

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”**

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



Efecto de la adición de masilla de la industria cervecera en dietas balanceadas de ganado Holstein sobre la microbiota bacteriana presente en rumen bovino

Por:

MARÍA ISABEL REYES ARREOZOLA

Tesis

Presentada como Requisito Parcial para Obtener el Título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Junio de 2010

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Efecto de la adición de masilla de la industria cervecera en dietas balanceadas de ganado Holstein sobre la microbiota bacteriana presente en rumen bovino

Presentado por:

MARÍA ISABEL REYES ARREOZOLA

Tesis

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

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

En virtud de haber cumplido íntegramente los requisitos de la comisión de tesis y monografías:

El presente trabajo ha sido evaluado y aprobado por el siguiente comité:

Presidente

Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez

Vocal

Dr. Juan E. Mauricio Benavides

Vocal

Dr. Antonio Francisco Aguilera Carbó
Vocal

Vocal

Dr. Jesús M. Fuentes Rodríguez

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

Buenavista, Saltillo, Coahuila.
Mayo de 2010



COORDINACION DE
CIENCIA ANIMAL

El presente trabajo de investigación ha sido desarrollado en el marco de las actividades comprometidas en el marco del proyecto “**Aislamiento e identificación parcial de microorganismos bacterianos presentes en muestras de rumen bovino**” con clave 02-03-0402-2378. El proyecto fue financiado por la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro bajo la convocatoria de proyectos especiales de investigación.

Los evaluadores de esta investigación fueron:

Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez

Dr. Juan Enrique Mauricio Benavides

Dr. Antonio Francisco Aguilera Carbó

Dr. Jesús Manuel Fuentes Rodríguez

LCN. Laura Maricela Lara López

*Nunca consideres el estudio
como una obligación, sino
como una oportunidad para
penetrar en el bello y
maravilloso mundo
del saber.*

Albert Einstein

AGRADECIMIENTOS

A DIOS...

A mi **Alma Mater**, por haberme aceptado que formara parte de ella, para realizar mis estudios profesionales.

A la **Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez**, por ser un ejemplo de maestra, brindarme todo su apoyo, confianza, pero principalmente por su paciencia y tiempo dedicado a explicarme el experimento paso a paso, así como a la revisión de esta tesis; gracias porque sin usted no hubiera sido posible la realización de esta tesis.

A los doctores **Jesús Manuel Fuentes Rodríguez, Juan Enrique Mauricio Benavides y Antonio Francisco Aguilera Carbó**, por su tiempo que dedicaron a la revisión de tesis, a si mismo a sus comentarios hacia la misma contribuyendo a lograr un mejor documento.

A la **LCN. Laura Maricela Lara López**, gracias por su apoyo y ayuda brindada en el laboratorio de Producción animal.

A mis compañeros de generación y pero sobre todo a mis amigos (as): **Elena Amado Martínez, Luis Felipe Velasco Cruz, Martin Briones Amaya, Félix Santana Aldaco Luna, Jorge Abel Rodas Velazco, Raciél Bautista Agustín, Ruy Moreno Jijón, Pascual Canuto Chávez e Isaac Velasco Cruz**, por estar conmigo durante esta etapa de mi vida, motivarme, escucharme y apoyarme incondicionalmente, gracias por su amistad.

A los Ingenieros **Alberto Moyeda Dávila, David Martínez Rivera y Gerardo Rodríguez Galindo**, por sus sabios consejos, confianza, su valiosa ayuda y amistad brindada.

DEDICATORIAS

Con Amor y admiración a mis padres:

Sra. María de los Ángeles Arreozola

Sr. Jacinto Reyes Contreras

Por haberme dado la vida, así como esfuerzo que hicieron para ayudarme a concluir una meta mas, estar con migo en todos y cada uno de los momentos más difíciles, educarme para hacerme una persona de bien, inculcarme valores, principios, responsabilidades, además de brindarme su comprensión y apoyarme en mis decisiones, por todo esto y más les dedico con todo mi cariño esta tesis.

A mis hermanas: *Rosario, Ivonne Esmeralda, Perla Elizabeth* y hermanos *Cristian Alejandro* y *Jacinto* (†); gracias por su compañía, cariño, amistad, compresión, apoyo, pero sobre todo por motivarme y saber que todo esfuerzo tiene su recompensa. Porque de cada uno de ustedes he aprendido cosas diferentes que me han hecho valorar más lo que hago día con día. Hermano Jacinto espero que estés orgulloso de mi jamás te hemos olvidado.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Antecedentes	3
1.2 Justificación	4
1.3 Hipótesis	5
1.4 Objetivo general	5
1.5 Objetivos particulares	5
2. REVISIÓN DE LITERATURA	7
2.1 Rumen	7
2.1.1 Ambiente ruminal	8
2.1.2 Temperatura y pH	9
2.1.3 Anaerobiosis	9
2.2 Microorganismos ruminales	9
2.2.1 Hongos	10
2.2.2 Bacterias	10
2.2.2.1 Microorganismos que han sido aislados e identificados de rumen de animales domésticos y salvajes	13
2.2.2.2 Factores que afectan a la población bacteriana	14
2.2.3 Protozoarios	14
2.3 Metabolismo Ruminal	16
2.3.1 Carbohidratos	16
2.3.2 Proteínas	19
2.4 Alimentación de rumiantes con subproductos agroindustriales	21
2.4.1 Subproductos de cervecería como alimento para rumiantes	22
2.4.1.1 Masilla	23
2.4.1.1.1 Características nutricionales	23
2.4.1.1.2 Contenido de proteína	24
2.4.1.1.3 Contenido de minerales	25
2.4.1.1.4 Contenido de energía	25
2.4.1.1.5 Tiempo de conservación	26
2.4.1.2 Levadura	26
2.4.1.2.1 Efectos de la adición de <i>S. cerevisiae</i> en la fermentación ruminal	29
2.4.1.2.2. Características nutricionales	30
2.4.1.2.3 Contenido de proteína	31
2.4.1.2.4 Contenido de minerales	32
2.4.1.2.5 Contenido de energía	33
2.5 Enzimas de interés industrial	34
2.5.1 Generalidades	34
2.5.2 Aplicación en la industria de alimentos	36

2.5.3 Nomenclatura y clasificación	37
2.5.4 Polisacáridasas	38
2.5.4.1 Xilanasas	40
2.5.4.1.1 Especificidad	40
2.5.4.1.2 Microorganismos que las producen	41
2.5.4.1.3 Usos y aplicaciones	42
2.5.4.2 Quitosanasas	44
2.5.4.2.1 Aplicaciones en alimentos	44
2.5.4.3 Pectinasas	45
2.5.4.3.1 Aplicaciones en alimentos	46
3. MATERIALES Y MÉTODOS	48
3.1 Localización del área de estudio	48
3.2 Acondicionamiento de ganado Holstein y obtención de líquido ruminal	48
3.3 Aislamiento de microorganismos en AN (Agar Nutritivo)	49
3.3.1 Caracterización macro y microscópica de las especies bacterianas aisladas en AN	50
3.4 Aislamiento de microorganismos en AS (Agar Schaedler)	50
3.4.1 Caracterización macro y microscópica de las especies bacterianas aisladas en AS	50
3.5 Purificación de los microorganismos aislados	51
3.6 Identificación del metabolismo microbiano	51
3.6.1 Citrato de Simmons	52
3.6.2 Agar de hierro y lisina (LIA)	52
3.6.3 Caldo Urea	52
3.7 Producción de quitosanasa	53
3.7.1 Ensayo (screening)	53
3.7.2 Medio específico	53
3.8 Producción de pectinasa	54
3.8.1 Ensayo (screening)	54
3.8.2 Medio específico	54
3.9 Producción de xilanasas	54
3.9.1 Ensayo (screening)	54
3.9.2 Medio específico sólido	55
3.9.3 Inducción de la actividad xilanasas en medio líquido específico	56
3.9.4 Curva de crecimiento en medio líquido de tioglicolato de sodio	57
3.9.5 Curva de crecimiento en medio líquido específico 2	57
3.9.6 Determinación de proteína extracelular por el método Biuret	58
3.9.7 Determinación de actividad enzimática mediante la técnica de azúcares reductores (Somogy- Nelson)	59
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	62
5. CONCLUSIONES	93
6. LITERATURA CITADA	95
7. ANEXOS	108

