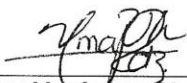
**MARÍA ELENA MARTÍNEZ MORGADO**

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 se ha dirigido por el presente comité:

Presidente



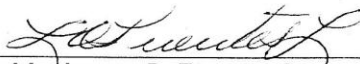
**Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez**

Vocal



**MC. María Hernández Gonzalez**

Vocal

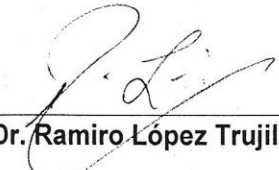


**Lic. Laura O. Fuentes Lara**

Vocal



**M.C. Alberto Guerrero Rodríguez**



**Dr. Ramiro López Trujillo**

**COORDINADOR DE CIENCIA ANIMAL**

Marzo 2011

*El hombre nunca sabe de lo que es capaz hasta que lo intenta.*  
*Charles Dickens.*



*La ciencia se compone de errores, que a su vez son los pasos  
hacia la verdad.*

*Julio Verne.*

## *AGRADECIMIENTOS*

### *A DIOS*

*Por haberme dado la vida, a mi familia y enseñarme amar, dame fuerzas para seguir adelante guíame Señor con tu mano y sabiduría*



*A mi “Alma Mater” porque fueron tantos los momentos que viví en esta magnífica casa de estudios que me hicieron formarme tanto como persona y profesionalista que le estaré eternamente agradecida*



*A los miembros del comité tutorial  
Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez  
MC. María Hernández  
Lic. Laura O. Fuentes Lara  
M.C. Alberto Guerrero Rodríguez  
Por su tiempo dedicado en la revisión de la misma y por sus valiosas observaciones. Gracias por su asesoría*





*Agradezco también: MC. Martha Clarisa Coss Valdés, Dra. Malu Morales, LCN. Laura Maricela Lara López, MC. Gerardo Sánchez, Ing. Torres son un excelente punto de partida para la expectativa de formación que tengo, tanto en el ámbito intelectual como en el desarrollo de otros valores de no menor importancia, como son la madurez, responsabilidad, además, por su paciencia, comprensión. Gracias por su amistad.*

*A mi amiguísima y colega Ana Karina Pérez Guzmán, gracias por tu apoyo a lo largo de la carrera, por tu valiosa aportación en la realización y culminación de esta investigación. Compartiendo sueños, risas creciendo siempre juntas Te quiero kary.....*



*A mis comadres y amigas de la UNI, Kary Castillo, Carmelyn Piñeyro, por los geniales momentos, siempre apoyándonos en lo bueno y lo malo, las inseparables tres amigas una para todas y todas para una Las quiero .....*



*A mis amigos: Cyntia, Yorfe, Benito, Eriberto, Aly, Alex, Chave por su sincera amistad y apoyo incondicional y así como a todo mis compañeros de generación*

## **DEDICATORIAS**

*Con todo amor, cariño y admiración, a mis padres:*

*Sra. Adelfa Morgado Sardineta*

*Sr. Ángel Martínez González (†)*

*A tan maravillosas personas les dedico este humilde trabajo, con todo cariño, amor y admiración por haberme dado la vida, mamá gracias por brindarme la confianza y el apoyo cuando decidí alejarme del manto familiar, para permitirme realizar este sueño que después de caídas y tropezones e culminado, papá soy tan afortunada de ser tu hija, te agradezco de todo corazón por los valores que me has dado, es estaré eternamente agradecida a mis queridos padres, los amo!!!!*

*A mi hermano, Ángel Martínez Morgado, gracias por ser mi hermanito el mas apachadle y consentidor, sobre todo por amar a la familia y ayudarme en la formación de mi educación, te admiro hermanito Te amo....*

*A mi hermana, amiga y comadre Eve eres la mejor hermana del mundo, he pasado los momentos más importantes de mi vida a tu lado, gracias por toda la ayuda que me has brindado, por tu valiosa aportación para la realización de mis estudios Siempre Juntas Hasta El Infinito Y Mas Allá Te amo..... Princesa*

*A mi hermano Jorge... no puedo estar lejos sin tí, eres el que más me corrige, exige, me regaña, gracias por los momentos que hemos compartido juntos al estar fuera de casa Te amo....*

*A la abuela Elenita más encantadora y maravillosa mujer Te amo abuela*

*Mi queridísima tí a Juanis te agradezco por estar siempre alado de mí Madre y de nosotros Te amo.....*

*A la Familia Luna, no pude en contar una mejor familia, para vivir con ella en este tiempo que estaba fuera de casa, que ahora me he adoptado como su nieta, gracias por acobijarnos y hacernos parte de su familia con cariño Elena.....*

# ÍNDICE

	<b>Página</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>XI</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1 Justificación	2
1.2 Hipótesis	2
1.3 Objetivo General	2
1.3.1 Objetivo Especifico	2
<b>II REVISIÓN DE LITERATURA</b>	<b>4</b>
2.1 Fermentación ruminal	4
2.2 Poblaciones ruminales	5
2.2.2 Bacterias	6
2.2.3 Protozoos	8
2.2.4 Hongos	10
2.2.4.1 Distribución	11
2.2.4.2 Ciclo de vida	11
2.2.4.3 Función de los hongos anaeróbicos del rumen	12
2.2.5 Levaduras	13
2.1.5.1 Morfología	14
2.1.5.2 Reproducción asexual	16
2.1.5.3 Reproducción sexual	17
2.1.5.4 Metabolismo	17
2.1.5.5 Temperatura	18
2.1.5.6 pH	18
2.1.5.7 Oxígeno	19
2.2.6 Interrelaciones entre los microorganismos	19
2.2.7 Efecto de la dieta sobre las poblaciones microbianas	20
2.3 Medio de cultivo	20
2.4 Bioquímica del rumen	21
2.4.1 Digestión de azúcares en el rumen	21
2.4.2 Digestión de la celulosa	21
2.4.3 Digestión del almidón	22
2.4.4 Digestión de las pectinas	22
2.4.5 Formación de ácidos grasos volátiles (AGV)	23
2.4.6 Digestión de proteínas en el rumen	24
2.4.7 Hidrólisis ruminal de los lípidos	26
2.4.8 Síntesis de vitaminas en el rumen	27
2.5 Subproductos de la industria cervecera en la alimentación de ganado.	28
2.5.1 Actividad microbiana en la fermentación ruminal y el efecto de la adición de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	28
2.5.2 Cultivos microbianos	29
2.5.3 Principales características	29
2.5.4 Factores que afectan la población de microorganismos ruminales	29



2.6	Enzimas	31
2.6.1	El ecosistema ruminal como fuente de enzimas	32
2.6.2	Enzimas con aplicación industrial	32
2.6.3	Enzimas en la industria alimentaria	34
2.6.4	Proteasas	34
2.6.5	Naturaleza de las reacciones enzimáticas	36
2.6.6	Condiciones que afectan la actividad enzimática.	37
2.6.7	Curva de crecimiento	37
2.6.8	Aplicaciones	39
<b>III</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	41
3.1	Localización del área de estudio.	41
3.2	Acondicionamiento del ganado Holstein y obtención de líquido ruminal	41
3.3	Aislamiento de levaduras en agar papa dextrosa	42
3.4	Caracterización macroscópica y microscópica de las cepas obtenidas	43
3.5	Aislamiento de hongos de tipo levaduras en agar papa dextrosa	43
3.5.1	Caracterización macroscópica	44
3.5.2	Caracterización microscópica	44
3.6	Purificación de cepas aisladas	44
3.7	Producción de una proteasa	45
3.7.1	Selección	46
3.8	Determinación de proteína extracelular (enzima) por el método de Biuret	47
3.9	Cinética enzimática	47
<b>IV</b>	<b>IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	49
4.1	Acondicionamiento del ganado Holstein y obtención de líquido ruminal	49
4.2	Aislamiento de levaduras en agar papa dextrosa.	50
4.3	Aislamiento de hongos de tipo levaduras en agar papa dextrosa	53
4.3.1	Características macroscópicas	54
4.3.2	Caracterización microscópicas	54
4.4	Producción de una proteasa	57
4.4.1	Selección de cepa productora de proteasa	58
4.5	Curva de crecimiento en medio líquido para la producción de la enzima proteasa	60
4.6	Determinación de proteína extracelular (enzima) por el método de Biuret	61
4.7	Cinética enzimática	63
<b>V</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	65
<b>VI</b>	<b>LITERATURA CITADA</b>	66

## ÍNDICE DE CUADROS

	<b>Página</b>	
Cuadro 2-1	Condiciones ambientales del rumen	6
Cuadro 2-2	Clasificación de las principales especies bacterianas del rumen	7
Cuadro 2-3	Clasificación de los principales protozoos ruminales con los substratos de fermentación preferentes	9
Cuadro 2-4	Enzimas empleadas en procesos industriales	34
Cuadro 2-5	Propiedades funcionales y aplicaciones de los hidrolizados de proteínas	40
Cuadro 3-1	Dieta de ganado lechero alimentado con levadura	42
Cuadro 3-2	Composición química del medio pontecorvo	46
Cuadro 3-3	Preparación de muestras para cuantificación de proteínas totales por el método de Biuret	48
Cuadro 4.1	Características microscópicas de levaduras aisladas de líquido ruminal	52
Cuadro 4-2	Tiempos de crecimiento de las cepas puras	56

## ÍNDICE DE FIGURAS

		<b>Página</b>
Figura 2-1	Esquema del proceso de fermentación de alimentos en rumiantes	5
Figura 2-2	Clasificación morfológica de bacterias en el complejo retículo-rumen	8
Figura 2-3	Ilustraciones de protozoarios que habitan en el complejo retículo-rumen	9
Figura 2-4	Ilustración de la actividad degradativa del sustrato por hongos en el complejo retículo-rumen	13
Figura 2-5	Esquema de estructura y organelos de una levadura	15
Figura 2-6	Esquema del proceso de gemación de las levaduras	16
Figura 2-7	Esquema del ciclo de vida una levadura ascosporada	17
Figura 2-8	Esquema de metabolismo de una levadura bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas	18
Figura 2-9	Esquema de las vías metabólicas mediante la hidrólisis de polisacáridos presentes en rumen	22
Figura 2-10	Esquema de las vías metabólicas mediante la síntesis de ácidos grasos en rumen	23
Figura 2.11	Esquema de las vías metabólicas mediante la digestión de proteínas en rumen	25
Figura 2-12	Esquema de las vías metabólicas mediante la hidrólisis de lípidos en rumen	27
Figura 2- 13	Hidrólisis de un enlace peptídico de una proteína.	34
Figura 2-14	Reacción enzima – sustrato representada esquemáticamente	35
Figura 2-15	Curva de crecimiento de los microorganismos	37
Figura 4-2	Fotografía de Aislamiento de levaduras en rumen	51
Figura 4-3	Fotografía de las cepas puras de levaduras de liquido ruminal	54
Figura 4-4	Fotografía de características microscópicas de las levaduras	55
Figura 4-5	Fotografía de las cepas de levaduras purificadas	58
Figura 4.6	Fotografía del crecimiento de las levaduras para la producción de una proteasa.	58
Figura 4-7	Fotografía de levaduras para la producción de una proteasa	60
Figura 4-8	Curva de crecimiento de la cepa 140303C en medio pontecorvo a 20- 25°C	61
Figura 4-9	Cuantificación de proteína extracelular por el método de Biuret	63
Figura 4-10	Actividad enzimática a diferentes tiempos de fermentación de la cepa 140303C	65

## RESUMEN

El rumen es una cámara de fermentación anaeróbica. La población microbiana se mantiene al ingerir y masticar alimentos con regularidad, manteniendo sus condiciones apropiadas de pH y temperatura 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 ingiere, así como también de la actividad biosintética microbiana, para cubrir sus propias necesidades nutritivas.

La población microbiana en el rumen es principalmente anaeróbica compuesta principalmente por bacterias, protozoarios ciliados y hongos en menor cantidad. El número relativo de las diferentes especies depende de la composición y estructura de la dieta, así como de las múltiples interacciones entre ellos.

En la UAAAN se realizó un estudio de alimentación de ganado bovino Holstein, adicionando subproductos de la industria cervecera (levadura) a su dieta. Se obtuvo líquido ruminal de 4 vacas multíparas el cual se utilizó como inóculo inicial para la identificación y cultivo de células levaduriformes para su posterior caracterización macro y microscópica en agar papa dextrosa (PDA).

Se aislaron 5 cepas puras en medio pontecorvo sólido empleando leche descremada y deslactosada (Lala) como fuente de carbono para la producción de la enzima proteasa.

La cepa aislada 1403-03C presentó una curva de crecimiento en medio líquido específico presentando una fase exponencial a las 12 horas con una velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) de 0.063 DO/h.

Se determinó que la cepa 1403-03C posee actividad enzimática proteasa alcanzando valores máximos a las 72 h con una actividad de reacción de 0.74370U y a las 96 h con valores de 1 U.

*Palabras clave: proteasa, levaduras, microorganismos ruminales*

## I. INTRODUCCIÓN

Los rumiantes son una importante fuente de alimentos y otros productos para los seres humanos. Estos animales se han adaptado de tal manera que pueden satisfacer sus necesidades energéticas a través de la utilización de los forrajes, los cuales son relativamente abundantes en la superficie terrestre. Este aspecto los coloca entre los animales de más alto interés zootécnico.

En el ecosistema ruminal existe una población microbiana que comprende bacterias, protozoarios (Hungate, 1966) y hongos (Orpin, 1975). Estos microorganismos se encuentran irregularmente distribuidos en la fracción líquida o adherida al material sólido y paredes del rumen. Las bacterias y protozoarios han sido estudiados en considerable detalle, sin embargo, la noción que se tiene sobre los hongos es limitada (Obispo, 1992) debido a que su descubrimiento es relativamente reciente.

Por otra parte, investigaciones realizadas con subproductos derivados de la fabricación de cerveza en la nutrición del ganado bovino en México, representan nuevas oportunidades para ser empleados en la nutrición de animales debido a su eficiencia productiva además de que favorecen el desarrollo de los microorganismos del rumen que son los responsables de llevar a cabo el proceso de fermentación para la producción de energía.

Por lo anterior el presente estudio pretende identificar, registrar, conservar a los microorganismos fúngicos ruminales para la obtención de enzimas proteasas con posteriores aplicaciones en la industria alimentaria.

## **1.2 Justificación**

La diversidad de microorganismos del rumen, es una fuente para la obtención de enzimas en la aplicación de la industria alimentaria por lo que es indispensable buscar alternativas que representen ventajas económicas y técnicas, tratando aumentar la producción a gran escala y de calidad.

Las enzimas microbianas, han demostrado tener un potencial comercial industrial por sus propiedades funcionales.

Por esto es importante conocer, del estudio ecosistema ruminal en ganado bovino mediante aislamiento, identificación y mantenimiento de microorganismos ya que representa una oportunidad que permitirá obtener nuevas fuentes de enzimas naturales de interés en la industria de alimentos.

## **1.3 Hipótesis**

La alimentación con los productos de la industria cervecera (levadura) tiene un efecto sobre la proliferación de las poblaciones fúngicas en el líquido ruminal en ganado lechero.

## **1.4 Objetivo General**

Aislar e identificar macroscópicamente, microscópicamente y bioquímicamente las poblaciones fúngicas predominantes en el rumen con potenciales aplicaciones en la industria de alimentos.

## **1.5 Objetivos Específicos**

- Aislar microorganismos fúngicos en agar papa dextrosa (PDA)
- Caracterizar macro- y microscópicamente las cepas aisladas
- Purificar y mantener las cepas obtenidas en medios de conservación
- Identificar el metabolismo de las cepas obtenidas

- Seleccionar un microorganismo para la producción de una enzima de interés industrial mediante el diseño de un medio de cultivo inductor
- Determinar y cuantificar la actividad enzimática mediante técnicas espectrofotométricas

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Fermentación ruminal

El estómago de bovinos tiene cuatro compartimientos: el rumen, retículo, omaso y abomaso. El rumen, el más grande de las cavidades estomacales representa un 80% total en animal adulto (Yokohama y Johnson, 1988).

El rumen es la cámara de fermentación anaeróbica. La población microbiana se mantiene al ingerir y masticar alimentos con regularidad, manteniendo sus condiciones apropiadas de pH, temperatura 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 anaeróbicas del alimento fibroso que ingiere y de la actividad biosintética microbiana, para cubrir sus propias necesidades nutritivas (Yokohama y Johnson, 1988). El metabolismo del rumiante está enfocado a aprovechar los productos de la fermentación microbiana como los ácidos grasos volátiles (AGV) (Owens y Goetsh, 1988).

En la hidrólisis de la materia orgánica, los microorganismos actúan sobre las moléculas orgánicas depolimerizándolas enzimáticamente hasta sus correspondientes monómeros o fragmentos más sencillos como se muestra en la Figura 2-1. Así los lípidos son degradados por lipasas hasta ácidos grasos de cadena larga y glicerol, las proteínas son hidrolizadas por proteasas en péptidos y aminoácidos, y los polisacáridos son hidrolizados hasta monosacáridos. Posteriormente los compuestos solubles obtenidos son metabolizados por los microorganismos en AGV (principalmente acético, propiónico y butírico) alcoholes,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{H}_2$  y  $\text{CO}_2$ . (Weber *et al.*, 1984).