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Valor nutritivo de la masilla de cerveza	24
Cuadro 2. Perfil del contenido de aminoácidos en la masilla de cerveza	25
Cuadro 3. Contenido de nutrientes digestibles totales y de energía de la masilla de cerveza	26
Cuadro 4. Contenido de nutrientes de la levadura de cerveza	31
Cuadro 5. Perfil de aminoácidos de la levadura de cerveza	32
Cuadro 6. Contenido promedio de minerales en los subproductos de cervecería en comparación con otros ingredientes (Kg/MS)	33
Cuadro 7. Contenido de nutrientes digestibles totales y energía de la levadura de cerveza	33
Cuadro 8. Aplicación de enzimas pecticas en el procesamiento de Alimentos	47
Cuadro 9. Dieta de ganado lechero alimentado con masilla	49
Cuadro 10. Composición química del medio solido específico para el ensayo de la degradación de xilosa	55
Cuadro 11. Composición química del medio líquido inductor para la degradación de xilosa	57
Cuadro 12. Composición química del medio líquido específico para producir xilanas	58
Cuadro 13. Preparación de muestras para la cinética enzimática	60
Cuadro 14. Morfología macroscópica de los microorganismos aislados en agar nutritivo	66
Cuadro 15. Morfología macro y microscópica de los microorganismos aislados en AS	71
Cuadro 16. Tiempos de crecimiento de las cepas puras	79
Cuadro 17. Resultados de pruebas bioquímicas para cada cepa	83

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pagina
Figura 1. Fotografía de microorganismos comunes en rumen; a) cocos, b) bacilos cortos	12
Figura 2. Esquema que representa el metabolismo de los carbohidratos que entran en el rumen	18
Figura 3. Esquema que ilustra el metabolismo de las proteínas en el rumen	21
Figura 4. Ilustración del ciclo biológico de <i>S. cerevisiae</i>	27
Figura 5. Fotografía de microscopia electrónica de barrido de <i>S. cerevisiae</i>	28
Figura 6. Fotografía de la obtención de liquido ruminal mediante empleo de una bomba nasogástrica	63
Figura 7. Fotografía que muestra el crecimiento microbiano empleando medio de agra nutritivo a 40 °C y en condiciones anaeróbicas	65
Figura 8. Fotografía que muestra el crecimiento microbiano empleando medio de agra Schaeider a 40 °C y en condiciones anaeróbicas	68
Figura 9. Fotografía de las características microscópicas de colonia cosificada como VAM 205-1, teñida con Gram	74
Figura 10. Fotografía de las características microscópicas de colonia cosificada como VAM 205-2, teñida con Gram	74
Figura 11. Fotografía de las características microscópicas de colonia cosificada como VAM 205-5, teñida con Gram	75
Figura 12. Fotografía de las características microscópicas de colonia cosificada como VAM 1502-4, teñida con Gram	75
Figura 13. Fotografía de las características microscópicas de colonia cosificada como VAM 1502-6, teñida con Gram	76
Figura 14. Fotografía de las características microscópicas de colonia cosificada como VAM 1502-7, teñida con Gram	76
Figura 15. Fotografía de las características microscópicas de colonia cosificada como VAM 4906-3, teñida con Gram	77

Figura 16. Fotografía de las características microscópicas de colonia cosificada como VAM 4906-5, teñida con Gram.	77
Figura 17. Fotografía de las características microscópicas de colonia cosificada como VAM 1004-2, teñida con Gram	78
Figura 18. Fotografía de cepas purificadas y conservadas en AS	80
Figura 19. Fotografía de la cepa VAM 205-2 del metabolismo microbiano (Citrato de Simmons)	81
Figura 20. Fotografía de la cepa VAM 1502-4 del metabolismo microbiano (Agar de Hierro y Lisina)	82
Figura 21. Fotografía de cajas empleando quitosan como fuente de carbono con a) medio solido sin buffer y b) medio solido con buffer (AAANa 50 mM)	84
Figura 22. Fotografía de cajas con medio solido y pectina	85
Figura 23. Fotografía de cajas con medio solido y xilosa	85
Figura 24. Fotografía del medio liquido inductor	86
Figura 25. Curva de crecimiento de la cepa VAM 1502-4 aislada en medio de tioglicolato de sodio a 40 °C	88
Figura 26. Curva de crecimiento de la cepa 1502-4 en medio líquido específico con xilosa incubado a 40 °C	89
Figura 27. Determinación de proteína extracelular por el método de Biuret de la cepa VAM 1502-4	90
Figura 28. Determinación de la actividad xilanasa de la cepa VAM 1502-4 en medio específico a 40 °C empleando xilosa al 2%.	92

RESUMEN

El rumen puede ser considerado como una gran cámara de fermentación que proporciona el medio conveniente para el cultivo continuo de la población microbiana. Es en esencia, un sistema anaerobio donde habitan bacterias, protozoarios y hongos.

En el mundo de la industria y la biotecnología se requiere de la producción de enzimas animales, vegetales y microbianas, siendo las enzimas microbianas las más utilizadas por ser obtenidas en tiempos cortos y con propiedades bioquímicas adecuadas para el proceso en el cual se va usarse.

Esta investigación estudia el efecto de la adición de masilla proveniente de la industria cervecera en dietas balanceadas de ganado Holstein sobre la microbiota bacteriana presente en rumen de bovino para la producción de enzimas polisacaridasas aplicadas en la industria alimentaria.

En la UAAAN se realizó un estudio de la alimentación de ganado bovino Holstein de 4 vacas multíparas, adicionando subproductos de la industria cervecera, específicamente masilla a su dieta. Se obtuvo el líquido ruminal de las vacas el cual se utilizó como inóculo inicial para la identificación y cultivo de bacterias para su posterior caracterización macro y microscópica en agar nutritivo y agar Schaedler.

Se purificaron y conservaron en AS 9 cepas puras, a las cuales se les realizaron pruebas bioquímicas para identificar el metabolismo bacteriano.

Se realizó un ensayo para la identificación de actividades polisacaridasas en las 9 cepas, destacando la actividad xilanasa, pectinasa y quitosanasa.

Posteriormente se realizó una inducción de la cepa bacteriana para el estudio enzimático, diseñando un medio específico líquido para la

producción de la enzima xilanasa, empleando como única fuente de carbono la xilosa.

Se realizaron dos curvas de crecimiento microbiano: en medio líquido (TGN_a), presentando una velocidad específica de crecimiento de 0.0158 DO/h; el microorganismo tardó en adaptarse a los nutrientes del medio, y en medio líquido específico 2 donde la velocidad específica de crecimiento fue de 0.0008DO/h.

Se determinó el contenido de proteína extracelular por el método de Biuret, donde se observó que la mayor concentración de proteína se obtuvo en un tiempo de fermentación de 60 horas con un valor de 68.2723 mg/mL.

Se determinó la actividad xilanasa por el método Somogy-Nelson alcanzando valores en un tiempo de fermentación de 48 horas de 2.1194U a los 45 minutos de reacción.

Palabras clave: *microorganismos del rumen, aislamiento, purificación y actividad xilanasa.*

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

En la industria cervecera, en el proceso de elaboración de la cerveza se derivan residuos (subproductos) propicios para utilizar en la alimentación de ganado por su alto valor biológico debido a que provienen de procesos enzimáticos que hidrolizan los nutrientes; es decir, son fácilmente absorbidos por el organismo del animal (Montero, 2009).

La utilización de residuos industriales de la cervecería, como la masilla y la levadura representan un área de oportunidades para ser empleada como suplementos en dietas para ganado Holstein. La masilla ha sido empleada por su alto contenido de proteínas de alto valor biológico, además de que estimulan el consumo de materia seca obteniendo mayor producción de leche (Johnson *et al.*, 1987).

La eficiencia de los rumiantes para utilizar esta gran variedad de dietas se debe a la gran diversidad del ecosistema microbiano ruminal formado por bacterias (10^{10} - 10^{11} células/ml, representando más de 50 géneros), protozoarios ciliados (104-106/ml, de 25 géneros), hongos anaeróbicos (10^3 - 10^5 zoosporas/ml, representando 5 géneros) y bacteriófagos (10^8 - 10^9 /ml) (Hobson, 1989).

Estos microorganismos sobreviven en el rumen bajo diferentes restricciones, las cuales pueden darse de manera natural o bien asociadas a la alimentación (Kamra, 2005), es por ello que el conocimiento y la comprensión de la actividad microbiana ruminal son de suma importancia ya que pueden generar nuevas aplicaciones en la industria alimentaria y o de la biotecnología.

En el caso de la biotecnología, en cuanto al proceso de producción de xilanasas ha llamado la atención a nivel mundial, ya que los métodos

tradicionales de producción de enzimas pueden ser demasiado prolongados hasta la obtención de la enzima purificada (Ponce y Pérez, 2002).

Por esta razón nace la necesidad de buscar nuevas alternativas que permitan la obtención de enzimas en tiempos cortos y con propiedades bioquímicas adecuadas para el proceso en el cual va usarse. Una de ellas es la obtención de cepas productoras de xilanasas de microorganismos ruminales.

La creciente demanda de xilanasas y su gran potencial en biotecnología lleva a realizar estudios multidisciplinarios de estos complejos enzimáticos.

Por lo tanto es necesario registrar y conservar los microorganismos ruminales ya que pueden generar nuevas aplicaciones en la industria alimentaria o de la biotecnología.

1.2 Justificación

Hoy en día en el proceso de elaboración de la cerveza se obtienen varios subproductos, de los cuales el de mayor volumen es la masilla, sin embargo a pesar de que existe una elevada disponibilidad de este subproducto, en la actualidad no se está aprovechando de manera apropiada, por lo que una alternativa promisorio es su empleo en la alimentación para toda clase de ganado dándole un valor agregado.

El estudio básico de la flora bacteriana presente en el líquido ruminal extraído de vacas Holstein adicionando masilla a su dieta es de suma importancia, ya que no existen reportes de biotipos mexicanos del ganado Coahuilense. Lo cual otorga un conocimiento nuevo además de oportunidades para registrar y conservar a estos microorganismos por lo que pueden generar futuras investigaciones, enriqueciendo la información de fuentes genéticas y rutas metabólicas.

Los resultados generados permitirán la identificación de microorganismos presentes en líquido ruminal de bovino, proporcionando una alternativa para el aprovechamiento efectivo del alimento, además de obtener nuevas fuentes de enzimas naturales polisacaridasas principalmente xilanasas. .

El banco de cepas obtenido tendrá un alto valor agregado, logrando un indicativo en la flora microbiana *in situ* en la dieta del animal.

1.3 Hipótesis

El enriquecimiento, en la alimentación de ganado Holstein, con masilla proveniente de la industria cervecera favorece el desarrollo de microorganismos bacterianos con actividades polisacaridasas diversas.

1.4 Objetivo general

Estudiar el efecto del enriquecimiento de la dieta de ganado Holstein con masilla de la industria cervecera, sobre las bacterias predominantes en el rumen bovino.

1.5 Objetivos particulares

- ✓ Aislar preliminarmente los microorganismos bacterianos en agar nutritivo (AN).
- ✓ Caracterizar macro y microscópicamente las especies bacterianas aisladas en agar nutritivo.
- ✓ Aislar microorganismos bacterianos en medios de cultivo comerciales específicos para anaerobios (agar schaedler(AS)).
- ✓ Caracterizar macro y microscópicamente las especies bacterianas aisladas en medios específicos para anaerobios.
- ✓ Purificar y mantener las cepas obtenidas.

- ✓ Identificar el metabolismo bioquímico de las cepas bacterianas obtenidas.
- ✓ Identificar actividades polisacaridasas (xilanasa, pectinasa, quitosanasa) de un microorganismo aislado e identificado parcialmente.
- ✓ Emplear un microorganismo bacteriano para la producción de la enzima xilanasa de interés industrial en alimentos, mediante el diseño de un medio de cultivo inductor.
- ✓ Determinar y cuantificar la actividad xilanasa mediante técnicas espectrofotométricas.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Rumen

El estómago de los rumiantes consta de cuatro compartimientos: el rumen, el retículo, el omaso y el abomaso. Todos los animales herbívoros tienen una porción dilatada en su tubo digestivo donde los alimentos fibrosos voluminosos, que forman una gran proporción de su dieta, pueden ser detenidos y sufrir gran fermentación, necesaria para su aprovechamiento. En los rumiantes, esta porción dilatada está representada por el rumen, que es un pre-estómago complejo de tamaño considerable, y en menor extensión por el ciego y el colon (Annison y Lewis, 1966).

El rumen representa 80% del volumen total del estómago, aunque la capacidad del rumen varía mucho con la edad y el tamaño de animal pero generalmente oscila entre los cien a trescientos litros en los bovinos, a medida que crece el rumen, va estableciéndose una población mixta de bacterias y protozoarios. El rumen todavía no es funcional en los animales recién nacidos, pero la fermentación ruminal empieza en unas cuantas semanas (Annison y Lewis, 1966).

El revestimiento del rumen es un epitelio estratificado con papilas; en los animales muy jóvenes solo hay papilas rudimentarias. El crecimiento de las papilas se realiza paralelamente con el principio de la fermentación en el rumen; su desarrollo normal depende de la ingestión de sustancias de rápida fermentación, como el pasto o los concentrados (Brownlee, 1956).

Los alimentos ingeridos se retienen en el rumen y en el retículo hasta que alcanzan una consistencia fina, y entonces pasan a las regiones más bajas del tracto en una corriente lenta. Por medio de contracciones regulares energéticas del retículo, el líquido es devuelto al rumen y diluye el contenido de este. Después, las contracciones del rumen regresan el líquido al retículo. En esta forma, las partículas alimenticias más pequeñas son separadas lentamente de la masa en el rumen y entonces pasan al omaso a través del orificio retículo-omasal. La rumia, es el proceso por medio del cual los

alimentos del rumen y del retículo son regresados a la boca, re-masticados, mezclados con saliva y otra vez ingeridos, facilita también la remoción de partículas alimenticias del rumen reduciendo su tamaño (Annison y Lewis, 1966).

2.1.1 Ambiente ruminal

Los microorganismos del rumen existen en simbiosis notable con el animal huésped; las dificultades asociadas con el cultivo de especies sugieren que también existen en simbiosis unos otros (Annison y Lewis, 1966).