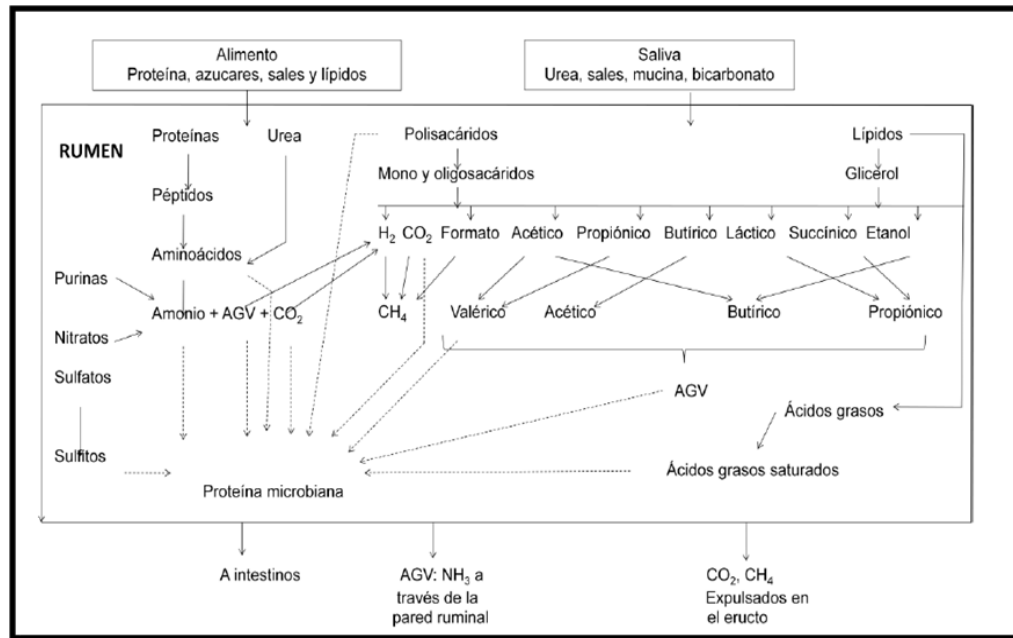


Figura 2-1. Esquema del proceso de fermentación de alimentos en rumiantes (Shimada, 2003).

## 2.2 Poblaciones ruminales

La mayoría de los microorganismos que se encuentran en el retículo ruminal en condiciones ambientales ilustrado en la cuadro 2.1. Son anaerobios estrictos aunque existen algunos facultativos, estos microorganismos son principalmente bacterias, protozoarios, hongos y levaduras; según Shimada (2003) aparecen ubicados en tres sitios diferentes en el rumen:

- Adheridos a la pared ruminal
- Asociados a partículas alimenticias
- Libres, flotando en el líquido ruminal

El número de las diferentes especies de microorganismo dependerá de la composición y estructura de la dieta. (Ørskov, 1992).

Cuadro 2-1. Condiciones ambientales del rumen (Tokoyama y Jhonson, 1993).

<b>Temperatura</b>	38 a 42 °C
<b>pH</b>	5.5 a 7.0
<b>Atmósfera</b>	Compuesta aproximadamente por 65% de CO <sub>2</sub> , 27% de CH <sub>4</sub> , 7% de N <sub>2</sub> , 0.6% de O <sub>2</sub> , 0.2% de H <sub>2</sub> y 0.01% de H <sub>2</sub> S

### 2.2.2 Bacterias

Las bacterias se encuentran en una proporción 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 metabolismo (Yokohama y Johnson, 1988). Son el número de microorganismos más abundante, representa 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 se utilizan como se muestra en cuadro 2-2. En función de sus principales sustratos de fermentación, se pueden clasificar en microorganismos que degradan a la celulosa, hemicelulosa, almidón, azúcares, ácidos intermedios, proteína, pectina o lípidos (Tamminga, 1996).

Cuadro 2-2. Clasificación de las principales especies bacterianas del rumen según el tipo de sustrato que fermentan (Tokoyama y Jhonson, 1993).

<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 pectinolíticas</b>
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	<i>Prevotella ruminicola</i>
<i>Prevotella ruminicola</i>	<i>Lachnospira multiparus</i>
<i>Ruminococcus</i> sp	<i>Succinivibrio dextrinosolvens</i>
	<i>Treponema bryantii</i>
<b>Principales especies amilolíticas</b>	<b>Principales especies amilolíticas</b>
<i>Ruminobacter amylophilus</i>	<i>Ruminobacter amylophilus</i>
<i>Strptococcus bovis</i>	<i>Ruminobacter amylophilus</i>
<b>Principales especies utilizadoras de Azúcares</b>	<b>Principales especies utilizadoras de lípidos</b>
<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</i> sp
	<i>Fusocillus</i> sp
	<i>Micrococcus</i> sp

Otra clasificación de bacterias se hace en función de la fase física a la que se encuentran asociadas dentro del rumen ilustrado en la figura 2- 2. Aproximadamente el 75% de las bacterias se encuentran asociadas a las partículas de alimento y son las responsables, en mayor parte de la degradación ruminal del alimento (Ørskov, 1992). Un segundo grupo de bacterias más inespecífico, se encuentra a partículas y poblaciones con altos ritmos de división que subsisten a partir de los nutrientes solubles en líquido ruminal, finalmente en tercer grupo de bacterias anaeróbicas facultativas adherentes al epitelio ruminal. Estas bacterias asociadas el epitelio ruminal consumen el oxígeno que entran con alimento y el agua, están especializadas en degradar las células epiteliales sin intervenir actividad en la degradación del sustrato (Cheng y Costerton, 1980).

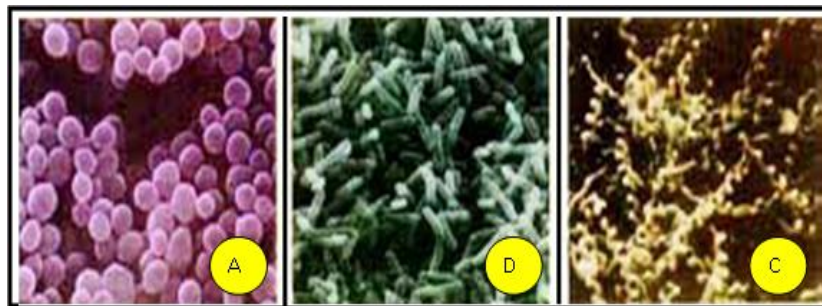


Figura 2-2. Clasificación morfológica de bacterias en el complejo retículo-rumen. A) cocos. B) bacilos. C) espirilos (Rodríguez y Valencia, 2008).

### 2.2.3 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 pueden clasificar en dos subclases, *Entodiniomorfa*, y *Holotrica* como se muestra en el cuadro 2-3 (Hungate, 1966). Los protozoos pueden 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 alimento, a la pared reticular durante los intervalos entre comida (Abey *et. al.*, 1981).

Cuadro 2-3. Clasificación de los principales protozoos ruminales con los substratos de fermentación preferentes ( Hungate, 1966.)

Subclase	Género	Substrato fermentado
<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>Eudiplodinium</i>	Celulosa
	<i>Polyplastron</i>	Celulosa

Aunque los protozoos constituyen una parte integral de la población microbiana y tienen un papel importante en la fermentación, su beneficio para los rumiantes sigue siendo controvertido. Algunos estudios han demostrado que los protozoos aumentan la digestibilidad ruminal y el rendimiento de los animales (Ørskov, 1992).

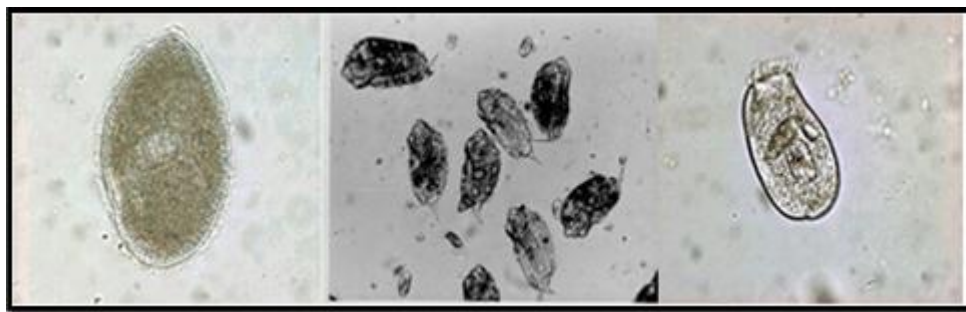


Figura 2-3. Ilustraciones de protozoarios que habitan en el complejo retículo-rumen (Rodríguez y Valencia, 2008).

#### 2.2.4 Hongos

Los hongos se caracterizan por ser organismos eucariontes pertenecientes al grupo nutricional heterótrofos. Los hongos crecen en dos formas básicas, levaduras (unicelulares) y mohos que son filamentosos (pluricelulares). La pared de las células fúngicas difiere de la pared bacteriana contiene quitina y celulosa (Fuentes, 2006).

Los hongos representan un grupo de microorganismos móviles y pequeños, inicialmente observados en el líquido ruminal por Liebetanz (1910) y Braune (1913), fueron tentativamente identificados como protozoarios flagelados. Posteriormente Warner en 1966 observó que esos flagelados, aunque presentes en bajo número, mostraban en las paredes del rumen.

Exitosamente, (Orpin, 1988), aisló uno de esos flagelados, al que identificó como *Neocaldimastix frontalis*. Esta investigación se revela que el ciclo de vida de estos microorganismos consiste de dos fases alternativas: una fase móvil de flagelado (zoosporos) y una fase no móvil vegetativa, reproductiva (esporangio). Dentro de estas bases, Orpin sugirió que este organismo podía ser un hongo. Señaló, además, que la posesión de rizoides por el cuerpo reproductivo era una característica de los hongos más que de los protozoarios. Igualmente, observó que los llamados protozoos flagelados o formas móviles eran liberados de esos cuerpos reproductivos.

En estudios previos (Orpin, 1975) se establecieron las condiciones óptimas para la germinación y reproducción de estos microorganismos, encontrándose que ellos requieren de una temperatura de 39°C, pH 6.5, ausencia de oxígeno y presencia de CO<sub>2</sub>. Esos hallazgos confirmaron a estos organismos como verdaderos entes ruminales, ya que ellos podían crecer bajo las condiciones ambientales encontradas en el rumen (Hungate, 1966).

Finalmente, el descubrimiento de quitina en las paredes celulares de estos microorganismos. Confirmó que estos eran verdaderos hongos, ya que entre los microorganismos no fotosintéticos la ocurrencia de quitina o de celulosa es una característica particular a los hongos (Orpin, 1986).

Hasta el presente han sido descritos otros tipos morfológicos, tales como *Neocallimastix frontalis*, *Piromyces comunis* y *Orpinomyces joyonii* (Van Soest, 1982).

#### **2.2.4.1 Distribución**

La distribución de estos hongos estrictamente parece estar limitada al tracto digestivo de los rumiantes y estando altamente relacionados con las dietas fibrosas, (Bauchop, 1981). Desde que Orpin (1975), demostrara que los hongos anaeróbicos están presentes en el rumen.

#### **2.2.4.2 Ciclo de vida**

Orpin (1975), observó que algunos componentes de la dieta (inductores) parecían ser responsables por la iniciación de la diferenciación dentro de los esporangios y posterior liberación de los zoosporos. La zoosporogénesis fue inducida *in vitro* cuando los esporangios de *N. frontalis* fueron expuestos a un compuesto extraído con solventes de la cebada. Posteriormente se demostró, que compuestos, los cuales están presentes en casi todos los tejidos vegetales, eran capaces de estimular el crecimiento y la zoosporogénesis del *N. frontalis*. (lowe *et al.*, 1987; Orpin,1986).

Por lo tanto, el material vegetal que entra al rumen no sólo proporciona los inductores para estimular la zoosporogénesis, sino que también es usado como sustrato para el crecimiento vegetativo. Cuando los flagelados son liberados, ellos invaden, se adhieren y germinan en el material vegetal, tanto en el rumen como *in vitro*. Los flagelados de *N. frontalis* muestran particular preferencia por ciertos tejidos de la planta como la inflorescencia, donde invaden el estoma, tejido vascular tejidos del tallo y hojas, y zonas que han sufrido daño (Orpin, 1977).

Lowe *et al.*, (1987), observaron que los zoosporos antes de adherirse a la matriz sólida, muestran ciertos cambios en su figura de tipo amiboideo, los cuales son considerados como preparatorios para el enquistamiento. La posterior Terminación del zoosporo enquistado da como resultado la producción de un tallo con una amplia porción radical (rizoide) y el esporangio (Bauchop *et al.*, 1983). Aunque el desarrollo de

los rizoides es rápido, el tamaño del esporangio maduro es alcanzado entre 12 y 24 horas después de la fijación del zoosporo. La aparición de la zoosporogénesis se inició justo con la aparición del tabique o septum, el cual constituye una barrera para el flujo del citoplasma desde el sistema radical (Bauchop *et al.*, 1983).

Así, se ha estimado que la duración del ciclo de vida de los hongos anaeróbicos, habitando en el rumen de animales que son alimentados una vez por día, puede durar entre 24 y 32 horas (Obispo, 1992).

#### **2.2.4.3 Función de los hongos anaeróbicos del rumen**

Una abundante digestión de los componentes fibrosos de las plantas, por parte de los hongos anaeróbicos ha sido claramente demostrada en numerosos experimentos *in vitro*. (Akin, 1987; Bauchop, 1979; Demeyer, 1981). Estos hongos han demostrado poseer una amplio rango de enzimas que pueden degradar los principales carbohidratos estructurales (celulosa y hemicelulosa) de las paredes celulares de las plantas (Obispo, 1992). Aunque no hay evidencia de que los hongos anaeróbicos pueden utilizar lignina como fuente de carbono (Akin, 1987; Bauchop, 1979; Demeyer, 1981). La actividad de los hongos anaeróbicos del rumen sobre degradación de la celulosa fue considerable en cultivos mixtos con las bacterias *Veillonella alcalescens* y *Megasphaera elsdenii* que utilizan lactato, y en cultivos con *Fibrobacter succinogenes* (Obispo, 1992).

Al igual que para las bacterias ruminales, existen diferencias entre las diversas cepas de hongos anaeróbicos en cuanto a la utilización de los distintos substratos. En términos generales, muchas de las especies de estos hongos son capaces de usar como fuentes de carbono los carbohidratos solubles glucosa, celobiosa, xilosa, maltosa y sucrosa (Obispo, 1992).

Sin embargo, a pesar de la gran capacidad de estos hongos para degradar los componentes estructurales de las paredes de las plantas, el mayor porcentaje de esta degradación es aún asignada al grupo de las bacterias (Obispo, 1992).

En su fase móvil (zoospora) estos microorganismos se reconocen por la presencia de un flagelo como se muestra en la figura 2-4A, que los ayuda a desplazarse



en el líquido ruminal hasta llegar a una partícula de alimento, una vez en contacto con el alimento los hongos se enquistan muestra la figura 2-4B, formando un rizoide ramificado muestra la figura 2-4C, que penetran y debilitan la pared celular de la partícula de forraje. A partir de este momento comienza la formación de su fase vegetativa no móvil (esporangio), que produce nuevas zoosporas muestra la figura 2-4D.

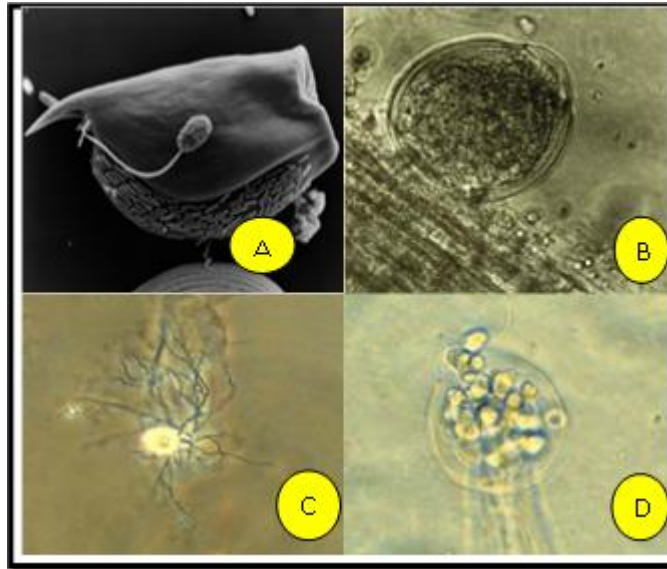


Figura 2-4. Ilustración de la actividad degradativa del sustrato por hongos en el complejo retículo-rumen (Rodríguez y Valencia, 2008).

### 2.2.5 Levaduras

El grupo de las levaduras son hongos microscópicos unicelulares, fueron el último tipo de microorganismos ruminales en ser descubierto por lo que su modo de acción para hidrolizar las partículas de alimento (Hebraud y Fèvre, 1988). Pueden contribuir hasta con un 8 % de la masa microbiana y se adaptan a sobrevivir en condiciones de anaerobiosis aunque también se encuentran presentes organismos facultativos (Broderick *et al.*, 1991).

Estos microorganismos del rumen tienen importancia en la digestión de los alimentos fibrosos durante las primeras cinco horas después de consumidos producen un complejo enzimático capaz de degradar la fibra. Las funciones principales de hongos y levaduras es debilitar las estructuras de algunos tejidos de los forrajes incrementando la superficie disponible para la digestión bacteriana, mejorando así la efectividad de la rumia y degradabilidad de la fibra (Lara y Chalela, 2002). En segundo lugar, algunas levaduras anaerobias facultativas pueden favorecer las condiciones de anaerobiosis en el rumen al eliminar el oxígeno, esta condición incrementaría la proliferación de microorganismos de tipo anaeróbicos en el rumen (Fonty y Joblin, 1991).

De acuerdo a algunos autores (Minson, 1990; Fonty y Joblin, 1991) otros beneficios observados en actividad en función al rumen a la capacidad que presenta las levaduras para producir numerosas enzimas (proteasas, peptidasas, invertasas, hidrolasas, maltasas, fosfatasas, galactosidasas, etc), que pueden adquirir importantes implicaciones en los procesos para facilitar la digestión de la materia seca del alimento, este mecanismo podría brindar mayores beneficios en animales rumiantes (por su dependencia de la digestión fermentativa).

### **2.1.5.1 Morfología**

Las levaduras son hongos microscópicos unicelulares, que presentan diversidad respecto al tamaño celular, forma y color, aun tratándose de células individuales de una misma cepa, debido principalmente a la alteración de las condiciones físicas y químicas en el ambiente. Generalmente son de forma esférica u ovalada y miden entre 5 y 10 micras. Viven en estado aislado hasta que adquieren el tamaño adecuado para dividirse, produciendo células hijas, que a su vez se separan, extienden y dividen de la misma manera. Se consideran como organismos facultativos, lo cual significa que pueden sobrevivir y crecer con o sin oxígeno (Yanke *et al.*, 1995).

En cuanto a su estructura, la levadura está compuesta por la envoltura de la célula que incluye la membrana plasmática, un espacio periplásmico y una pared celular; además de citosol, núcleo, mitocondria, retículo endoplasmático, aparato de Golgi,

vacuola, vesícula secretora (S) y peroxisoma (Rivera y León, 2005). La pared celular tiene una estructura semirrígida permeable al soluto que proporciona a las levaduras una considerable fuerza compresional y tensil en la cual se desarrollan las marcas de nacimiento durante la división celular ilustrado en la figura 2-5; y está constituida principalmente por una pequeña cantidad de péptido y polisacáridos principalmente  $\beta$ -glucanos y manano-oligosacáridos (MOS), los cuales tienen impacto en el sistema inmunológico y en la capacidad de prevenir la colonización de bacterias patógenas en el tracto gastrointestinal (Randez *et al.*, 2003.)

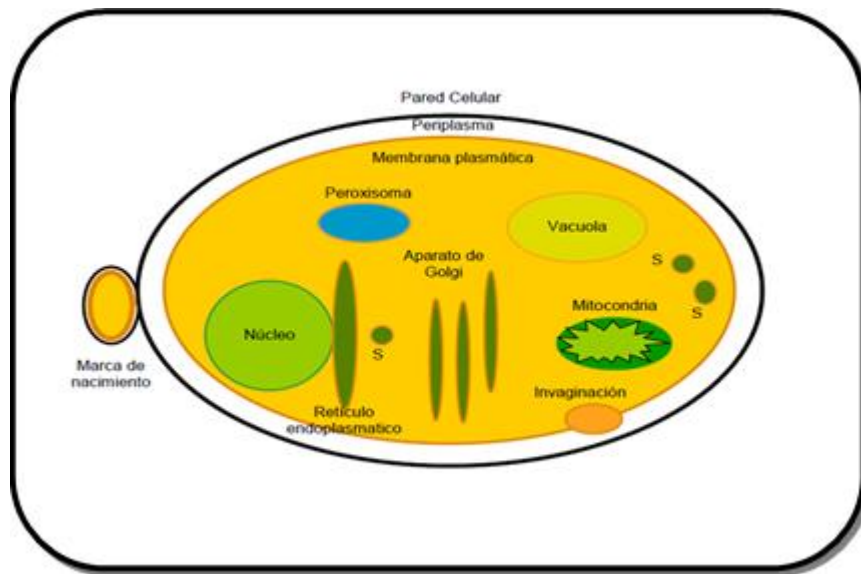


Figura 2-5. Esquema de estructura y organelos de una levadura (Feldmann, 2005).

Entre los constituyentes micromoleculares de la levadura, a pesar de que son variables, predominan los hidratos de carbono (polisacáridos) y en menor proporción se encuentran proteínas (glicoproteínas), aunque la levadura seca es una buena fuente de proteína (aproximadamente el 40% del peso de la levadura); grasas (lípidos); polifosfatos y ácidos nucleicos (Peñalva, y Arst, 2004.). Las levaduras proporcionan vitaminas del complejo B (principalmente tiamina, riboflavina, niacina y ácido pantoténico), vitamina D (ergosterol), minerales y aminoácidos (niveles sobresalientes

de lisina y metionina). Por este alto contenido de nutrientes de alto valor nutricional que se encuentran fácilmente disponibles (Von, 2001.)

### 2.1.5.2 Reproducción asexual

La mayoría de las levaduras se reproducen asexualmente por gemación y unas pocas difusiones binarias (Cobos, 2007). El proceso de gemación se forman una pequeña protuberancia en la perforación de la célula, la cual se debe a un debilitamiento local de pared celular. Esta pequeña protuberancia se agranda, al irse llenando del material citoplasmático proveniente de la célula, hasta alcanzar casi el tamaño de esta.

El material nuclear se replica por mitosis y una parte pasa a la célula de la hija. Se forma la pared de la madre (Roger y Stanier, 1992).

La producción de las gemas puede ocurrir en uno en ambos extremos de la célula, lo que se conoce como gemación polar ilustrado en la figura 2-6. En el lugar de donde se formo una gemación queda una cicatriz en la pared de la célula (Roger y Stanier, 1992).

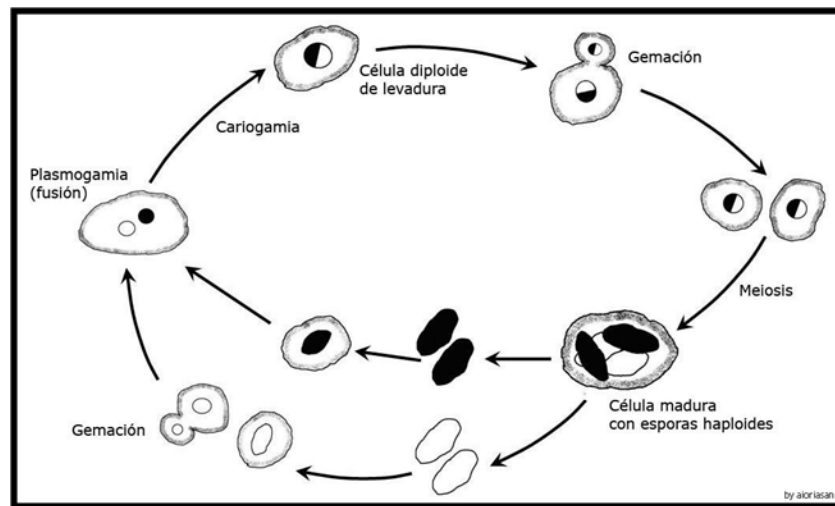


Figura 2-6. Esquema del proceso de gemación de las levaduras (Roger y Stanier, 1992).

En ocasiones las levaduras pueden permanecer unidas y formar nuevas gemas y así sucesivamente; esto produce la formación de cadenas de levaduras conocidas con el nombre de pseudomicelio (Roger y Stanier, 1992).

### 2.1.5.3 Reproducción sexual

La reproducción de las levaduras puede ser por medio de la formación de esporas sexuales (ascosporas o basidiosporas), dependiendo de tipo de célula especializada donde se formen (un asca o una basidia) muestra la figura 2-7. Ambos tipos de esporas requieren que ocurra la unión de núcleos compatibles y una división meiótica (Roger y Stanier, 1992).

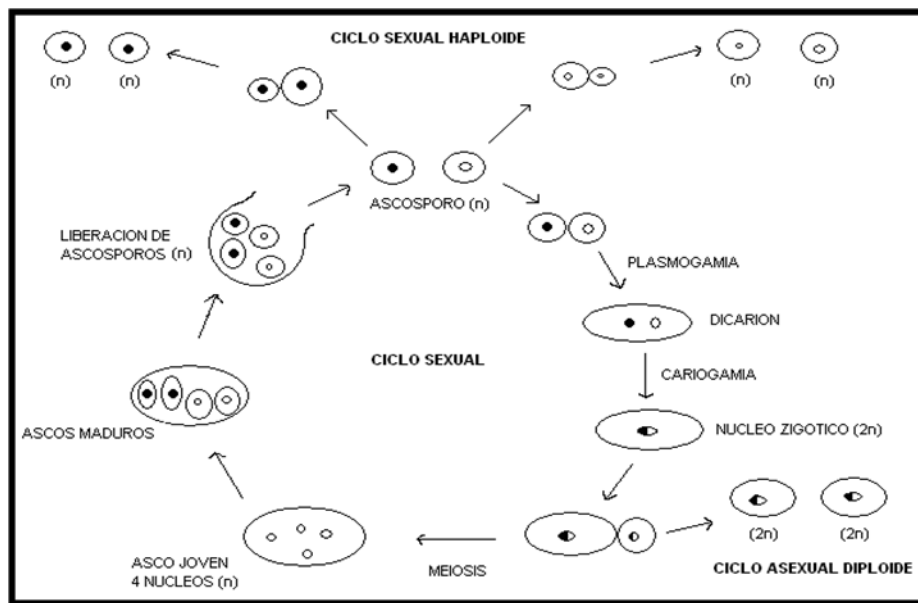


Figura 2-7. Esquema del ciclo de vida una levadura ascosporada (Roger y Stanier, 1992).

### 2.1.5.4 Metabolismo

La mayoría de levaduras usan azúcares como su principal fuente de carbono y energía. La mayor fuente de energía es la glucosa y la glucólisis es la principal vía para la conversión de la glucosa a piruvato. La producción de energía en forma de ATP es acompañada de la generación de intermediarios y disminución de energía en forma de

NADH para las vías biosintéticas ilustrado en la figura 2-8. El metabolismo de las levaduras como en los demás organismos, esta mediado por reacciones enzimáticas (Roger y Stanier, 1992).

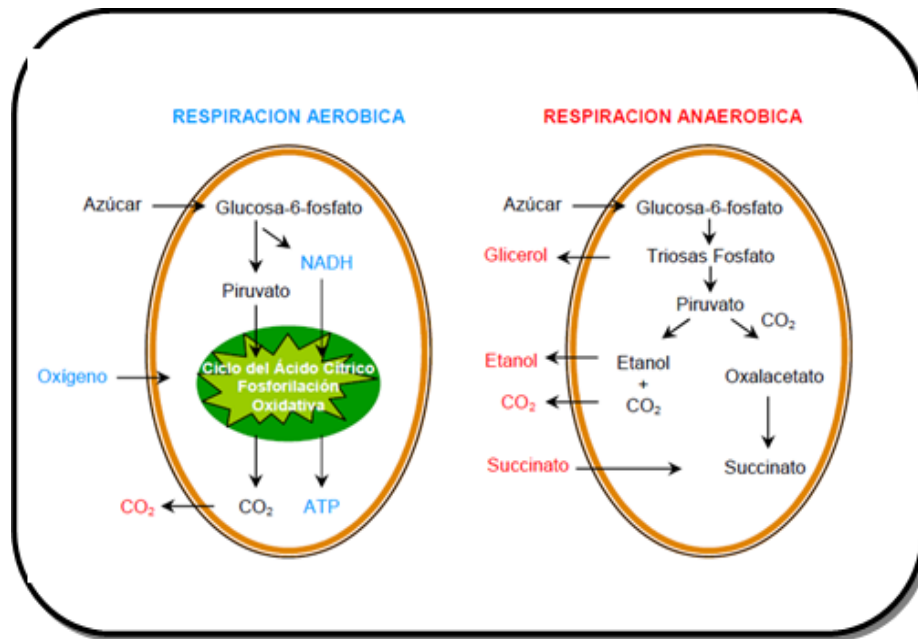


Figura 2-8. Esquema de metabolismo de una levadura bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas (Roger y Stanier, 1992).

### 2.1.5.5 Temperatura

La temperatura es un factor relevante, debido a que desde el punto de vista microbiológico, presentan temperaturas óptimas para su crecimiento donde se obtiene el mayor rendimiento. Esta temperatura suele encontrarse muy cerca de la temperatura máxima soportada y varía según la clase de microorganismo. En las levaduras la temperatura afecta la capacidad de éstas para desdoblar los azúcares, la reproducción y el crecimiento celular, con temperaturas mínimas permisibles entre 0.3 y 0.5 °C, y las máximas entre 34 y 47 °C (Frobisher, 1969).

### **2.1.5.6 pH**

El pH es, al igual que la temperatura, una variable significativa en la producción de biomasa (Frobisher, 1969). Cada microorganismo presenta un rango de pH donde su crecimiento es posible e incluso algunos presentan un pH óptimo, puesto que cambios en el pH son causantes de la desnaturalización de enzimas y de problemas en el intercambio de iones en la membrana celular. Tiene además influencia en la inhibición por pH debido al efecto que esta variable tiene sobre los centros activos de las enzimas, en la variación en las proporciones de los constituyentes del producto final de una fermentación (Frobisher, 1969). En la fermentación de levaduras, los valores de pH entre 3 y 6 generalmente favorecen el crecimiento y la actividad fermentativa (Rose, 1987).

### **2.1.5.7 Oxígeno**

Las levaduras son aeróbicas o facultativas, cuando el oxígeno está presente, éstas crecen eficientemente a partir de carbohidratos del medio para producir la biomasa y CO<sub>2</sub>. Sin embargo cuando no hay oxígeno o éste disminuye, las levaduras cambian a metabolismo anaerobio o fermentativo, que se traduce en la formación de menor cantidad de biomasa (Brock. 1997; Sarmiento 2003).

## **2.2.6 Interrelaciones entre los microorganismos**

Las poblaciones microbianas descritas anteriormente bacterias, protozoarios hongos y levaduras interactúan en el ecosistema ruminal para maximizar la eficiencia de fermentación del alimento la nutrición microbiana, pueden establecerse dos grupos de microorganismos: los que fermentan los alimentos y los que fermentan los productos de fermentación producidos por los primeros. Esta segunda población tiene una función básica eliminando los productos finales de la fermentación del primer grupo y proporcionándoles factores esenciales para su crecimiento. Es por eso que en cultivos puros se descubren muchos productos finales que no se detectan en cultivos mixtos de microorganismos ruminales. Un ejemplo de estas relaciones son los ácidos grasos

volátiles de cadena ramificada (AGVR), que son producidos por las especies amilolíticas y son esenciales para las celulolíticas para la síntesis de aminoácidos o para la producción de ácidos grasos de cadena larga (Wolin *et al.*, 1997).

### **2.2.3 Efecto de la dieta sobre las poblaciones microbianas**

La dieta es el factor más determinante sobre el tipo y las proporciones de poblaciones microbianas, por lo que determina el perfil de fermentación ruminal (Yokohama y Johnson, 1988). Las diferencias son máximas entre dietas forrajeras y dietas ricas en concentrado. Las dietas forrajeras favorecen el establecimiento de una flora fibrolítica, donde predominan bacterias del género *Butyrivibrio* spp. Mientras que en dietas concentradas con bajos niveles de fibra, la concentración bacteriana es mayor, con poblaciones amilolíticas donde predominan bacterias (Pérez, G. O. 1990). Estas dietas suelen tener altas velocidades de digestión y de producción de ácidos, por lo que el medio se acidifica y se reducen las poblaciones celulolíticas y metanogénicas que son más sensibles al pH ácido (Preston y Leng, 1987).

Ante un cambio de dieta, la población tiene que adaptarse hacia un nuevo equilibrio. El mayor riesgo se produce al introducir grandes cantidades de concentrado en animales que reciben una dieta forrajera, por su efecto sobre las bacterias que producen y utilizan lactato. En un primer momento, por efecto de un descenso en el pH, desaparecen las bacterias utilizadoras de lactato y las amilolíticas son sustituidas por otras bacterias productoras de lactato, llevando a un descenso de pH más grave, y una acidosis láctica. Pero al adaptarse, las poblaciones formadoras de lactato y las utilizadoras se equilibran y prácticamente no se detecta ácido láctico en el contenido ruminal (Tamminga, 1996).

## **2.3 Medio de cultivo**

La producción de levaduras, requiere además de unas condiciones ambientales óptimas, de una variedad de nutrientes esenciales y vitaminas ( Stewart y Bryant, 1988). Los nutrientes existentes en los medios de cultivo dan a la célula microbiana todos los



ingredientes requeridos para que produzca más células semejantes a ella misma. Por lo tanto, es conveniente considerar un diseño de medio de fermentación que genere las mejores garantías de crecimiento, el mejor desarrollo para el microorganismo y el máximo rendimiento de producción. El medio debe satisfacer los requerimientos nutricionales y ambientales del microorganismo, además de las restricciones técnico-económicas para minimizar los costos de separación y purificación. La determinación de los requerimientos nutrimentales, ambientales y la composición, dependen de la estequiometría de crecimiento y formación de producto (Wolin *et al.*, 1997).