El rumen puede ser considerado como una gran cámara de fermentación que proporciona el medio conveniente para el cultivo continuo de la población microbiana. La constancia razonable de las condiciones en el rumen se logra según Annison y Lewis (1966) de la siguiente manera:

- La toma frecuente de alimentos por el animal proporciona un suplemento regular de substrato para los microorganismos.
- Los productos solubles de la actividad microbiana son absorbidos rápidamente por la pared ruminal, y por lo tanto no se acumulan ni llegan a inhibir la acción enzimática.
- La temperatura del rumen se sostiene de 38 a 42°C por el mecanismo regulador de temperatura del animal.
- El volumen del contenido ruminal se regula por el paso de material líquido a intervalos hacia el omaso a través del orificio retículo-omasal. Las pequeñas partículas alimenticias y una proporción de la población microbiana se eliminan del rumen en esta forma.
- Los rumiantes secretan grandes cantidades de saliva (los bovinos producen 50 a 80 litros al día) (Denton, 1957_a), que es rica en bicarbonato y otros iones. La saliva es el factor más importante en el mantenimiento volumen líquido y fija el estado del pH y la composición iónica en el rumen.

2.1.2 Temperatura y pH

El rumen es, en esencia, un sistema anaerobio muy reductor en un medio ligeramente ácido, pero con un pH fijo, a una temperatura de 39°C, y en una fase gaseosa compuesta principalmente de bióxido de carbono, metano y nitrógeno. El contenido de ácido clorhídrico del jugo gástrico determina el pH, que baja a 1.5-3.0. En estas condiciones ácidas, los protozoarios que han pasado al abomaso desde el rumen se desintegran y algunas bacterias mueren (Annison y Lewis, 1966).

2.1.3 Anaerobiosis

Las condiciones anaeróbicas en el rumen se mantienen por la generación de gases durante la fermentación, como CO₂, CH₄, y trazas de H₂. Pequeñas cantidades de oxígeno atrapado en los alimentos consumidos por el animal es utilizado por los microorganismos aerobios facultativos presentes en el rumen; esto hace que se generen y mantengan las condiciones perfectas de anaerobiosis. Sin embargo, sólo los microorganismos que son capaces de tolerar potenciales de óxido-reducción bajos (-350 mV) sobreviven en el rumen y el resto son eliminados por el sistema. La alta capacidad de amortiguación y la presión osmótica limita el crecimiento de microorganismos invasores. Algunos de los microorganismos del rumen producen compuestos antimicrobianos que limitan el crecimiento de microorganismos presentes en este ecosistema (Stewart, 1992; Odenyo, 1994).

2.2 Microorganismos ruminales

En el rumen existe un ambiente microbiano variado, el cual se describe a continuación:

2.2.1 Hongos

La microflora ruminal cuenta también con hongos microscópicos que ayudan en la digestión de los alimentos. Se clasifican dentro del filum *Chytridomycota* del reino Fungae (Rodríguez y Valencia, 2008).

Los hongos que se encuentran en el rumen tienen la capacidad de fermentar polisacáridos (celulosa), calculándose que más del 8% de la biomasa microbiana del rumen está constituida por éstos (Nava y Díaz, 2001).

2.2.2 Bacterias

Las bacterias son seres vivos y están compuestas al igual que las células eucariotas por proteínas, polisacáridos, lípidos, ácidos nucleicos, entre otros. Una característica que poseen, es la capacidad para sintetizar sus propios constituyentes a partir de nutrientes que toman del medio externo. El crecimiento bacteriano se define como el aumento ordenado de todos los constituyentes químicos de la célula (Varela, 2002).

La flora bacteriana que se forma una vez que se proporcionan alimentos sólidos debe ser introducida con los alimentos y el agua. El contacto con otros animales resulta la forma más rápida de establecerla con una diversidad mayor de organismos, pero no se sabe si esto es ventajoso para el animal. El número total de bacterias normalmente presentes en el contenido ruminal es de unas 10^{10} UFC por gramo del contenido del rumen y la proporción de cada tipo depende de la dieta del animal (Annison y Lewis, 1966).

Grandes números de microorganismos aerobios se introducen cuando el animal consume alimento o agua, pero estos no llegan a establecerse en condiciones anaerobias, que son un hecho muy importante en el rumen. También se ha propuesto que solamente las bacterias estrictamente anaerobias son las verdaderamente funcionales en la flora del rumen, pero esto puede no ser cierto (Annison y Lewis, 1966), mientras que Hungate (1966) describe que en general, y debido a las condiciones que prevalecen

en el rumen, la mayor parte de los microorganismos son anaerobios o anaerobios facultativos.

Las exigencias de oxígeno de una bacteria en particular refleja en parte el tipo de metabolismo productor de energía. De acuerdo a su relación con el oxígeno Varela (2002) reporta la siguiente clasificación:

- Anaerobios obligados: hay de dos tipos, estrictos y aerotolerantes.
 - Estrictos: Crecen en ausencia de oxígeno y este es sumamente tóxico, incluso letal cuando la exposición es breve.
 - Aerotolerantes: También crecen en ausencia de oxígeno pero toleran más que los anteriores su presencia.
- Anaerobios facultativos: son capaces de crecer en presencia o en ausencia de oxígeno.
- Aerobios obligados: requieren oxígeno para su desarrollo.
- Microaerófilos: crecen mejor con tensiones de oxígeno bajas (3%-5%), las concentraciones elevadas (21%) tienen un efecto inhibitorio para estas bacterias.

Las bacterias, que pueden llegar a 10^9 - 10^{10} /mL de contenido de líquido ruminal, comprenden gran variedad de especies. Los conceptos clásicos de la bacteriología basados de modo principal en el conocimiento de organismos patógenos, no se pueden aplicar directamente a la población del rumen. El crecimiento de un organismo puede ser dependiente de los otros presentes y el número total o las proporciones de cada especie pueden fluctuar en diversas condiciones (Annison y Lewis, 1966).

Con frecuencia es difícil decidir si determinada especie bacteriana del rumen tiene o no un papel significativo en el metabolismo del rumen. Elsdén y Phillipson (1948) sugirieron dos puntos de vista en los cuales podría basarse la decisión; estos son: que la bacteria debe de ser capaz de realizar la reacción conocida que se realiza en el rumen y que esté presente en

cantidad suficiente para explicar el grado de reacción (Annison y Lewis, 1966).

Los grupos más notables presentes en el rumen se presentan en la figura 1:

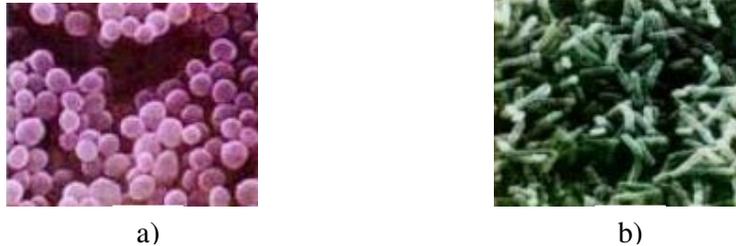


Figura 1. Fotografía de microorganismos comunes en rumen; a) cocos, b) bacilos cortos (Fuente: Annison y Lewis, 1966).

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

- Bacterias celulolíticas: son las que producen celulasa, que es una enzima extracelular capaz de hidrolizar los enlaces β de la celulosa, produciendo celobiosa. Algunas de ellas también aprovechan la celobiosa (Bryant 1953).
- Bacterias hemicelulolíticas: son bacterias capaces de degradar a las hemicelulosas, liberando las pentosas, hexosas y ácidos úricos, convirtiéndolos en glucosa o fructosa (Bryant 1953).
- Bacterias amilolíticas: estas utilizan los almidones como sustrato pues poseen una amilasa que hidroliza enlaces alfa 1-4 produciendo maltosa, que por acción de la maltasa se convierte en glucosa (Bryant 1953).
- Bacterias que utilizan azúcares solubles: estas dependen de la actividad de las anteriores, que son las que producen glucosa, xilosa y otros azúcares solubles a partir de las celulosas, almidones, hemicelulosas, etc., transformándolas en ácidos grasos volátiles (Bryant 1953).