## **2.4 Bioquímica del rumen**

Los procesos de biotransformación en el rumen se dan gracias a la actividad biológica fermentativa de la microflora ruminal (Varga y Kolver, 1997).

Esta fermentación microbiana es el resultado del metabolismo de muchas especies de bacterias, protozoarios y hongos. Resulta imposible separar las distintas vías metabólicas utilizadas por las distintas especies ya que el producto final de una especie puede ser el sustrato para otra. Esto crea una interdependencia entre distintos que forman consorcios para poder sobrevivir en el rumen (Trinci *et al.*, 1994).

### **2.4.1 Digestión de azúcares en el rumen**

A partir de la hidrólisis de los carbohidratos, realizada por microorganismos del rumen especialmente por las bacterias ruminales, se producen grandes cantidades de ácidos grasos volátiles (AGV); acético, propiónico y butírico, que constituyen la principal fuente de energía utilizada por los rumiantes (Rivera, 2005). Los polisacáridos más importantes en el rumen son; celulosa, hemicelulosa, almidones, pectina y lignina, algunos azúcares simples como los disacáridos maltosa y celobiosa, que son productos intermedios de la hidrólisis de azúcares complejos (Fuentes, 2006).

### **2.4.2 Digestión de la celulosa**

La utilización de la celulosa, es quizá la función más importante de los procesos microbianos del rumen (Rivera, 2005). La hidrólisis de la celulosa se da por una enzima

celulosa, cuya acción disminuye cuando la dieta es rica en almidón, azúcares simples y otros azúcares solubles. El producto final de la hidrólisis de la celulosa es el ácido acético, pero también pueden producirse en forma indirecta ácido propiónico y ácido butírico (Fuentes, 2006).

### 2.4.3 Digestión del almidón

El almidón es atacado por enzimas productoras de amilasa y el producto final de este proceso es el ácido propiónico, aunque también suele producirse ácido láctico y algunos sacáridos de cadena larga. Cuando hay grandes cantidades de almidón en la dieta, hay síntesis elevada de ácido láctico lo que produce cierto grado de acidez ruminal (Beever, 1993).

### 2.4.4 Digestión de las pectinas

Las pectinas son desdobladas por bacterias productoras de pectinesterasas a metanol y ácido galacturónico, que posteriormente se convierten en metano y pentosas, las cuales (por la vía colateral de las pentosas) se transforman en fructuosa, la cual entra al ciclo de Krebs y produce una fuente importante de energía ilustrado en la figura 2-9 (Beever, 1993).

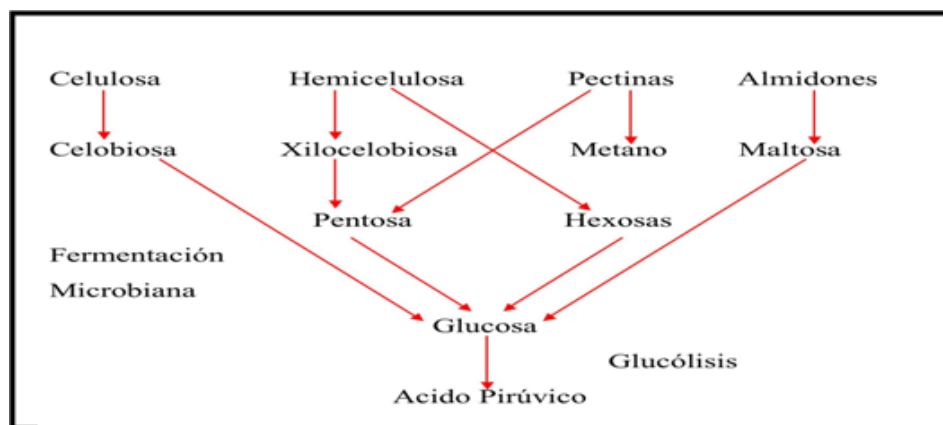


Figura 2-9. Esquema de las vías metabólicas mediante la hidrólisis de polisacáridos presentes en rumen (Fuentes, 2006).

#### **2.4.5 Formación de ácidos grasos volátiles (AGV)**

La síntesis de ácidos grasos volátiles es un proceso bioquímico complejo, que inicia con la síntesis de glucosa a partir de los carbohidratos como celulosa, hemicelulosa, almidones y pectinas, los cuales, mediante la acción de enzimas microbianas, son desdoblados hasta azúcares simples (Sisson y Grossman, 1974.). La glucosa, mediante el proceso de glucólisis, da como resultado final la formación de ácido láctico y ácido pirúvico, a partir del cual mediante procesos de hidrogenación, da como resultado la síntesis de los tres diferentes ácidos grasos volátiles: acético, propiónico y butírico (Beever,1993).

El ácido acético predomina cuando la dieta está basada en forrajes, pero también es el principal AGV, formado a partir de proteínas y grasas, en casos de gluconeogénesis durante procesos de cetosis muestra la figura 2-10 (Toporek, 2001).

El ácido propiónico aumenta con dietas ricas en almidón y azúcares simples, por lo que constituye la fuente más importante de energía para el bovino. A partir de lactato se sintetiza principalmente ácido propiónico y parcialmente ácido butírico (Toporek, 2001).

El ácido butírico es producido durante la fermentación de lactato y de azúcares simples. Su proporción aumenta cuando se adiciona melaza a la dieta y como derivado de la beta oxidación, al usarse las grasas corporales como fuente de energía durante los procesos de cetosis (Rivera, 2005).

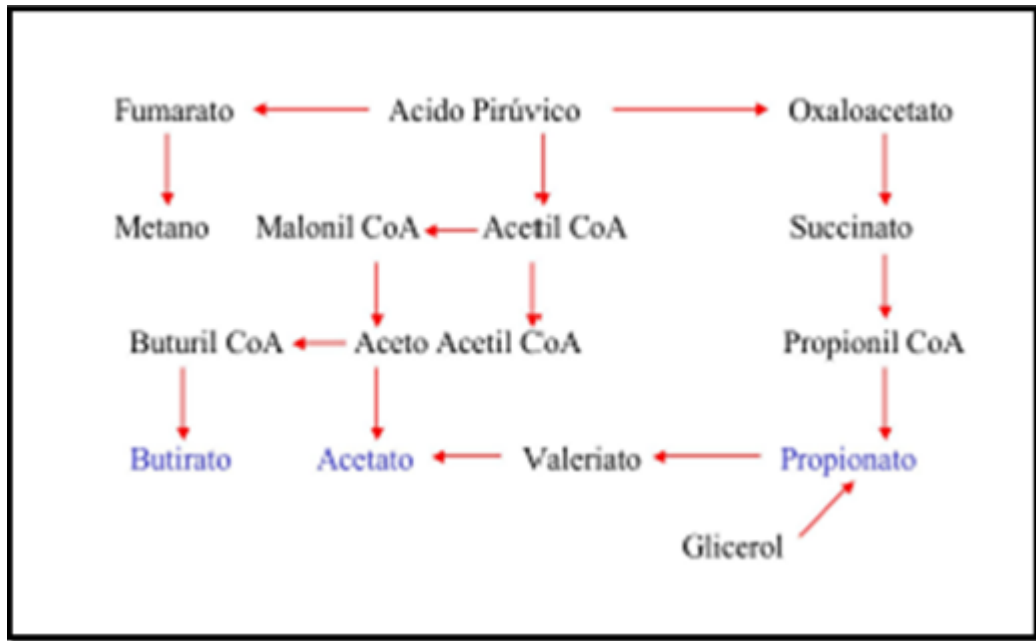


Figura 2-10. Esquema de las vías metabólicas mediante la síntesis de ácidos grasos en rumen (Fuentes, 2006).

#### 2.4.6 Digestión de proteínas en el rumen

Los estudios de Toporek (2001), menciona que la digestión de compuestos nitrogenados se da en dos etapas:

- ❖ Por la fermentación de enzimas proteolíticas bacterianas sobre proteínas y nitrógeno no proteico
- ❖ Por el desdoblamiento de las proteínas y péptidos por acción de las enzimas del abomaso.

Las principales fuentes de nitrógeno en el rumiante (Toporek, 2001).

- ❖ Proteína verdadera o preformada (la que está presente en el alimento)
- ❖ Proteína microbiana (la que es formada por síntesis bacteriana)
- ❖ Nitrógeno no proteico (constituido por urea, amonio o nitratos y nitritos).

- ❖ Otras fuentes, son los productos de descamación del epitelio ruminal, así como la degradación de las mismas bacterias y protozoarios.

La degradación proteica (preformada y microbiana), se inicia con la acción de las enzimas bacterianas extracelulares y la fagocitosis de los protozoarios, dando como resultado péptido libre, así como proteínas formadas a partir de síntesis microbiana. Las proteínas que escapan a la digestión microbiana se conocen como proteínas de sobrepaso y son digeridas en abomaso y duodeno (Toporek, 2001).

La transformación de proteína y nitrógeno no proteico se divide en dos etapas:

- ❖ La primera es la degradación de sustancias nitrogenadas hasta amoníaco y ácidos grasos.
- ❖ La segunda es la utilización del amoníaco y cadenas de hidrocarburos para sintetizar nuevos aminoácidos y nuevas proteínas.

La degradación de la proteína se da en tres etapas de digestión:

- ❖ Proteólisis efectuada por las enzimas microbianas dando como resultado la formación de péptidos libres.
- ❖ Por acción de peptidasas, los péptidos de cadena corta, son degradados produciendo aminoácidos libres.
- ❖ Las desaminasas hidrolizan a los aminoácidos y dan como resultado final, amoníaco, cetoácidos, hidroxiaácidos y ácidos grasos.

Tanto los péptidos como los aminoácidos producidos, pueden seguir la ruta de desdoblamiento microbiano o bien ser utilizados en la síntesis de proteína microbiana (figura 2-11).

La síntesis de proteína microbiana es importante y se lleva a cabo tanto en las bacterias como en los protozoarios, pero además de amonio se requiere una fuente importante de hidrocarburos para efectuarse tal síntesis (Toporek, 2001).

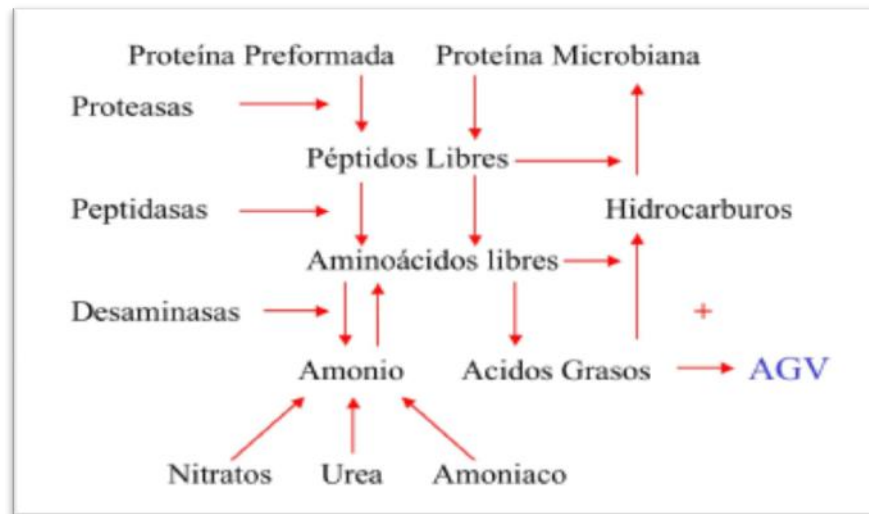


Figura 2.11 Esquema de las vías metabólicas mediante la digestión de proteínas en rumen (Fuentes, 2006).

#### 2.4.7 Hidrólisis ruminal de los lípidos

Las fuentes de lípidos en el rumen, son ácidos grasos insaturados presentes en el alimento, adicionados como energéticos, los triglicéridos y otros compuestos lípidos estructurales, formados a partir de la degradación de la membrana celular microbiana (Toporek, 2001).

Los lípidos son atacados por lipasas microbianas y son desdoblados hasta ácidos grasos y glicerol. Los triglicéridos son atacados por esterases y lipasas bacterianas presentes en el líquido ruminal (Toporek, 2001).

Los ácidos grasos libres de cadena corta, se absorben directamente en la pared ruminal y los ácidos grasos de cadena larga son utilizados por los microbios para la síntesis de lípidos estructurales o bien abandonan el rumen pasando a los siguientes compartimentos gástricos (Toporek, 2001).

Los ácidos grasos insaturados, son hidrogenados para formar glicerol, el cual es metabolizado por la enzima glicerolcinaasa para la síntesis de ácido propiónico (Toporek, 2001).

La hidrogenación ocurre con mayor velocidad en ácidos grasos libres. En los ácidos grasos monoinsaturados ocurre más lentamente, sin que los mecanismos de hidrogenación estén claros. Se sabe que el proceso requiere de fuentes de hidrógeno, que al parecer es activado por la glucosa y el ácido pirúvico muestra la figura 2-12 (Rivera, 2005).

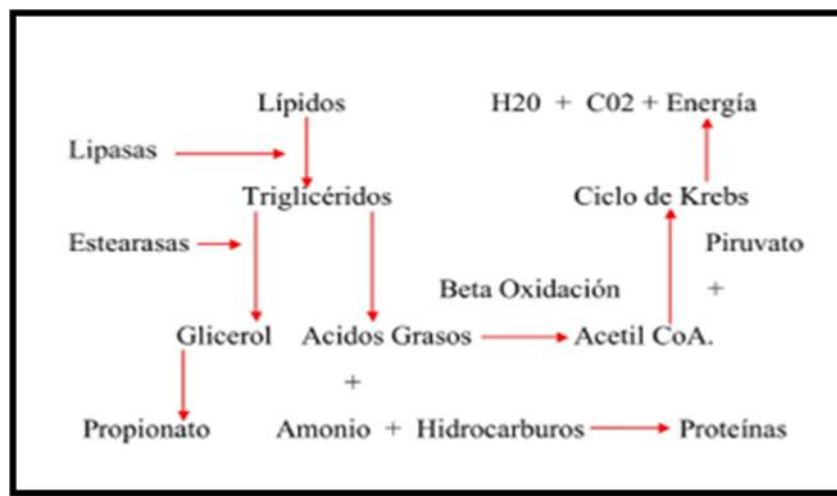


Figura 2-12. Esquema de las vías metabólicas mediante la hidrólisis de lípidos en rumen (Fuentes 2006).

Con la hidrogenación se facilita el crecimiento bacteriano, dado que los ácidos grasos insaturados, alteran la permeabilidad de la membrana microbiana, inhibiendo su desarrollo (Rivera, 2005).

#### 2.4.8 Síntesis de vitaminas en el rumen

El rumiante adulto puede prescindir de vitaminas hidrosolubles y vitamina K gracias a la síntesis que realizan los microorganismos ruminales. Las vitaminas que se

sintetizan en el rumen son; tiamina, riboflavina, piridoxina, niacina, ácido pantoténico, ácido fólico, ácido lipóico (Beever, 1993).

## **2.5 Subproductos de la industria cervecera en la alimentación de ganado.**

El elevado costo de los ingredientes proteicos y energéticos impide la utilización de suplementos en el ganado bovino, lo que repercute en bajos niveles de producción de carne por animal y por hectárea. Una alternativa para disminuir el costo de la suplementación del ganado es la utilización de subproductos de cervecería. Existen varios subproductos derivados de la fabricación de cerveza (grano húmedo, ó masilla, cascarilla, crema final y levadura) que pueden utilizarse en la alimentación de novillos de engorda y de vacas productoras de leche (Dawson 1992; Ángeles *et al.*, 1998).

Son varios los subproductos que pueden ser producidos en asociación con la producción de cerveza, entre los cuales están el bagazo de cerveza húmedo o seco, la levadura de cerveza seca (Dawson 1992; Ángeles *et al.*, 1998).

### **2.5.1 Actividad microbiana en la fermentación ruminal y el efecto de la adición de *Saccharomyces cerevisiae***

La fermentación ruminal en los rumiantes está influenciada por la interacción entre la dieta, la población de microorganismos y el animal. Los aspectos importantes en el rumen para la fermentación, son: a) condiciones para una eficiente actividad celulolítica y b) necesidades de la síntesis óptima de proteína microbial (Chalupa, 1977).

Levadura es un nombre genérico que agrupa a una variedad de organismos unicelulares, incluyendo especies patógenas para plantas y animales, y especies no solamente inocuas sino de gran utilidad *Saccharomyces cerevisiae* es una levadura que constituye el grupo de microorganismos más íntimamente asociado al progreso y bienestar de la humanidad; su nombre deriva del vocablo *Saccharo* (azúcar), *myces*



(hongo) y *cerevisiae* (cerveza) (Hernández 1999). Investigaciones realizadas con *S. cerevisiae* y la interacción que se produce con la dieta que se ofrece a los animales, presentan nuevas oportunidades, para definir la modificación que causan al metabolismo ruminal, por efecto de las diferentes cepas de cultivos y su diferente cantidad suministrada (Dawson, 1992).