- Bacterias proteolíticas: producen enzimas hidrolíticas que rompen enlaces peptídicos, liberando péptidos y finalmente ácidos aminados (Bryant 1953).
- Bacterias lipolíticas: poseen esterases que hidrolizan a los triglicéridos, fosfolípidos y ésteres de ácidos grasos (Bryant 1953).
- Bacterias que utilizan ácidos: actúan sobre los productos finales de la actividad de las bacterias de los grupos anteriores, utilizando como sustrato diferentes tipos de ácidos, por lo que ayudan a su eliminación del medio (Bryant 1953).

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

2.2.2.1 Microorganismos que han sido aislados e identificados de rumen de animales domésticos y salvajes

Reportes en la literatura desde los años 40's hasta los 90's mencionan algunos de los microorganismos que han sido aislados e identificados de rumen, dentro de los que se pueden citar:

- *Fibrobacter succinogenes* (Hungate, 1950; Flint, 1990)
- *Ruminococcus flavefaciens* (Dehority, 1986 y 1967; Bryant, 1986)
- *Ruminococcus albus*, *Clostridium cellobioparum* (Hungate, 1944),
- *Clostridium longisporum* (Hungate, 1957)
- *Clostridium lochheadii*, *Eubacterium cellulosolvens* (Bryant, 1958; Van Gylswyk, 1970)
- *Butyrivibrio fibrisolvens* (Bryant, 1953 y 1956)
- *Prevotella ruminicola* (Cotta, 1992)
- *Eubacterium xylanophilum* (Van Gylswyk, 1985)
- *Streptococcus bovis* (Latham, 1979)

- *Ruminobacter amylophilus* (HamLin, 1956; Stackebrandt, 1986)
- *Succinivibrio dextrinosolvens* (Bryant 1956), *Selenomonas ruminantium* (Caldwell, 1966)
- *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, (Hungate, 1994; Stewart. 1992)
- *Bifidobacterium globosum*, *B. longum*, (Scardovi, 1981)
- *Ruminobacter amylophilus*, *Clostridium bifermentans* (Hobson, 1969)
- *Oxalobacter formigenes* (Allison, 1985)
- *Streptococcus caprinus* (Brooker, 1994)
- *Eubacterium oxidoreducens* (Krumholz, 1986).

2.2.2.2 Factores que afectan a la población bacteriana en el rumen

Los factores que gobiernan el sostenimiento de esta población mixta no están claramente estudiados: competencia por los substratos disponibles, diferencias en susceptibilidad a productos finales del metabolismo que se acumulan y crecimiento de bacterias a diferentes valores de pH (Annison y Lewis, 1966).

2.2.3 Protozoarios

La fuente de los protozoarios es indudablemente la inoculación cruzada de otros animales, puesto que los rumiantes jóvenes criados en aislamiento carecen de protozoarios del rumen. Mas de unas cien especies de protozoarios han sido encontradas en el rumen, ya varias especies de distintos géneros se encuentran habitualmente en un solo animal. Por regla general hay grandes números (hasta 10^6) por gramo del contenido del rumen (Annison y Lewis, 1966).

Los protozoarios tienen un papel importante, aunque tal vez no esencial, en las actividades del rumen. Logran un almacenamiento de polisacáridos de gran importancia nutritiva para el animal huésped; las proteínas de su cuerpo son de buen valor biológico y probablemente así

contribuyen a la digestión de la celulosa, proteínas y polisacáridos (Annison y Lewis, 1966).

Los protozoarios ciliados del rumen son anaerobios obligados y se clasifican en tres grupos (Annison y Lewis, 1966):

- a) Los **protozoarios grandes** del Género *Diplodinium* y otros parecidos, como *Metadinium*, que ingieren materia fibrosa o almidón.
- b) Los **más pequeños**, como *Entodinium*, que digieren almidón.
- c) Los **protozoarios que no ingieren materias de origen vegetal**; por ejemplo: *Isotricha* y *Dasytricha*.

Algunas especies microbianas del rumen son:

- Ciliados holotricos: (principalmente *Isotricha prostoma*, *Isotricha intestinalis* y *Dasytricha ruminantium*) existen en el rumen de toda dieta pero son particularmente abundantes en las dietas que contienen henos y raíces. Estos organismos son capaces de atacar una variedad de azúcares solubles y también los absorben para convertirlos en un polisacárido insoluble, que almacenan (Heald y Oxford, 1953; Oxford, 1955).

Los *Dasytricha* aislados atacan la glucosa y la celobiosa mientras que *Isotricha* solamente fermenta glucosa; en cada caso la fermentación produce hidrogeno, bióxido de carbono y ácidos láctico, acético y butírico (Gutiérrez, 1955).

- Varios géneros oligotricos: *Metadinium medium* que es capaz de ingerir celulosa almacenarla en forma de polisacárido semejante a la amilopectina (Sugden, 1953).

Siempre hay abundantes ciliados oligotricos mas pequeños del genero *Entodinium* en el rumen, particularmente cuando el animal recibe una dieta rica en almidón (Annison y Lewis, 1966).

Los protozoarios son difíciles de estudiar *in vitro*; rara vez se les puede mantener en cultivos puros y en estado activo por más de unos cuantos días. Sin embargo, en algunos casos ha sido posible separar algunos de los protozoarios en un estado razonablemente puro y mantenerlos en división por más de quince días. La separación por especies es extremadamente difícil y la eliminación de las bacterias contaminantes presenta muchos problemas (Annison y Lewis, 1966).

2.3 Metabolismo ruminal

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

Annison y Lewis, (1966) describen que el desarrollo normal de la fermentación en el rumen depende de la ingestión de sustancias de rápida fermentación, como el pasto o los concentrados; tal es el caso de la digestión de la celulosa, la cual es la función fundamental en el metabolismo ruminal. La degradación de la celulosa en el rumen se realiza por la actividad celulolítica de la población microbiana ya que los bovinos no secretan celulasas en sus jugos digestivos.

En general, cualquier componente de la dieta que pueda sufrir el ataque microbiano en el rumen requiere de un proceso completamente distinto. (Annison y Lewis, 1966).

2.3.1 Carbohidratos

Gracias a la microbiota ruminal los carbohidratos fibrosos como la celulosa y hemicelulosa pueden representar la fuente más importante de energía para los rumiantes. Las raciones carentes de fibra pueden conducir a desórdenes de la digestión (Nava y Díaz, 2001).

Los carbohidratos son la fuente más importante de energía y los principales precursores de grasa y azúcar (lactosa) en la leche de la vaca. Los microorganismos en el rumen permiten a la vaca obtener energía de los carbohidratos fibrosos (celulosa y hemicelulosa) que son ligados a la lignina en las paredes de las células vegetales. La fibra es voluminosa y se retiene en el rumen donde la celulosa y la hemicelulosa se fermentan lentamente. Mientras que madura la planta, el contenido de lignina de la fibra incrementa y el grado de fermentación de celulosa y hemicelulosa en el rumen se reduce. La presencia de fibra en partículas largas es necesaria para estimular la rumia (Wattiaux y Armentano, 2008).

La rumia aumenta la separación y fermentación de fibra, estimula las contracciones del rumen y aumenta el flujo de saliva hacia el rumen. La saliva contiene bicarbonato de sodio y fosfatos que ayudan a mantener el contenido del rumen en un pH casi neutro. Las raciones que no tienen fibra suficiente producen un porcentaje bajo de grasa en la leche y contribuyen a desordenes tales como desplazamiento del abomaso y acidosis (Wattiaux y Armentano, 2008).

Los carbohidratos no-fibrosos (almidones y azúcares) fermentan rápidamente y completamente en el rumen. Estos incrementan la densidad de energía en la dieta, mejorando el suministro de energía y determinando la cantidad de proteína bacteriana producida en el rumen. Sin embargo, los carbohidratos no-fibrosos no estimulan la rumia o la producción de saliva y cuando se encuentran en exceso pueden inhibir la fermentación de fibra (Wattiaux y Armentano, 2008).

En consecuencia, el equilibrio entre carbohidratos fibrosos y no-fibrosos es importante al alimentar las vacas lecheras para la producción eficiente de leche. La figura 2 resume la transformación de carbohidratos en varios órganos. La población de microorganismos ruminales, fermenta los carbohidratos para producir energía, gases (metano (CH_4) y dióxido de carbono (CO_2), calor y ácidos. El ácido acético (vinagre), ácido propiónico y

ácido butírico son ácidos grasos volátiles (AGV's) y conforman la mayoría (>95%) de los ácidos producidos en el rumen (Wattiaux y Armentano, 2008).

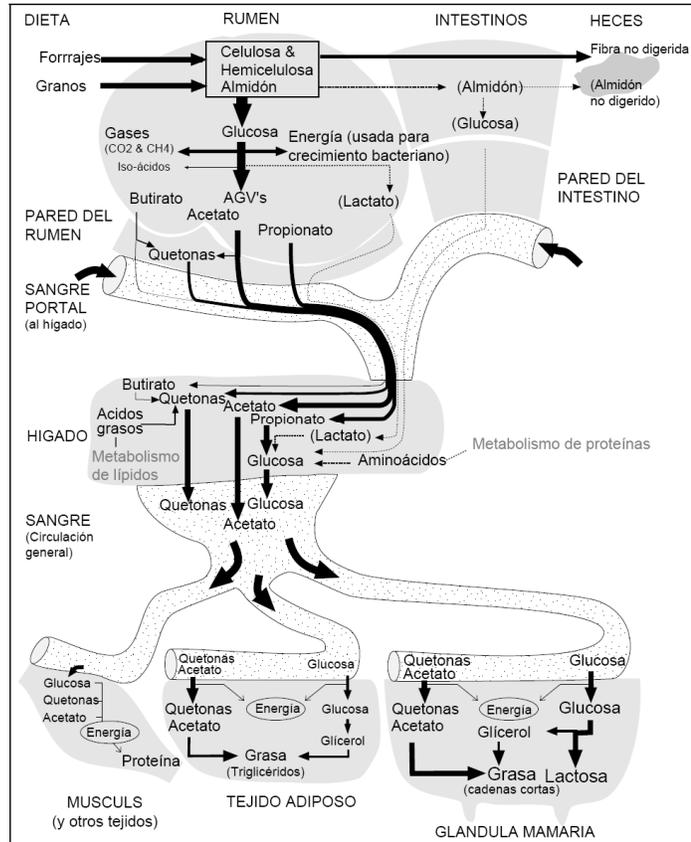


Figura 2. Esquema que representa el metabolismo de carbohidratos que entran en el rumen (Fuente: Wattiaux y Armentano, 2008).

La habilidad de un microorganismo ruminal para fermentar algún carbohidrato específico es dependiente de la presencia de la enzima requerida para poder utilizar este carbohidrato. Numerosas enzimas han sido aisladas a partir de varias especies bacterianas del rumen, entre ellas, hemicelulasas, celulasas, amilasas, isomaltodextrinasas, galactosidasas, sucrasas, fosforilasas, isomaltasas, etc. Existen algunas enzimas hidrolíticas extracelulares disponibles que ejercen su acción a cierta distancia de las colonias bacterianas que las produjeron. La mayoría de las bacterias, utilizan uno o más tipos de los principales carbohidratos dietéticos de los rumiantes como fuente de energía para su crecimiento. Las que no utilizan estos

carbohidratos, utilizan los productos carbohidratados más simples de aquellos o los principales productos finales del metabolismo (Grudsky y Arias, 1983).

2.3.2 Proteínas

Wattiaux y Armentano, (2008) señalan que las proteínas proveen los aminoácidos requeridos para el mantenimiento de funciones vitales como reproducción, crecimiento y lactancia. Los animales no rumiantes necesitan aminoácidos preformados en su dieta, pero los rumiantes pueden utilizar otras fuentes de nitrógeno porque tienen la habilidad especial de sintetizar aminoácidos y de formar proteína desde nitrógeno no-proteico. Esta habilidad depende de los microorganismos en el rumen.

Las proteínas de los alimentos son degradadas por los microorganismos del rumen vía aminoácidos para formar amoniaco y ácidos orgánicos (ácidos grasos con cadenas múltiples). El amoniaco también viene de las fuentes de nitrógeno no-proteico en los alimentos y de la urea reciclada de la saliva y a través de la pared del rumen. Niveles demasiado bajos de amoniaco causan una escasez de nitrógeno para las bacterias y reduce la digestibilidad de los alimentos. Demasiado amoniaco en el rumen produce una pérdida de peso, toxicidad por amoniaco y en casos extremos, muerte del animal, esto fue reportado por Wattiaux y Armentano (2008).

Según lo reportado en la literatura por Wattiaux y Armentano (2008) señalan que el nivel de utilización de amoniaco para sintetizar proteína microbiana depende principalmente de la disponibilidad de energía generada por la fermentación de carbohidratos. En promedio, 20 g de proteína bacteriana es sintetizada de 100 g materia orgánica fermentada en el rumen.

En general, las bacterias contienen mas proteína cuando las vacas consumen más alimentos y, además, las bacterias, pegadas a partículas de alimentos, pasan más rápidamente del rumen al abomaso. Usualmente una

porción de proteína de la dieta resiste la degradación en el rumen y pasa sin degradación al intestino delgado (Wattiaux y Armentano, 2008).

La resistencia a la degradación en el rumen varía considerablemente entre fuentes de proteína y está afectada por varios factores. Usualmente las proteínas en un forraje son degradadas a un mayor nivel (60-80%) que las proteínas en concentrados o subproductos industriales (30-60%) (Wattiaux y Armentano, 2008).

Una porción de la proteína bacteriana es destruida dentro el rumen, pero la mayoría entra el abomaso pegada a las partículas de alimentos. Los ácidos fuertes secretados en el abomaso paran toda actividad microbiana y las enzimas digestivas comienzan a separar las proteínas para formar aminoácidos. Aproximadamente 60% de los aminoácidos absorbidos en el intestino delgado son derivados de proteína bacteriana, y el 40% restante es de proteína no degradada en el rumen, ver figura 2. (Wattiaux y Armentano, 2008).

La composición de los aminoácidos en la proteína bacteriana es relativamente constante, sin más allá de la composición de la proteína en la dieta. Todos los aminoácidos, incluyendo los esenciales, están presentes en la proteína bacteriana en una proporción que aproxima a las proporciones de aminoácidos requeridos por la glándula mamaria para la síntesis de leche. Así la conversión de proteína de los alimentos a proteína bacteriana es usualmente un proceso beneficioso. La excepción es cuando se alimenta con proteína de alta calidad y el amoníaco producido en el rumen no puede ser utilizado debido a una falta de energía fermentable (Wattiaux y Armentano 2008).