### **2.5.2 Cultivos microbianos**

Los cultivos microbianos son productos formados por una mezcla de microorganismos (hongos unicelulares y levaduras), enzimas, vitaminas, medios de cultivo y factores no identificados relacionados con la levadura, que tienen efectos benéficos en la fermentación ruminal; el efecto del cultivo de levadura en la alimentación de los rumiantes no es constante, lo cual se debe a la combinación de distintos factores inherentes a las levaduras (nucleótidos, aminoácidos y vitaminas) que son proporcionados a los microorganismos simbióticos del rumen por medio del proceso de lisis bacteriana (Jones y Thomas, 1987).

### **2.5.3 Principales características**

Hubert (1987), Jones y Thomas (1987), mencionan que los cultivos de levadura presentan varias características importantes: 1) No son patógenos, ni tóxicos, 2) No se absorben en el tracto digestivo, 3) No dejan residuos en los tejidos animales, 4) Se utilizan en pequeñas cantidades, 5) Proliferan in vivo e in vitro, 6) Promueven el crecimiento de bacterias celulolíticas, 7) Son estables a temperaturas elevadas y 8) No causan mutación.

### **2.5.4 Factores que afectan la población de microorganismos ruminales**

La concentración de las poblaciones microbianas que viven en el rumen en anaerobiosis, específicamente para bacterias, protozoarios y hongos son de  $10^{10}$ /ml,  $10^6$ /ml y  $10^4$ /ml 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 h y sostener así la concentración de las poblaciones microbianas (McCallister *et al.*, 1994).

Los tiempos de multiplicación varían de 5-14 h para los protozoarios (Williams y Coleman 1988) y de 24-30 h 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 relación a la tasa de dilución del líquido (Aguilera, 1988).

Se ha reportado (Gedek *et al.* 1993), que la adición de levadura *S. cerevisiae* incrementa la concentración de bacterias Gram negativas en el contenido ruminal ( $1.6 \times 10^4$  vs  $2.0 \times 10^5$  UFC/ml, mencionando además, que la levadura estimula el crecimiento de bacterias amilolíticas a nivel ruminal, estos resultados que fueron confirmados por Kumar *et al.* (1994), Harrison *et al.* (1988), y Dawson *et al.* (1990), quienes indican que la levadura incrementa el número de bacterias totales, celulolíticas, amilolíticas, protozoarios, hongos y levaduras.

#### **2.5.4 Mecanismos de acción de *S. cerevisiae* para incremento de digestibilidad en el rumen**

Para poder usar la levadura en la alimentación del ganado ésta tiene que ser inactivada, es decir inhibir la actividad celular para que al ser ingerida por animal no exista competencia por los nutrientes con la flora microbiana ruminal (Montero 2009).

Dawson (1987), Dildey (1988), Williams (1989) y Dawson (1992), propusieron que posiblemente los mecanismos de acción de las levaduras que aumentan la digestibilidad pueden atribuirse a lo siguiente: un cambio en la flora bacteriana por competencia y estimulación del crecimiento, por medio del aumento de la actividad celulolítica y

alteración de la síntesis microbiana; modulación del ambiente ruminal evitando fluctuaciones en bacterias metanogénicas; optimización de la absorción de minerales; son fuente de nutrientes y productos esenciales como aminoácidos, vitaminas y enzimas; incremento en metabolitos como ácidos grasos volátiles a causa de una mayor actividad bacteriana; disminución de la concentración del nitrógeno amoniacal; modifican el perfil de aminoácidos en el flujo duodenal; incrementan la proteína de sobre paso; disminuyen la concentración de ácido láctico; e incrementan la degradabilidad de la fibra.

Las características de *S. cerevisiae* permiten eliminar el oxígeno del ambiente ruminal, con lo que se facilita el crecimiento de bacterias anaeróbicas estrictas, es decir de bacterias celulolíticas que promueven la degradación de la pared celular ( Galloway *et al.*, 1991; Dawson 1992); y estimulan el crecimiento de bacterias que utilizan lactato y digieren celulosa (Callaway y Martín 1997); por lo tanto, incrementan la digestibilidad de la dieta, así como la relación acético-propiónico (Plata y Mendoza 1993).

Los cultivos puros *S. cerevisiae* se reproducen mitóticamente, pero los medios con alto contenido de fibra estimulan su esporulación ( Plata y Mendoza, 1993). Durante la esporulación el cultivo de levaduras *S. cerevisiae* sintetiza seis tipos de enzimas  $\beta$  1-6 y 1-3 glucanasas, lo cual tiene por finalidad desdoblar la pared celular que lo rodea (Hien y Fleet 1983).

## **2.6 Enzimas**

Una enzima es una molécula proteica globular capaz de catalizar y acelerar reacciones químicas específicas, en un factor de  $10^{12}$  a  $10^{20}$  respecto a las reacciones no catalizadas enzimáticamente (Madigan *et al.*, 1999; Whitaker, 1994). La actividad molar de las enzimas es muy alto; una molécula de enzima puede transformar hasta 600,000 moléculas de sustrato por segundo, como es el caso de Anhidrasa carbónica, 12,500 para lactasa y 700 para invertasa (Fennema, 1993).

Todas las enzimas son proteínas producidas por células vivas, son las más variadas y más altamente especializadas por los sustratos. Se han descubierto en diferentes organismos miles de enzimas distintas cada una, las cuales catalizan un tipo diferente de reacciones químicas y funcionan en soluciones acuosas en condiciones químicas muy suaves de temperatura y pH. Por lo general estas sustancias tampoco afectan el equilibrio de una reacción química, sino que simplemente la aceleran hasta alcanzar el equilibrio (Fennema, 1993).

### **2.6.1 El ecosistema ruminal como fuente de enzimas**

La microflora produce un volumen vasto de enzimas encargadas de intervenir activamente en el proceso de degradación del material alimenticio, cuya complejidad de este sistema no puede ser subestimada (Yokohama y Jonson, 1993). Los organismos funcionan de manera sinérgica y competitiva y, debido a su gran diversidad, pueden adaptarse a una amplia variedad de alimentos convirtiéndolos en sustratos energéticos y en proteínas utilizables por el rumiante (Fuentes, 2006).

La actividad enzimática confirmada que existe en el rumen es muy diversa, e incluye las enzimas que degradan los polímeros de las paredes celulares en las plantas (celulasas, xylanases,  $\beta$ -glucanasas, pectinasas, etc.), las amilasas, las proteasas, las fitasas y las encargadas de degradar las toxinas presentes en un grupo de especies vegetales (p.ej. taninasas). La variedad de enzimas presentes en el rumen viene dada no sólo por la diversidad de su comunidad microbiana sino también por la multiplicidad de enzimas fibrolíticas producidas por microorganismos individuales (Fuentes, 2006).

### **2.6.2 Enzimas con aplicación industrial**

Las enzimas son proteínas con capacidad catalítica, es decir, pueden acelerar la velocidad de una reacción química, incluso añadidas en cantidades mínimas. En los últimos años, esta experimentado grandes aplicaciones de enzimas en la industria alimentaria, farmacéutica, textil, entre otras. Los procesos catalizados por enzimas en la

industria son cada día más numerosos, ya que presentan ventajas frente a los catalizadores no biológicos (Badui, 2000).

Una de las principales ventajas de las enzimas, además de las de índole económica o biotecnológica, está asociado a su gran especificidad de acción que hace que no se produzcan reacciones laterales imprevistas. Asimismo, se pueden trabajar en condiciones moderadas: presión atmosférica, temperaturas bajas o medias y pH de 3 a 10. Además las enzimas pueden inactivarse fácilmente cuando se considera que han cumplido su objetivo (Patnaik, 2002).

**Enzimas microbianas:** Las enzimas producidas por la fermentación de microorganismos representan aproximadamente el 90% de todas las enzimas producidas para los procesos industriales (Badui, 2000).

**Enzimas vegetales:** La mayoría de las enzimas vegetales se encuentran disponibles en forma de polvo sin una purificación muy elevada, si bien las papaínas y bromelaínas están disponibles en estado purificado. También se encuentran disponibles líquidos de papaína de baja actividad. El aumento de la disponibilidad de las enzimas vegetales depende de diversos factores (Badui, 2000).

**Enzimas animales:** Aquí se incluyen lipasas pancreáticas y proteasas, pepsinas, estereasas. Son producidas ultrapuras en cantidades industriales (Badui, 2000).

Las células microbianas son la fuente usual de enzimas para uso industrial para algunas de las enzimas provenientes de animales y plantas utilizadas tradicionalmente como las proteasas de la papaína, ficina y bromelaína, que se utilizan para el ablandamiento de la carne, y la quimosina, empleada en la manufactura del queso. La inmensa mayoría de las enzimas microbianos se producen a partir de aproximadamente 25 organismos, incluyendo una docena de hongos, pero se ha calculado que sólo aproximadamente el 2% de los microorganismos existentes en el mundo han sido estudiado como fuente de enzimas. Las enzimas son todavía más interesantes, porque permiten acelerar reacciones químicas en condiciones extremas sin alterarse ilustrado en cuadro 2- 4 (García, 2008).

Cuadro 2-4. Enzimas empleadas en procesos industriales (García, 2008).

Clase	Enzimas
1. Oxidorreductasas	Peroxidasas, Catalasas, Glucosa-oxidasas, Lacasas
2. Transferasas	Fructosil-transferasas, Glucosil-transferasas
3. Hidrolasas	Amilasas, Celulasas, Lipasas, Pectinasas, Proteasas, Pululanasas
4. Liasas	Pectato-liasas, Alfa-acetolactato decarboxilasas
5. Isomerasas	Glucosa-isomerasas
6. Ligasas	Sin empleo actual en la industria

### 2.6.3 Enzimas en la industria alimentaria

Badui (2000), señala que al utilizar enzimas en la industria alimentaria ofrece la ventaja de:

- Reducir viscosidad (hidrólisis).
- Mejorar extracciones (degradación de pectina).
- Hacer bioconversiones (glucosa a fructosa).
- Causar separaciones (separación del suero en queso).
- Sustitución de ingredientes y coadyuvantes en procesos.
- Ahorro con procesos más eficientes obteniendo menos subproductos indeseados y mayor capacidad de planta con un incremento de rendimiento de producto.
- Ganancia: mejora propiedades deseables obteniendo un producto único (jarabe de alta concentración de fructosa).

### 2.6.4 Proteasas

Las enzimas proteolíticas (comúnmente llamadas proteasas) pertenecen al grupo de hidrolasas, ya que catalizan la degradación de otras proteínas hidrolizando los enlaces

peptídicos con diferentes grados de intensidad y de selectividad. Un enlace peptídico es la unión que se realiza entre el grupo ácido de una aminoácido con el grupo amino de otro, con la consecuente eliminación de una molécula de agua, como se observa en la Figura 2.13 (Whitaker, 1994).

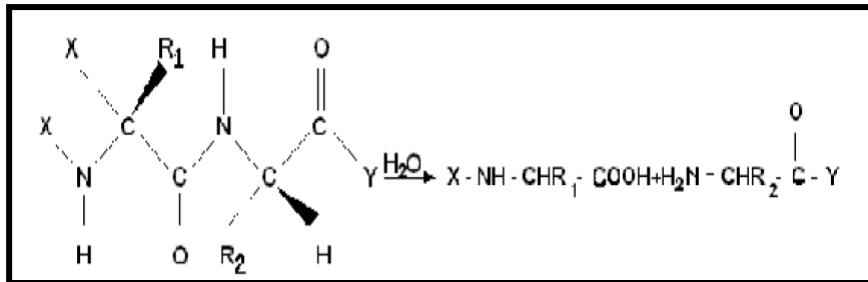


Figura 2- 13. Hidrólisis de un enlace peptídico de una proteína.

Whitaker (1994), menciona que dependiendo de la naturaleza del sitio sobre el cual actúan las proteasas, éstas se clasifican en:

a) Endopeptidasas: son aquellas enzimas que hidrolizan los enlaces peptídicos internos de una proteína (tripsina y quimotripsina) dando como resultado cadenas de péptidos.

b) Exopeptidasas: actúan sobre enlaces terminales de una proteína (aminopeptidasa y carboxipeptidasas). Basándose en su sitio de acción sobre el N o el C terminal.

c) Aminopeptidasas: actúan sobre el N libre terminal de la cadena polipeptídica liberando un aminoácido o un dipéptido o tripéptido.

d) Carboxipeptidasas actúan sobre el C terminal de la cadena polipeptídica. Se subdividen en cuatro subgrupos dependiendo de su mecanismo catalítico y al grupo funcional presente en su sitio activo.

## 2.6.4 Naturaleza de las reacciones enzimáticas

Los principios generales de la cinética de las reacciones químicas son aplicables a las reacciones catalizadas por las enzimas, pero estas muestran un rasgo característico que no se observa en las reacciones no enzimáticas, la *saturación* con el sustrato (Whitaker, 1994).

Existe el concepto de “activación” del sustrato seguida de la formación del complejo enzima – sustrato (ES). La activación de la molécula del sustrato se produce debido a la gran afinidad química de éste por ciertas áreas de la superficie de la enzima, denominados *sitios activos*. La molécula fijada en el sitio activo y sobre la que actúa la enzima, se denomina sustrato. Se produce una deformación o distorsión en alguna unión de la molécula de sustrato, se hace lábil y sufre un cambio por la enzima en particular. Las moléculas alteradas pierden su afinidad por los sitios activos y por ello son puestos en libertad. Entonces las enzimas quedan libres para combinarse con más sustrato y repetir la acción como se muestra en la Figura 2-13 (Whitaker, 1994).

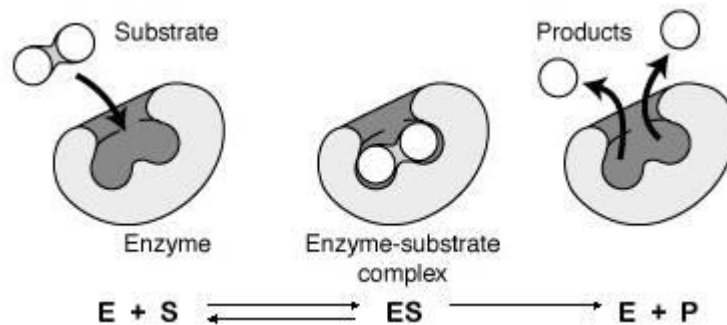


Figura 2-14. Reacción enzima – sustrato representada esquemáticamente (Whitaker, 1994).



### 2.6.5 Condiciones que afectan la actividad enzimática.

Entre las condiciones que afectan la actividad enzimática de las enzimas se encuentran las siguientes:

- a) Concentración de la enzima
- b) Concentración del sustrato
- c) pH
- d) Temperatura.

### 2.6.6 Curva de crecimiento

En el transcurso de la fermentación hay 4 fases de crecimiento, por las cuales pasa el microorganismo a través el tiempo, como se muestra en la figura 2-14: fase lag, fase exponencial, fase estacionaria y fase de muerte (Sánchez, 2003).

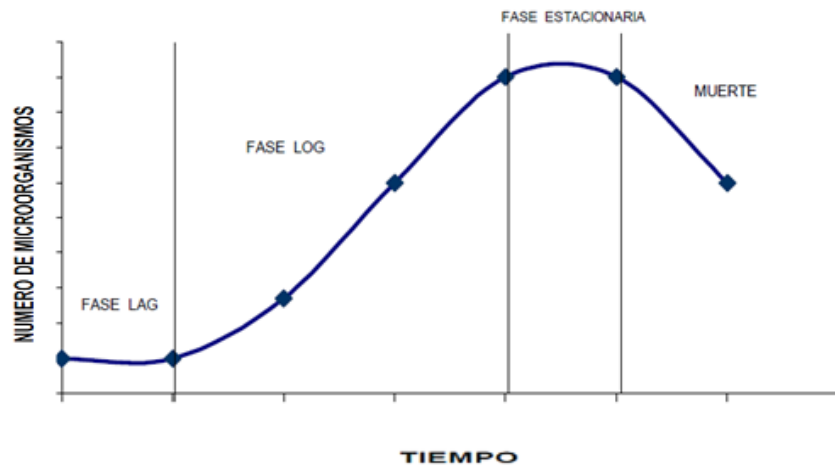


Figura 2-15. Curva de crecimiento de los microorganismos.

\* Fase Lag o de adaptación: también llamada fase de latencia. Cuando las células son transferidas de un medio a otro, no hay inicialmente un incremento en el número de

células. Durante esta fase los microorganismos se toman un tiempo para adaptarse a su nuevo ambiente fisicoquímico y en ocasiones se sintetizan nuevas enzimas o componentes estructurales (Sánchez, 2003; Duarte, 1998). La duración de esta fase puede variar dependiendo del crecimiento de las células en el inóculo, el cual debe tener una edad tal que la mayor parte de las células que contiene deben encontrarse en fase exponencial y metabólicamente activas (Barrera, 2004).

\* Fase Exponencial o log: Al finalizar la fase lag, las células se han adaptado a las nuevas condiciones de crecimiento. En este punto las células se reproducen sin limitación de sustancias nutritivas a velocidad máxima. El crecimiento de las células se puede describir cuantitativamente como la duplicación del número de células o biomasa por unidad de tiempo. A través de esta fase las células alteran el medio constantemente tomando los sustratos y excretando los productos metabolizados. El crecimiento permanece constante durante esta fase. La velocidad de crecimiento es independiente de la concentración de sustrato mientras exista sustrato en el medio y se correlaciona con la velocidad de crecimiento específico.