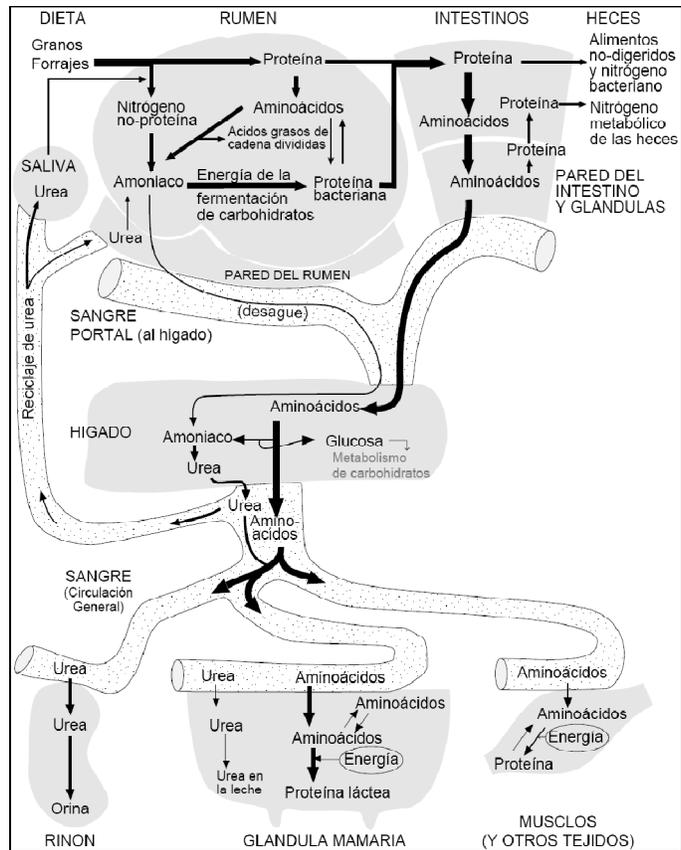


Figura 3. Esquema que ilustra el metabolismo de las proteínas en el rumen (Fuente: Wattiaux y Armentano, 2008).

2.4 Alimentación de rumiantes con subproductos agroindustriales

Los subproductos derivados de la fabricación de la cerveza pueden ser un alimento rentable para rumiantes en base a la respuesta de producción de leche (Dhiman *et al.*, 2003) por su alto contenido de proteína, grasa, y fibra digerible (Wadhwa, 1995).

Hay dos factores que limitan el uso de este tipo de alimentos. En primer lugar, por su alto contenido de humedad (aproximadamente 50-70%), y en segundo lugar, por la estabilidad aeróbica en climas cálidos (2-7 días) por lo que es recomendable ofrecerlo al ganado en fresco debido a que al fermentarse es extremadamente desagradable (no apetecible) y

causa la reducción del consumo de alimento suministrado en los animales (De Boer *et al.*, 1995).

2.4.1 Subproductos de cervecería como alimento para rumiantes

Recientemente, el interés en los subproductos de cervecería para la alimentación de rumiantes ha aumentado, debido al contenido de proteína de paso (Merchen *et al.*, 1979; Waller *et al.*, 1980). Rounds y Klopfenstein (1975) encontraron que del 48 al 61 % de proteína de la masilla pasó por el rumen al intestino delgado en comparación la pasta de soya, ya que sólo se digiere en un rango de 24 al 31%.

Cuando se alimenta al ganado lechero con subproductos de cervecería y los sabores de los subproductos se van a la leche, es preferible alimentarlas después de la ordeña. Siendo preferible ofrecer la masilla fresca pues tendrán un sabor dulce no agrio, ya que después de haber sido almacenada por unos días se altera el equilibrio ácido-base en el animal. Suministrando buffers se suele curar este trastorno (Reaño, 1992).

Por otra parte, la masilla de cerveza es rica en proteína, eficiente ingrediente en la alimentación de las vacas lecheras, pero se debe tener especial cuidado en ofrecer una dieta balanceada, para no producir depresiones en el consumo y/o la producción de leche (Rodríguez y Chacón, 1997).

En la alimentación de rumiantes la masilla de cerveza ha resultado ser un sustituto de la harina de gluten de maíz en raciones para novillos en crecimiento. Alimentar con masilla de cerveza con 30% de materia seca no presenta reducción en la producción de leche en ganado lechero (Deswysen, 1982).

2.4.1.1 Masilla

La masilla es el subproducto resultante del proceso de prensado y filtrado del mosto obtenido tras la sacarificación del grano de cereal (cebada, básicamente) malteado (Dahlen, *et al.*, 2005), mientras que Smith (2003) describe que por lo regular según su proceso de industrialización puede estar constituida de la cascarilla de la cebada, residuos de maíz y otros cereales utilizados en la elaboración de cerveza.

La masilla de cerveza está conformada por el residuo insoluble (siendo la testa, y cascara del grano de cebada), que a su vez está compuesta por celulosa, hemicelulosa y péptidos; aun después de haber pasado por un proceso enzimático la masilla contiene un 12% de extracto de almidón y proteínas que han sido desdobladas a glucosa y aminoácidos respectivamente, gracias a dicho proceso (Montero, 2009).

Es un producto húmedo cuyo contenido de materia seca es de un 20-25%. No se observan diferencias significativas en la composición química correlacionadas con el contenido de materia seca, aunque esta es variable. El residuo puede ser comercializado directamente como grano húmedo de cervecería o grano seco de cervecería. En el mercado recibe otros nombres como el de masilla de cerveza, y es el termino equivalente a lo que el mundo anglosajón conoce como “wet brewers’ grains” (Cuadro 1).

2.4.1.1.1 Características nutricionales

Debido a su naturaleza fibrosa y bajo contenido de energía, la masilla de cerveza es adecuada para los rumiantes, en particular en las vacas lecheras, para balancear el consumo de los altos contenidos de almidón en la dieta (Dhiman *et al.*, 2003).

Cuadro 1. Valor nutritivo de la masilla de cerveza

	B. Húmeda	B. Seca
	%	%
Humedad	75.2	
Proteína bruta	5.4	21.77
Fibra bruta	5.2	20.97
Cenizas	1.1	4.44
Grasa bruta	2.7	10.89
Proteína degradable		10.23
Proteína de paso		11.53
Proteína soluble		1.17
Fibra ácido detergente		22.2
Fibra neutro detergente		47.4

Fuente: Cervecería Cuauhtémoc, 2007.

2.4.1.1.2 Contenido de proteína

Reaño (1992) reporta que, el contenido de proteína cruda es relativamente alto (21-25%) y es menos degradable en el rumen que otros derivados de fuentes vegetales, de manera que es a menudo utilizado en la alimentación de ganado lechero y de carne que necesitan más proteína de paso. La degradabilidad efectiva de la proteína es de 68%, siendo la velocidad de degradación de un 7%/h. Se trata pues de un alimento de elevado contenido proteico, siendo esta una proteína que escapa, en buena parte, de la degradación ruminal. Tiene un bajo contenido de lisina (Cuadro 2) y es una buena fuente de vitaminas hidrosolubles, el contenido de nutrientes puede variar de planta en función del contenido de sustrato que se esté utilizando (cebada, trigo, maíz, etc.), proporciones que son fermentadas y proceso fermentativo que se utilizan (Adesipe, 1983).

La masilla de cerveza es un subproducto rico en proteína, el cual representa el 21% en base seca (Cuadro 1); el extracto etéreo representa un 10.89%; es un subproducto rico también en fibra, detergente ácido (FDA) del 22.2%, aunque se trata de una fibra muy poco efectiva (15%); el contenido de lignina es de un 5% y el de cenizas de un 4.44%; en el residuo mineral destaca el contenido en Fósforo (6 g/Kg), siendo más bajo el contenido en Ca^{+2} (3 g/Kg).

2.4.1.1.3 Contenido en minerales

Los subproductos de cervecería también representan un recurso natural de selenio, potasio, calcio, sodio, fósforo, magnesio, hierro, zinc, manganeso, cobre entre otros., disponibles (Conrad y Moxon, 1979).