\* Fase estacionaria: ocurre cuando se agota una sustancia nutritiva y el sustrato se ha metabolizado, cuando se han formado sustancias tóxicas o ha ocurrido un cambio de condiciones como pH, temperatura y concentración de oxígeno disuelto. El crecimiento celular desciende lentamente o para completamente y en el caso en el que aun pueda estar ocurriendo crecimiento, este se contrarresta por la rapidez de muerte o lisis celular. La biomasa incrementa sólo gradualmente o permanece constante durante la fase estacionaria, aunque la composición de las células puede cambiar (Sánchez, 2003; Duarte, 1998).

\* Fase de muerte: también llamada fase de decaimiento. En esta fase la reserva de energía de las células se ha acabado, debido a condiciones de inanición o como consecuencia del metabolismo de mantenimiento de algunas células. El tiempo entre la fase estacionaria y la fase de muerte depende del microorganismo y el proceso utilizado (Sánchez, 2003; Duarte, 1998).

### 2.6.7 Aplicaciones

En la hidrólisis enzimática de proteínas hasta péptidos o aminoácidos, por acción de enzimas proteolíticas, la composición final y, por tanto, el uso de los hidrolizados dependerá principalmente de la fuente proteica, del tipo de proteasa (Korhonen y Pihlanto, 2003).

Korhonen y Pihlanto (2003), reporta que los hidrolizados de proteínas se utilizan ampliamente en la industria alimentaria por sus propiedades funcionales, en nutrición infantil y clínica y como fuente de péptidos bioactivos. En general, atendiendo al grado de hidrólisis necesario, los hidrolizados pueden clasificarse en tres grupos:

- Hidrolizados con un bajo grado de hidrólisis (inferior a 10%). Se emplean fundamentalmente como modificadores de las propiedades funcionales de los alimentos (especialmente en panadería, bollería, heladería y elaboración de salsas y mayonesas)
- Hidrolizados con un alto grado de hidrólisis (superior a 10%). Se utilizan como fuente de nitrógeno en la formulación de alimentos infantiles y dietas especiales. Estos hidrolizados deben mejorar las características nutricionales de la proteína de partida. También es frecuente su uso como potenciadores del sabor (principalmente en sopas, salchichas, alimentos precocinados y productos cárnicos).
- Péptidos con funcionalidad biológica. De interés creciente para la industria alimentaria y farmacéutica (Korhonen y Pihlanto, 2003).

La influencia de la hidrólisis enzimática sobre las propiedades funcionales de diferentes proteínas ha sido ampliamente descrita por numerosos investigadores (Adler-Nissen y Olsen, 1979; Gbogouri *et al.*, 2004; Surowka *et al.*, 2004). La incorporación de hidrolizados de proteínas a alimentos permite modificar propiedades como la

solubilidad, el poder emulsificante, la capacidad espumante, la adsorción de agua, etc ( Foegeding *et al.*, 2002) muy importantes desde un punto de vista tecnológico. Además de estas propiedades físico-químicas, los hidrolizados de proteínas son potenciadores del sabor en alimentos preparados.

Cuadro 2-5. Propiedades funcionales y aplicaciones de los hidrolizados de proteínas (Foegeding *et al.*, 2002)

<b>Propiedad</b>	<b>Aplicación</b>
Emulsificante	Productos cárnicos, café soluble, salsas
Adsorción de agua	Pastelería, productos cárnicos
Espumante	Pastelería y bollería
Solubilidad	Bebidas energéticas
Potenciador del sabor	Condimentos, extractos de carne y levadura

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Localización del área de estudio.

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 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.

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

Se emplearon 4 animales multíparas de la raza Holstein, los cuales fueron sometidos a una dieta balanceada muestra cuadro 3-1. Durante 120 días adicionadas 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 3-1. Dieta de ganado lechero alimentado con levadura (Montero, 2009)

Ingrediente	kg
Sorgo rolado	34.33
Salvadillo	5
Harinolina	8.37
Semilla de algodón	13
Silio de 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

**ETAPA II:** Aislamiento de microorganismos de levaduras en agar papa dextrosa

**3.3 Aislamiento de levaduras en agar papa dextrosa**

Se preparó el agar papa dextrosa, diluyendo 39 g de agar en 1000 ml de agua destilada, se solubilizó a flama de mechero para posteriormente esterilizarlo en un autoclave (PRESTO) a 121 °C a 15 Lb de presión por un tiempo de 15 minutos. 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).

Las cajas fueron incubadas a 25 a 30°C. El tiempo de incubación dependió del tiempo en que se observó crecimiento uniforme de los microorganismos de levaduras, se revisaron cada 24 hrs.

### **3.4 Caracterización macroscópica y microscópica de las cepas obtenidas**

Una vez que se observó el crecimiento uniforme, se registraron las características macroscópicas de las colonias y posteriormente se hizo un frotis de todas las colonias identificadas, de la siguiente manera; primero se agregó una gota de agua destilada sobre el porta objetos y tomando una asada de las cepas de las levaduras se realizó una dilución, el frotis se secó con calor, para después teñir las muestras mediante la azul de algodón. Cada colonia obtenida se identificó con un código.

**ETAPA III:** Aislamiento preliminar y caracterización macro- y microscópica de microorganismos de levaduras en agar papa dextrosa

### **3.5 Aislamiento de hongos de tipo levaduras en agar papa dextrosa**

Se empleó el agar papa dextrosa, como medio de cultivo específico para eucariontes, haciendo un llenado de las cajas petrí de 15-20 ml de medio para poder realizar la resiembra, una vez identificadas cepas se prosiguió a resembrar en este medio, por la técnica de estría abierta cruzada para que se obtuvieran cepas 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 incubaron a 25-28 °C monitoreando a los 24 y 96 horas, dependiendo del crecimiento microbiano y se revisó que el aislamiento fuera favorable para la identificación macroscópica.

### **3.5.1 Caracterización macroscópica**

Se determinaron las características macroscópicas relacionadas con el color, forma y textura de las colonias de cada una de las levaduras aisladas.

### **3.5.2 Caracterización microscópica**

Se determinaron las características microscópicas relacionadas con la forma de las células de levaduras, mediante observaciones al microscopio óptico.

## **ETAPA IV: Purificación y mantenimiento de las cepas obtenidas**

### **3.6 Purificación de cepas aisladas**

Aislar es separar un tipo de microorganismo a partir de una población que los contiene de varios tipos. El volumen de muestra inoculado se estandarizó por el empleo de asas calibradas de 0.1 ml. Las muestras recolectadas se inocularon de manera convencional (estría abierta cruzada) en cajas Petri que contenían 20 a 25 ml de agar papa dextrosa

Con el asa calibrada se tomó la colonia de manera que se formó una burbuja uniforme en el ojo del asa; esta gota fue extendida en el centro de la caja con agar papa dextrosa, el cual se denominó “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 estrío, para lograr la separación de las colonias de manera efectiva. Las cajas fueron incubadas a 25- 28°C en condiciones aerobias.



Las colonias obtenidas se purificaron y mantuvieron en tubos de cultivo añadiéndoles agar papa dextrosa, inclinados para obtener un pico de flauta y se almacenaron a 4°C en condiciones anaerobias. Cada colonia obtenida fue identificada con un código de la muestra de la que fue aislada, el medio en el que se desarrolla y un número de secuencia.

**ETAPA V:** Empleo de un microorganismo de levadura para la producción de una proteasa, mediante el diseño de un medio de cultivo inductor

### **3.7 Producción de una proteasa**

Se seleccionaron únicamente 5 cepas de levaduras puras (tiempo de crecimiento). Codificada, con el número 310602C, 3106003C, 140303C, 90302C, 4306002C, para verificar la degradación de proteínas.

Se diseñó un medio pontecorvo específico muestra cuadro 3-2 empleando como fuente de energía la caseína. El medio mineral fue esterilizado a 121 °C a 15 Lb de presión por un tiempo de 15 minutos y una vez que alcanzó temperatura ambiente, se adicionó la fuente de energía empleando leche deslactosada light (Lala) tetrapack agitando suavemente para permitir su homogenización

Cuadro 3-2. Composición química del medio pontecorvo

Reactivo	Cantidad ( g/ lt )	Reactivo (oligo elementos)	Cantidad ( g/ lt )
Fuente de energía (leche deslactosada light )	30	Zn SO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	2.2
		H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	1.1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.47	MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	0.5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	6.6	CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.16
CaCl <sub>2</sub>	0.48	CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0.16
Mg SO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.38		
NaCl	0.32		
Fe SO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.124		
Oligo elementos	1 ml		
Extracto de levadura	0.05		
Agar	19		

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 25-28 °C en condiciones de aerobiosis por periodos de tiempo de 24 a 76 h o hasta observar crecimiento uniforme, posteriormente se realizó la caracterización macro y microscópica del crecimiento celular.

### 3.7.1 Selección

Se eligió una cepa pura (crecimiento homogéneo y el tiempo de crecimiento), codificada con el numero 140303C para verificar la degradación de proteínas.

Se preparó el medio pontecorvo y adiciono por triplicado 100 ml de medio líquido en matraz de erlenmeyer, posteriormente se esterilizó, se la agrego como fuente de carbono caseína (leche deslactosada light), a dos matraz una suspensión celular de 0.5 ml de cepa 310602C selecciona para la degradación de la proteasa y el tercero se utilizó como control sin la suspensión celular , se incubo a 25-28°C en aerobiosis.

Se realizó el inculo inicial de 1.5 ml a partir de las 3 muestras en tubos de eppendorf con dos repeticiones de cada muestra, se incubaron bajo condiciones

anaeróbicas siguiendo una cinética de crecimiento celular tomando alícuotas por tiempos de 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192 horas, inmediatamente se refrigeraba para inhibir la actividad microbiana. Para posteriormente leer la absorbancia y obtener la velocidad específica de crecimiento.

### **3.8 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.

Las muestras obtenidas de los diferentes tiempos, fueron centrifugadas 10, 000 rpm por 15 minutos los tubos obtenidos a los diferentes tiempos de fermentación con la finalidad de separar la biomasa y obtener el extracto celular. El sobrenadante fue separado y empleado como extracto enzimático a diferentes tiempos de fermentación para la determinación de proteína mediante el método de Biuret.

Se agregaron 200  $\mu$ l de extracto enzimático de los diferentes tiempos de fermentación en tubos de ensaye (duplicado) y 500  $\mu$ l de Biuret en un baño a una temperatura de 25°C por 30 minutos, posteriormente se agitaron y se leyó la observancia a 570nm.

### **3.9 Cinética enzimática**

Se colocaron los tubos con 400 $\mu$ l muestra (leche) en una gradilla y en baño María a 40°C, se les agregó 100 $\mu$ l de extracto enzimático al tiempo de (0, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 120min), esto con la ayuda de las micropipetas calibradas, se sacaron los tubos del baño María una vez que se les agregó el extracto enzimático, se les agregó 500 $\mu$ l de reactivo de Biuret, esto para detener la reacción enzimática del microorganismo. Reactivo y se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro a 570nm.

Para conocer el efecto de las condiciones de reacción sobre la enzima y el sustrato, se prepararon una muestra patrón y una muestra blanco muestra el cuadro 3-3.

Cuadro 3-3. Preparación de muestras para cuantificación de proteínas totales por el método de Biuret

	Blanco	Patrón	Muestra
Agua destilada	20µl	.....	.....
Muestra	.....	.....	20µl
Patrón	.....	.....	20µl
Reactivo Biuret	1000µl	1000µl	1000µl

Para el análisis de datos se utilizo la siguiente ecuación

$$\text{Concentración de Proteína Total} = \frac{\text{Absorvancia de la muestra}}{\text{Absorbancia Patrón}} \times \text{Concentración Patrón}$$

$$\text{Concentración Patrón} = 60 \text{ mg/ml.}$$

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

El presente trabajo se diseñó en etapas de investigación, para evidenciar que los microorganismos presentes en rumen bovino son capaces de producir enzimas proteasas de interés industrial.

A continuación se describen los resultados obtenidos de cada una de las etapas en las que se dividió esta investigación.

**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 mediante una dieta balanceada adicionada con levadura inactiva de la industria cervecera por periodo de 121 días, con el propósito de adaptar a la flora microbiana presente en el rumen, teniendo en cuenta que la dieta es el factor más determinante sobre el tipo y las proporciones de poblaciones microbianas, por lo que determina el perfil de fermentación ruminal (Yokohama y Johnson, 1988). De tal forma que exista una interacción entre la dieta, la población de microorganismos y el animal (Chalupa, 1977).

Una vez que las cuatro vacas terminaron su dieta de 120 días se extrajeron 400 ml de líquido ruminal, los cuales fueron transportados en contenedores herméticos bajo condiciones anaeróbicas y a una temperatura de  $39^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

Se han explicado los efectos positivos sobre la alimentación levadura sobre la fermentación ruminal que la adición de levadura *S. cerevisiae* incrementa la concentración de bacterias Gram negativas en el contenido ruminal, mencionando

además, que la levadura estimula el crecimiento de bacterias amilolíticas a nivel ruminal, estos resultados que fueron confirmados por Kumar *et al.* (1994), Harrison *et al.* (1988), y Dawson *et al.* (1990) quienes indican que la levadura incrementa el número de bacterias totales, celulolíticas, amilolíticas, protozoarios, hongos y levaduras.

La adición de levadura en las dietas de rumiantes actúan como fuente de nutrientes y productos esenciales como aminoácidos, vitaminas y enzimas, incremento en metabolitos como ácidos grasos volátiles a causa de una mayor actividad bacteriana; disminución de la concentración del nitrógeno amoniacal; modifican el perfil de aminoácidos en el flujo duodenal; incrementan la proteína de sobre paso; disminuyen la concentración de ácido láctico; e incrementan la degradabilidad de la fibra (Owens y Goetsh, 1988).

El metabolismo del rumiante está enfocado a aprovechar los productos de la fermentación microbiana como los ácidos grasos volátiles (AGV) (Owens y Goetsh, 1988).

**ETAPA II:** Aislamiento preliminar de microorganismos de levaduras en agar papa dextrosa

#### **4.2 Aislamiento de levaduras en agar papa dextrosa.**

Se observó un crecimiento homogéneo después de 24-96 h de incubación bajo aerobiosis a 25-30 °C.

Los resultados obtenidos de las siembras de las levaduras en agar papa dextrosa a partir de 4 rumiantes, de los cuales fueron sometidos a una dieta balanceada, con levadura inactiva proveniente de la industria cervecera. No se observó una diferencia en cuanto al número de levaduras aisladas y seleccionadas por sus características macroscópicas y microscópicas entre los cultivos muestreados

Este número de aislamiento, en los resultados de los estudios obtenidos es importante destacar puede deberse a la dieta en relación a especies de microorganismos

lo que hace que no se observen cambios en la distribución microbiana tanto en la cantidad como en la variedad, creando un mismo ecosistema ruminal..

Wolin *et al.* (1997), al estudiar la alimentación de los rumiantes con aditivos de levaduras, exponen en cuanto a las características de los nutrientes existentes de en los medios de cultivo la necesidad de proporcionar a la célula microbiana todos los ingredientes requeridos para que produzca más células semejantes, tal proporción están relacionadas en función del sustrato que se utilizan y de sus requerimientos nutricionales.

Por lo tanto, es conveniente considerar un diseño de alimentación en función de interacción entre sustratos y los microorganismos por lo que atraen a un grupo específico de microorganismos que les genere las mejores garantías de crecimiento, el mejor desarrollo y el máximo rendimiento de producción biológica fermentativa de la microflora ruminal

#### **4.2.1 Caracterización macroscópica y microscópica de las cepas obtenidas**

Las levaduras son hongos microscópicos unicelulares, que presentan diversidad respecto al tamaño celular, forma y color, aun tratándose de células individuales de una misma cepa. La figura 4-2. Muestra la morfología macroscópica de cepas de levaduras del líquido ruminal de bovinos sembradas en agar papa dextrosa

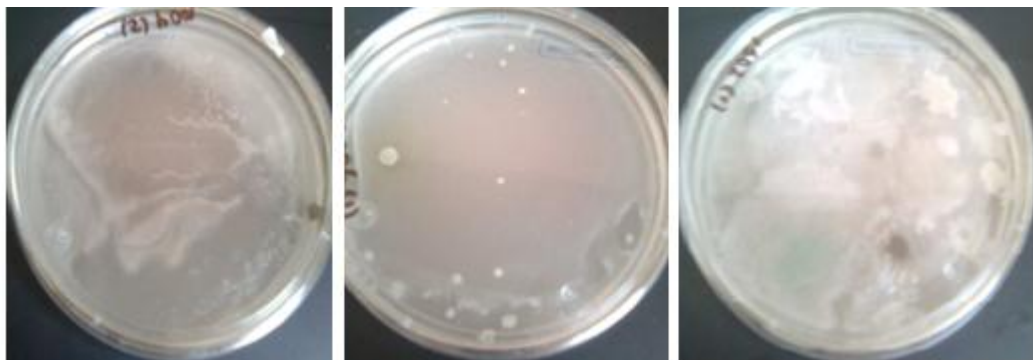


Figura 4-2. Fotografía de Aislamiento de levaduras en rumen

Inicialmente se seleccionaron las levaduras aisladas a partir de cada cultivo de acuerdo con la coloración que presentaba la colonia muestra el cuadro 4-1. La mayoría de levadura de acuerdo a sus características macroscópicas representaba un color blanco en menor proporción las de color crema. Presentan una superficie suave, bordes regulares, y consistencia cremosa.

Cuadro 4.1 Características microscópicas de levaduras aisladas de líquido ruminal

<b>Tratamiento con levadura</b>			
<b>Color de la colonia</b>	<b>Código</b>	<b>Características macroscópicas</b>	<b>Características Microscópicas</b>
Blanco	3106-02C	Pequeña, redonda, seca, opaca, irregular.	Cilíndrica
Creмоса	3106-03C	Regulares, mediana, opaca, cremosa, regular	Cilíndricas u Ovaladas
Blanco	1403-03C	Regulares, mediana, opaca, cremosa, regular	Cilíndrica
Blanco	903-02C	Convexa, pequeña, redonda, seca, opaca, regular.	Redondas
Creма	43060-02C	Mediana, cremosa, opaca, irregular	Cilíndricas u ovaladas

Es importante considerar que las levaduras se encontraron en menor porcentaje de la masa con en comparación, las bacterias que representan la mayor parte de la biomasa ruminal después se consideran los protozoarios. Por lo que no se presentó en los resultados un alto número de levaduras entre en tratamientos muestreados.

Resultados por Jouany (994), quien al evaluar la concentración de las poblaciones microbianas que viven en el rumen en anaerobiosis, específicamente para bacterias, protozoarios y hongos son de  $10^{10}/\text{ml}$ ,  $10^6/\text{ml}$  y  $10^4/\text{ml}$  respectivamente (Jouany 1994).



Al caracterizar microscópicamente las levaduras seleccionadas se encontraron formas típicas de levaduras, ovaladas y cilíndricas ilustrado en la Figura 4-3.

Yanke *et al.*(1995), reporta que la mayoría de las levaduras son ovaladas, cilíndricas, redondas que se dividen por gemación, comúnmente no desarrollan micelio, sino que permanecen en estado unicelular durante todo el ciclo de crecimiento, sin embargo algunas pueden presentar pseudomicelio debido a las condiciones en las que se les cultive .

**ETAPA III:** Aislamiento y caracterización macroscópica y microscópica de microorganismos de levaduras en agar papa dextrosa

#### **4.3 Aislamiento de hongos de tipo levaduras en agar papa dextrosa**

Obispo (1992), que menciona en el ecosistema ruminal existe una población microbiana que comprende bacterias y protozoarios y junto con los hongos recientemente descubiertos.

El grupo de levaduras son hongos microscópicos unicelulares, fueron el último tipo de microorganismos ruminales en ser estudiados, por su modo de acción para hidrolizar las partículas de alimento.

Pueden contribuir hasta con un 8 % de la masa microbiana y se adaptan a sobrevivir en condiciones de anaerobiosis aunque también se encuentran presentes organismos facultativos (Broderick *et al.*, 1991).

Sin embargo, la noción que se tiene sobre los estudios de especies de los hongos y levaduras en rumen es limitada.

### 4.3.1 Características macroscópicas

Se determinaron las características macroscópicas como se muestra la Figura 4-3. Relacionadas con el color, forma y textura de las colonias de cada una de las levaduras aisladas



4-3. Fotografía de las cepas puras de levaduras de líquido ruminal

Figura 4-3. Fotografía de diferencia entre las cepas de levaduras aisladas del líquido del rumen cepas de color blanco, suave, curvadas y opacas, Cepas de color crema, suaves, regulares, brillantes. C: Cepas color blanco, rígida, y opacas, Cepas de color crema, suave, regulares, cremosa, brillante.

### 4.3.2 Caracterización microscópicas

La mayoría de las levaduras son ovaladas o cilíndricas que se dividen por gemación, comúnmente no desarrollan micelio, sino que permanecen en estado unicelular durante todo el ciclo de crecimiento, sin embargo algunas pueden presentar pseudomicelio debido a las condiciones en las que se les cultive (Yanke *et al.*, 1995).

Se caracterizaron microscópicamente (Figura 4-4). Las cepas de las levaduras seleccionadas el cual se encontraron formas típicas de levaduras, ovaladas y redondas.

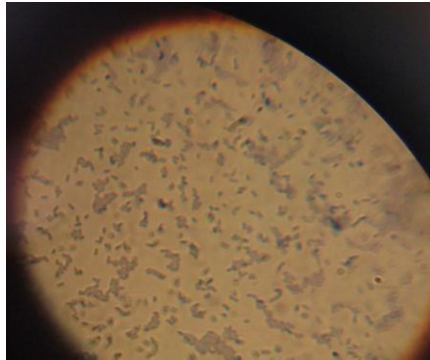


Figura 4-4 fotografía de características microscópicas de las levaduras

Las levaduras son hongos microscópicos unicelulares, que presentan diversidad respecto al tamaño celular, debido principalmente a la alteración de las condiciones físicas y químicas en el ambiente. Generalmente son de forma esférica u ovalada y miden entre 5 y 10 micras. Viven en estado aislado hasta que adquieren el tamaño adecuado para dividirse, produciendo células hijas, que a su vez se separan, extienden y dividen de la misma manera. Se consideran como organismos facultativos, lo cual significa que pueden sobrevivir y crecer con o sin oxígeno (Yanke *et al.*, 1995).

De la misma forma ovalada se encontraron células de las levaduras aisladas de color blanco y de las de color crema las de forma cilíndrica u ovalada, las muestras presentaban diferencias en características macroscópicas, que presentan diversidad con respecto al tamaño celular, forma y color, aun tratándose de células individuales de una misma cepa.

#### **ETAPA IV:** Purificación y mantenimiento de las cepas obtenidas

Las 5 cepas de levaduras aisladas, fueron purificadas en tubo de cultivo (Figura 4-4), para la conservación de las cepas para su posterior uso.

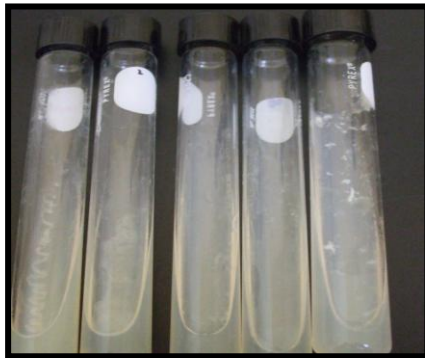


Figura 4-5. Fotografía de las cepas de levaduras purificadas

Al realizar la siembra cepas a los tubos, en resultados observo diferencia entre el efecto del tiempo sobre el crecimiento de las levaduras en comparación con las cepas aisladas en cajas Petri, la mayoría de ellas se presentó un crecimiento a las 96 h en comparación a las cepas evaluadas en los tubos teniendo crecimientos inferiores (Cuadro 4-2). Lo cual puede ser debido a las condiciones aeróbica a anaeróbica.

Cuadro 4-2. Tiempos de crecimiento de las cepas puras

Tiempo de crecimiento				
96 horas	120 horas	144horas	168horas	192horas
1403-03C				3106-02C
			43060-02C	903-02C
				31060-03C

Se hizo una segunda siembra a partir de los del crecimiento de los tubos donde ya adaptadas las levaduras a las condiciones anaeróbicas el comportamiento de las aislamientos fue similar a las anteriores siembras de las cajas Petri, el cual disminuyo el tiempo de 192 horas a 96 horas. Este resultado de muestra el efecto de un amplio rango de crecimiento a diferentes condiciones en presencia oxígeno o en ausencia.

Estos resultados concuerdan con lo obtenido por Brock (1997), Sarmiento (2003), quienes al evaluar las condiciones de características fisiológicas, las levaduras son aeróbicas o facultativas, cuando el oxígeno está presente, éstas crecen eficientemente a partir de carbohidratos del medio para producir la biomasa y CO<sub>2</sub>. Sin embargo cuando no hay oxígeno o éste disminuye, las levaduras cambian a metabolismo anaerobio o fermentativo, que se traduce en la formación de menor cantidad de biomasa.

Comparando con otros estudios de microorganismos de las levaduras ruminales por Broderick *et al.* (1991) nos señala que pueden contribuir hasta con un 8 % de la masa microbiana y se adaptan a sobrevivir en condiciones de anaerobiosis aunque también se encuentran presentes organismos facultativos (Broderick *et al.*, 1991).

La una de las funciones principal de algunas levaduras rumianles anaerobias facultativas pueden favorecer las condiciones de anaerobiosis en el rumen al eliminar el oxígeno, esta condición incrementaría la proliferación de microorganismos de tipo anaeróbicos en el rumen (Fonty y Joblin, 1991).

Con respecto a los a los resultados y las investigaciones es probable que las levaduras en rumen tienen efecto de mantener sistema anaerobiosis en el rumen.

**ETAPA V:** Empleo de un microorganismo de levadura para la producción de una enzima proteasa, mediante el diseño de un medio de cultivo inductor.

#### **4.4 Producción de una proteasa**

Al evaluar las 5 cepas levaduras purificadas, para la obtención de una enzima proteasa mediante el diseño de un medio cultivo inductor.

En cuanto a los resultados de las cepas de los microorganismos en relación de la enzima proteasa tiene un buen potencial para estimar la degradación proteica puede ser efectiva, ya que el acceso al sustrato se simulo una actividad enzimática rápida en

96 y 120 h de ser sembrada. Figura 4-4. Badui (2000), confirma que las enzimas son proteínas con capacidad catalítica, es decir, pueden acelerar la velocidad de una reacción química, incluso añadidas en cantidades mínimas.



Figura 4-6. Fotografía del crecimiento de las levaduras para la producción de una proteasa.

En la figura 4-4, se observa que los microorganismos lograron adaptarse a su medio inductor aunque durante su desarrollo de crecimiento de cada levadura fue diferente. Lo que confirma que a pesar de que las cepas son aisladas del líquido ruminal.

Fennema (1993), reporta que una enzima es una molécula proteica globular, son las más variadas y más altamente especializadas por los sustratos. Se han descubierto en diferentes organismos miles de enzimas distintas cada una, las cuales catalizan un tipo diferente de reacciones químicas.

#### **4.4.1 Selección de cepa productora de proteasa**

Enzimas microbianas: Las enzimas producidas por la fermentación de microorganismos representan aproximadamente el 90% de todas las enzimas producidas para los procesos industriales (Badui, 2000).

Las células microbianas son la fuente usual de enzimas para uso industrial, se producen a partir de aproximadamente 25 organismos, incluyendo una docena de hongos, pero se ha calculado que sólo aproximadamente el 2% de los microorganismos existentes en el mundo han sido estudiado como fuente de enzimas.

Después de determinar el comportamiento de las cepas puras, se seleccionó una cepa (Figura 1403-03C, Figura 4-5). Valorándose por el tiempo de crecimiento homogéneo en comparación con 3106-02C, 31060-03C, 903-02C, 43060-02C, de las cepas estudiadas, se habla de enzimas, cuando se refiere a una forma de proteína que tiene una función específica. Se dice que las enzimas son catalizadores orgánicos; esto quiere decir que tiene la facultad de activar determinadas reacciones, es decir que cada enzima tiene acciones particulares sobre la que actúa, otra característica es que disminuye la energía necesaria para que se produzca la reacción entre las moléculas y por lo tanto aceleran esta reacción.



Figura 4-7. Fotografía de levaduras de la cepa 1403-03C para la producción de una proteasa

#### **4.4 Curva de crecimiento en medio líquido para la producción de la enzima proteasa**

Teóricamente en el transcurso de la fermentación hay 4 fases de crecimiento, por las cuales pasa el microorganismo a través el tiempo, fase lag, fase exponencial, fase estacionaria y fase de muerte (Sánchez, 2003).

Los microorganismos ruminales llevan a cabo un complejo proceso de fermentación, esencial para el mantenimiento de la nutrición y digestión del alimento en el animal hospedero (Sánchez, 2003).

La figura 4-5. Muestra el comportamiento resultados obtenidos de la curva de crecimiento de las levaduras, para inicial el crecimiento exponencial, se presenta inmediatamente después que la levadura ha sido inoculado en un medio apropiado para su crecimiento, observándose 12 h con velocidad específica de crecimiento de 0.063 DO/h. están en capacidad de aprovechar al máximo las condiciones que el medio le ofrece. Los microorganismos adaptan su metabolismo a las nuevas condiciones ambientales, y la duración de la fase de latencia se minimiza.

Reportes en la literatura mencionan que la duración de la fase de latencia es muy variable y depende del tipo y del estado fisiológico del hongo, así como del tipo de sustrato y de las condiciones de cultivo (Barrera, 2004).

Posteriormente a las 72 h de fermentación se observa la fase de estacionaria los nutrientes son consumidos y los productos finales del metabolismo se acumulan, en consecuencia la composición del medio de cultivo cambia, Se caracteriza porque no presenta ningún crecimiento, como resultado de la disminución de algún nutriente esencial, por la formación de productos tóxicos o por otro cambio en el medio físico.

La muerte de una población microbiana, en esta fase se presenta a 96 h de fermentación, ya que se acumula de los desechos del metabolismo de las levaduras que



alcanzan niveles que se vuelven limitantes para el crecimiento o porque alguno de los nutrientes escasea o se termina. En estas condiciones la tasa de crecimiento máxima no puede ser mantenida y empieza generalmente a disminuir de manera paulatina, la importancia de esta disminución depende de los factores o nutrientes agotados o sustancias tóxicas acumuladas.

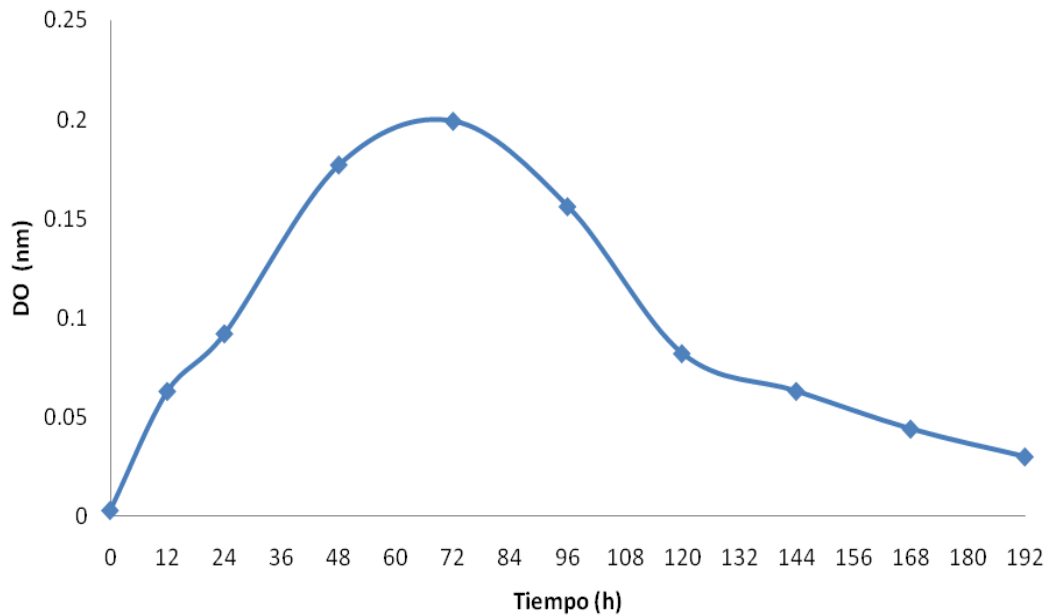


Figura 4-8. Curva de crecimiento de la cepa 1403-03C en medio pontecorvo a 20- 25°C

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

La evolución del consumo del sustrato durante diferentes tiempos de cada fermentación los microorganismos son responsables de hidrolizar o degradar las macromoléculas que componen los sustratos presentes en los alimentos.

Las fermentaciones se realizaron de con el fin determinar cantidad de proteína extracelular y la curva de crecimiento a partir de las levaduras ruminales. De estas curvas independientes entre sí, se estableció un tiempo de cultivo de 0,12, 24, 48, 72, 96,120, 144,168, 192,

La actividad enzimática confirmada que existe en el rumen es muy diversa, e incluye las enzimas que degradan los polímeros de las paredes celulares en las plantas (celulasas, xylanasas,  $\beta$ -glucanasas, pectinasas, etc.), las amilasas, las proteasas, la variedad de enzimas presentes en el rumen viene dada no sólo por la diversidad de su comunidad microbiana sino también por la multiplicidad de enzimas fibrolíticas producidas por microorganismos individuales (Fuentes, 2006).

Debido al consumo de la fuente de energía demandada por el microorganismo, cabe a notar que la figura 4-6. Muestra el comportamiento de la máxima producción de la enzima proteasa (extracto enzimático), donde se puede apreciar que la mayor concentración de proteína extracelular se obtiene a las 12h(0.228mg/ml), 24(0.5035mg/ml), 48 (0.589 mg/ml ), 72 h (0.7467mg/ml) , 96 h (0.8018mg /ml), de fermentación la concentración de la proteína disminuyó en un a partir 96 h de este punto el microorganismo probablemente por múltiples factores: disminución del pH, agotamiento de los nutrientes, inhibición por producto o alta concentración celular y por poca disponibilidad de oxígeno en el medio de cultivo.

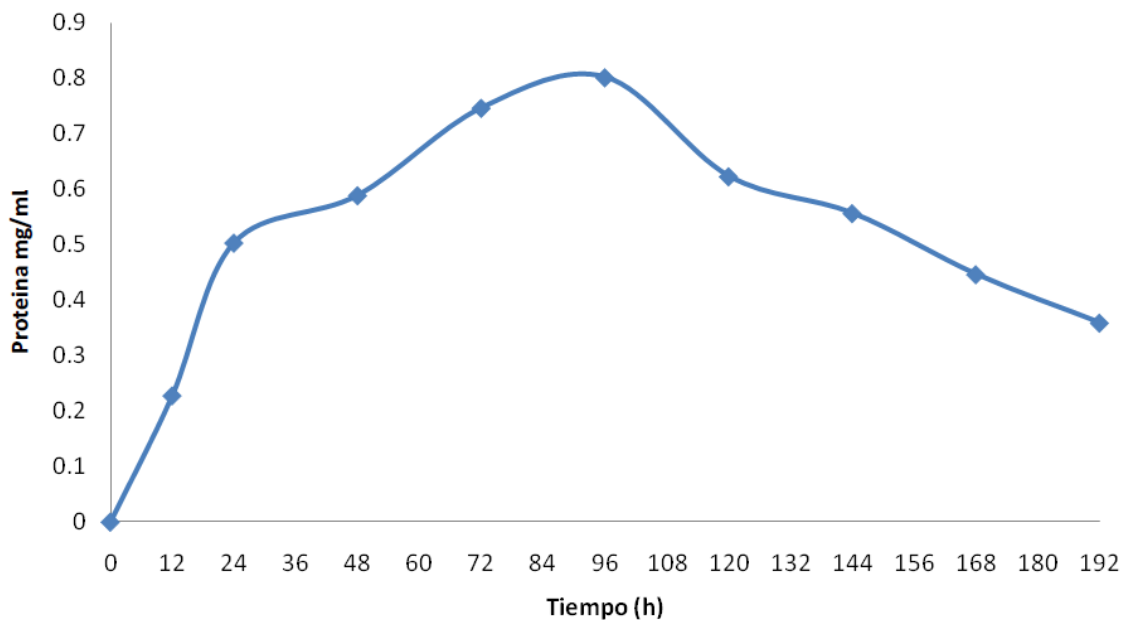


Figura 4-9. Cuantificación de proteína extracelular por el método de Biuret

## 4.6 Cinética enzimática

Los principios generales de la cinética de las reacciones químicas son aplicables a las reacciones catalizadas por las enzimas.

Existe el concepto de “activación” del sustrato seguida de la formación del complejo enzima – sustrato (ES). La activación de la molécula del sustrato se produce debido a la gran afinidad química de éste por ciertas áreas de la superficie de la enzima, denominados *sitios activos*. La molécula fijada en el sitio activo y sobre la que actúa la enzima, se denomina sustrato. Se produce una deformación o distorsión en alguna unión de la molécula de sustrato, se hace lábil y sufre un cambio por la enzima en particular. (Whitaker, 1994).

La figura muestra los resultados muestran proporcionan información acerca del mecanismo de la reacción catalítica y de la especificidad del enzima del efecto de la concentración inicial de sustrato sobre la velocidad inicial de la reacción , donde se observa que a las 72 h de reacción con una actividad de 0.74370 U, La reacción se incrementa nuevamente en el comportamiento de la actividad enzimática a 96 h esto puede ser debido a que el microorganismo presentó su máximo crecimiento a este tiempo, lo que indica que el metabolismo se encuentra a su máxima expresión produciendo todas las enzimas necesarias para poder aprovechar el sustrato o fuente de energía disponible y la velocidad de acumulación del producto va disminuyendo porque se va consumiendo el sustrato de la reacción.

López (2010), Comparando con estudios en bacterias para la obtención enzimas proteasas a partir del liquido ruminal la mayor actividad enzimática el cual presento a las 24 h de reacción con una actividad de 0.7469 U, la actividad de enzima fue similar a las 72 h con un valor de 0.5205 U, con respecto a los resultados obtenidos a partir de levaduras las 72 h con una actividad de reacción de 0.74370U y 96 h valor 1 U. el cual se presenta las enzimas proteasas producidas por levaduras presentan valores mayores en la actividad enzimática las 96 h, sin embargo en el tiempo de fermentación

de las enzimas obtenidas por las bacterias con respecto a las enzimas de levaduras se presento más rápido la actividad a las 24 h en bacterias, en levaduras a 72 h y en reacción a la actividad enzimática fue a las 24 h y 72h en enzimas producidas por las bacterias, en cual transcurre 24 h para presentar actividad, con comparación con las enzimas de las levaduras solo transcurre 12 h aumentando su actividad enzimática.

La microflora produce un volumen vasto de enzimas encargadas de intervenir activamente en el proceso de degradación del material alimenticio, cuya complejidad de este sistema no puede ser subestimada (Yokohama y Jonson, 1993). Los organismos funcionan de manera sinérgica y competitiva y debido a su gran diversidad, pueden adaptarse a una amplia variedad de alimentos convirtiéndolos en sustratos energéticos y en proteínas utilizables por el rumiante (Fuentes, 2006).

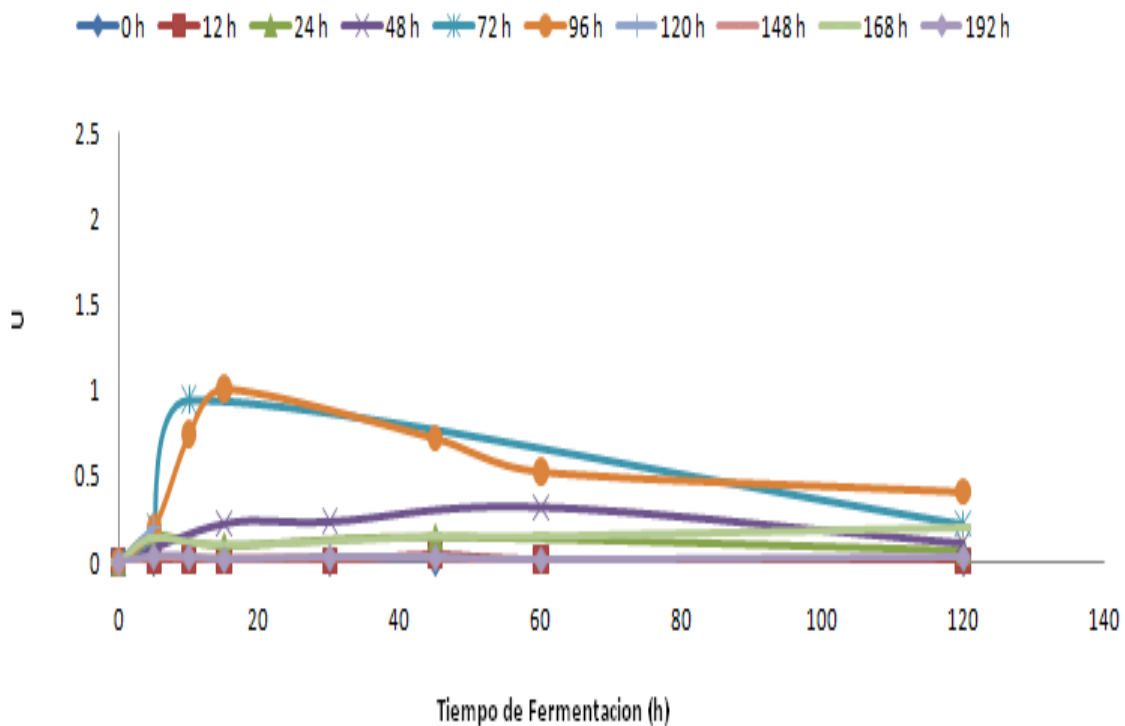


Figura 4-10 Actividad enzimática a diferentes tiempos de fermentación de la cepa 1403-03C

## V. CONCLUSIONES

La obtención de enzimas proteasas a partir de levaduras del líquido ruminal, con bovinos alimentados subproductos agroindustriales de la industria cervecera (levadura) nos conduce a las siguientes conclusiones.

Durante la evaluación las cepas agar papa dextrosa, no se registró un alto número de levaduras entre en tratamientos utilizados, aun así se pudieron determinar características macroscópicas en las cuales predomina el color cremosa, superficie suave, bordes regulares, y consistencia cremosa y la identificación microscópica las levaduras se encontraron formas, ovaladas y cilíndricas.

Se aislaron 5 cepas puras en medio pontecorvo solido empleando leche descremada y deslactosada (Lala) como fuente de energía para la producción en la enzima proteasa.

La cepa aislada 1403-03C presento una curva de crecimiento en medio líquido específico presentando una fase exponencial a las 12 horas con una velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) de 0.063 DO/h.

Se determinó que la cepa 1403-03C posee actividad enzimática proteasa alcanzando valores máximos a las 72 h con una actividad de reacción de 0.74370 U y a las 96 h con valores de 1 U.

Se demostró que el microorganismo elegido produce la enzima proteasa mediante el diseño de un medio de cultivo inductor, empleando como fuente de energía la caseína, el cual presentó la capacidad de hidrolizar la proteína.

## VI. LITERATURA CITADA

1. Akin, D. E., rigsby, L. L. 1987. Mixed fungal populations and lignocellulosic tissue degradation in the bovine rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 1987 - 1995.
2. Barichievich, E. M., Calza, R. E. 1989. Characterization of a new species of rumen fungi from beef cattle. *J. Animal Science/J. Dairy Science* 67/72 (Supl. 1): 521.
3. Bauchop, T. 1981. The anaerobic fungi in rumen fibre digestion. *Agriculture and Environment.* 6: 339-348.
4. Bauchop, T. The gut anaerobic fungi: colonizers of dietary fibre In fibre in human and animal nutrition. Ed. Wallace, G.; L. Bell. 143-148. Wellington: Royal Society of New Zealand. 1983.
5. Beever, D. E. 1993. Rumen function. In: Forbes, J. M. and J. France (editors). *Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism.* CAB International, Wallingford, UK. Pp: 187-215.
6. Braune, R. 1913. Untersuchungen uber die in Wiederkauernagen vorkommenden protozoen. *Arch. Protist.* 32: 111-170.
8. Broderick, G.A., Wallace, R.J. Y Orskov, E.R. (1991) In: *Physiology Aspects of Digestion and Metabolism in Ruminants: Proceedings of the Several International Symposium on Ruminant Physiology.* T. Tsuda, Y. Sasaki y R. Kawashima (Eds.). Academic Press, NY
9. Cobos, P. M. A. 2007. Interacción entre microorganismos ruminales. In: *Microbiología agrícola hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico y plantamicroorganismo.* R. Ferrera-Cerrato, A. Alarcon Eds. Trillas, México.
10. 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.* Y. Ruckebusch, y P. Thivend, Eds. MTP Press,
11. Lycaster. Davidson, P.M. y Naidu, A.S. (2000) In: *Natural Food Antimicrobial Systems.* A.S.Naidu Ed. CRC Press LLC. Boca Raton, FL. pp 265-293.
12. Demeyer, D. I. 1981. Introductory lecture: rumen microbes and digestion of plant cell walls. *Agriculture and Environment.* 6: 295-337.

13. Fuentes H. V. 2006 . *Fisiología Veterinaria*. Dpto. Fisiología y Farmacología, F.M.V y Z. U.N.A.M., Mexico D.F.
14. Hebraud, M., Févre, M. 1988. Characterization of hydrolases produced by rumen anaerobic fungi. *Reprod. Nutr. Dévelop.* 28: 131-132.
15. Hungate, R. E. 1966. *The rumen and its microbes*. Editorial Academic Press. New York
16. Lara, C. y G. Chalela. 2002. Nuevo medio de cultivo para el aislamiento de microorganismos ruminales. *Arch. Zootec.*, 51: 401- 404.
17. Liebetanz, E. 1910 Die parasitischen protozoen der wiederkauermagens. *Arch. Protist.* 19:19.
18. Lowe, S. E., Theodorou, M. K., Trinci, A. P. J. 1987. Growth and fermentation of an anaerobic rumen fungus on various carbon sources and effect of temperatura on development. *Appi. Environ. Microbio.* 53: 1210-1215.
19. Minson, D.J. 1990. *Forage in Ruminant Nutrition*. Ed Academic Press, San Diego, California,USA.
20. Stewart, C.S. and Bryant, M.P. (1988) In: *The Rumen Microbial Ecosystem*. P.N. Hobson (Ed.). Elsevier Science Publishers LTD, Essex. UK.
21. Obispo, Néstor. 1992. los hongos anaeróbicos del rumen. CENIAP - Instituto de Investigaciones Zootécnicas. 10(1):91-107.
22. Orpin, C. G. 1975. Studies on the rumen flagellate *Neocallimastix frontalis*. *J. Gen. Microbiol.* 91: 249-262.
23. Orpin, C. G. 1977. Invasion of plant tissue in the rumen by the flagellate *Neocallimastix frontalis*. *J Gen. Microbio.* 98: 423- 430.
24. Orpin, C. G. and Bountiff, L. 1978. Zoospore chemotaxis in the rumen Phycomycete *Neocallimastix frontalis*. *J. Gen. Microbiol.* 104: 113-122.
25. Orpin, C. G. and Greenwood, Y. 1986. Nutritional and germination requirements of the rumen Chytridiomycete *Neocallimastix frontalis*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 86: 103-109.
26. Orpin, C. G. 1988. Nutrition and biochemistry of anaerobic Chytridiomycetes. *Biosystems* 21: 365-370.
27. Owens, F. N., D. S. Secrist, W. J. Hill, y D. R. Gill. 1998. Acidosis in cattle: a review. *J. Anim. Sci.* 76:275-286.

28. Pérez, G. O. 1990. Principios microbiológicos y químicos de la producción bovina. Editorial, Acribia. S.A.
29. Orskov. E. R. 1992. Protein nutrition in ruminants. Academic Press Limited. 54; 24-28
30. Peñalva, M.A. y Arst, H.N.Jr. 2004. Recent advances in the characterization of ambient pH regulation of gene expression in filamentous fungi and yeasts. Annu. Rev. Microbiol. 58; 425-451
31. Preston, T.R., and Leng, R.A. 1987. Matching Ruminant Production Systems with Available Resources in the Tropics and Sub-Tropics. Penambul Books, Armidale, Australia.
32. Randez-Gil, F., Aguilera, J., Codón, A.C., Rincón, A.M., Estruch, F. y Prieto, J.A. 2003. Baker's yeast: challenges and future prospects. *En: Topics in Current Genetics*, vol. 2: Functional Genetics of Industrial Yeasts. J.H.de Winde (Ed.) Springer
33. Rivera B. José A. y León L. Juan. 2005 .*Vías Fermentativas del rumen*, Dpto. de Nutrición Animal y Bioquímica. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia U.N.A.M.
34. Rodríguez, A y E. Valencia 2008. Microbiología ruminal ruminantia. Vol: 3, No 1.
35. Rose, A.H. 1987. Yeast culture, a microorganism for all species: a theoretical look at its mode of action. In: *Biotechnology in Feed Industry* Ed. T. P. Lyons. Alltech Technical Publications, Nicholasville, KY. pp. 113-118.
36. Shimada A. 2003 *Fundamentos de Nutrición Animal Comparativa*. Ed. Consultores en Producción Animal, México D.F.. Toporek M. *Bioquímica*, Editorial Interamericana, México D.F.
37. Shima, S., E. Warkentin, R. K. Thauer, U. Ermler. 2002. Review: structure and function of enzymes involvend in the methanogenic pathway utilizing carbon dioxide and molecular hydrogen. *J. Biosci. Bioeng.* 93(6): 519-530.
38. Trinci, A.P.J., Davies, D.R., Gull, K., Lawrence, M.I., Nielsen, B.B., Rickers, A., and Theodorou, M.K. 1994. Anaerobic fungi in herbivorous animals. *Mycological Research* 98:129.152.
39. 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.



40. Von Arx, J.A. 1981. The Genera of Fungi Sporulating in Pure Culture. Y ed., J. Cramer, Vaduz.
41. Warner, A. C. 1. 1966. Diurnal changes in the concentrations of microorganisms in the rumen of sheep fed limited diets once daily. *J. Gen. Microbio.* 45: 213-235.
42. Wolin, M. J., L. T. Miller, S. C. Stewart. 1997. Microbe-microbe interaction. *In* The Rumen Microbial Ecosystem. Hobson P. N. & Stewart C. S. (Eds). Chapman and Hall, London UK. pp 467-491.
43. Weimer, P. J. 1998. Manipulating ruminal fermentation: a microbial ecological perspective. *J. Anim. Sci.* 76: 3114-3122.
44. Weber, H., K. D. Kulbe, H. Chimiel, W. Trösch. 1984. Microbial acetate conversion to methane kinetics, yield and pathway in a two-step digestion process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 19: 224-228.
45. Yanke, L.J., Selinger, L.B., and Cheng, K. Jr. 1995. Comparison of cellulolytic and xylanolytic activities of anaerobic rumen fungi. Proceedings of the 23rd Biennial Conference on Rumen Function, p 32. Chicago. USA.
46. Yokohama, M.T., y K. A John. 1988. Microbiología del rumen e intestino. . Editorial, Acribia. S.A. Zaragoza España.
47. Yokohama, M.T. and Jonson, K.A. 1993. Microbiología del rumen e intestino. In: Elrumiante: Fisiología digestiva y nutrición. C.D. Church (Ed.). Acribia, Zaragoza, España, pp. 137-159.