2.4.1.1.4 Contenido de energía

Por otra parte Calsamiglia (2004) menciona que el contenido de energía metabolizable de la masilla es de 3.68 Mcal/Kg.

Cuadro 2. Perfil del contenido de aminoácidos en la masilla de cerveza.

Aminoácidos (mg/g)	
Aspártico	1.64
Glutámico	0.27
Serina	0.2
Glicina	0.14
Alanina	0.84
Metionina	1.55
Valina	1.06
Fenilalanina	0.95
Leucina	0.87
Isoleucina	1.23
Lisina	5.1

Fuente: Cervecería Cuauhtémoc, 2007.

2.4.1.1.5 Tiempo de conservación

Dixon (1983) reporta que la masilla de cervecería húmeda puede ser almacenada durante 10 días en la primavera, 5 días en el verano y 30 días en invierno, y recomienda proteger la superficie con plástico o algún otro material que cubra la superficie expuesta para minimizar el deterioro y prolongar el almacenamiento del material.

Cuadro 3 Contenido de nutrientes digestibles totales y de energía de la masilla de cerveza

Componente	En Base Seca
Nutrientes Digestibles Totales (%)	83.46
Energía Digestible (Mcal/Kg)	3.680
Energía Metabolizable (Mcal/Kg)	3.267
Energía Neta de Mantenimiento (Mcal/Kg)	2.249
Energía Neta de Lactancia (Mcal/Kg)	1.925

Fuente: Cervecería Cuauhtémoc, 2007.

2.4.1.2 Levadura

Las levaduras se han administrado a los animales en el alimento durante más de 100 años, ya sea en la forma de una masa fermentada producida en el rancho, subproductos de levaduras de cervecería o destilería, o productos comerciales elaborados a base de levaduras específicamente para la alimentación animal. Aun cuando esta práctica de utilizar las levaduras en los alimentos pecuarios ha existido durante mucho tiempo, todavía no hay mucha difusión o existe confusión en la industria para utilizarlas. Pero por donde se observe el uso de levaduras tiene grandes beneficios, ya que la levadura en sí, proporciona vitaminas del complejo B, minerales, es una buena fuente de proteína y de aminoácidos. Aproximadamente el 40 % del peso de la levadura seca consiste en

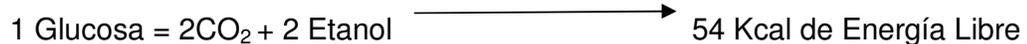
proteína. La calidad de la proteína de la levadura es excelente, tratándose de una proteína de origen vegetal, y su calidad es equivalente a la soya, pues ambas son ricas en lisina (Llamas, 2008).

Las levaduras son hongos microscópicos, es decir, organismos unicelulares del reino vegetal, que suelen medir de 5 a 10 micras, se consideran como organismos facultativos anaeróbicos, lo cual significa que pueden sobrevivir y crecer con o sin oxígeno. La propagación de las levaduras se da por un proceso denominado metabolismo oxidativo.

Crecimiento Aerobio



Fermentación Anaerobia



La reproducción puede ser asexual (por gemación y fisión) y sexual (por ascosporas) (Figura 4). No todas las levaduras tienen un ciclo de reproducción sexual, especies como *Candida albicans* se reproduce solo vegetativamente (Figura 5)..

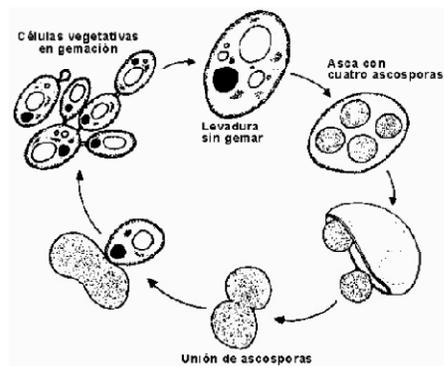


Figura 4. Ilustración del Ciclo Biológico de *Saccharomyces cerevisiae* (Fuente: Calsamiglia 2004).

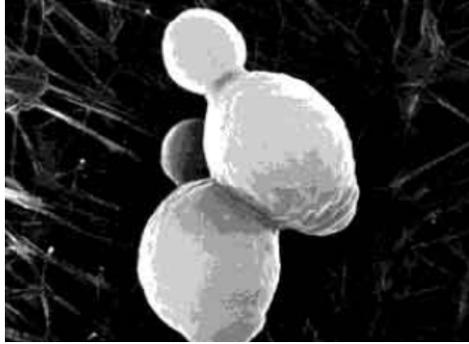


Figura 5. Fotografía de microscopia electrónica de barrido de *Saccharomyces cerevisiae*, (Calsamiglia, 2004).

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

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

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

○ Levadura inactiva: ésta levadura, tiene casi nula viabilidad, prácticamente 1.0×10^2 células vivas por gramo. El hecho de hacerse inactiva es para aprovechar otras bondades cuando es fermentada a pH bajo, como es el ser apetecible por ciertas especies que no toleran fácilmente consumir alimentos de origen vegetal (felinos, caninos, entre otros. (García, 2007).

- ✓ Cuando ha sido fermentada a pH bajo es un excelente potenciador de sabor.
- ✓ Fuente natural rica en proteínas.
- ✓ Mejora la palatabilidad del alimento.
- ✓ Una fuente natural de vitaminas del complejo B.
- ✓ Buen equilibrio de aminoácidos esenciales, con niveles altos de lisina.
- ✓ Es un buen complemento del alimento balanceado
- ✓ Aumenta la calidad cuando se mezcla en la fabricación de pellets, que induce las siguientes ventajas:
 - Reduce la pérdida de alimento.
 - Reduce la pérdida de energía por animales.
 - Aumenta la digestibilidad de los nutrientes.

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

2.4.1.2.1 Efectos de la adición de *S. cerevisiae* en la fermentación ruminal

Resultados de investigaciones de dietas que incluyeron *S. cerevisiae* realizadas por (Harris y Lobo, 1988), (Williams, 1989) y (Mutsvangwa et al., 1992), utilizando forrajes en el ganado, tuvieron incrementos en el consumo de alimento; sin embargo, (Drennan y Moloney, 1993) no encontraron efecto sobre el consumo de alimento; (Hoyos *et al.*, 1987), (Teh *et al.*, 1987), observaron incremento en la producción de leche. En otros estudios llevados a cabo por Greive, (1979), se observó un incremento en la ganancia de peso y conversión alimenticia; no obstante, Drennan y Moloney, en 1993, no

indican incrementos en ganancia de peso ni en la conversión alimenticia. Las investigaciones de Teh *et al.*, (1987), Wiedmeier *et al.*, (1987), Harrison *et al.*, (1987) y Williams, (1988), mostraron cambios en la concentración de ácidos grasos volátiles; por otra parte, en los estudios de Chademana y Offe, (1990) y Arcos *et al.*, (2000) no registraron cambios en ácidos grasos volátiles (Harrison *et al.*, 1988) ni observaron cambios en pH ruminal y en la concentración de amoníaco; sin embargo, Adams *et al.*, (1981) y Wiedmeier *et al.*,(1987) mencionan que este efecto no fue consistente. Además se indican incrementos significativos en la cantidad y actividad de las bacterias anaeróbicas celulolíticas.

En estudios realizados por (Andrighetto *et al.*, 1993), registran que *S. cerevisiae* incrementa la concentración (mol) de AGV`s totales; sin embargo, no se afectaron las proporciones de ácido acético y propiónico; por otra parte, (Gedek *et al.*, 1993), (Plata *et al.*, 1994), (Kumar *et al.*, 1994), (Robinson y Garrett, 1999), (Arcos *et al.*, 2000) mencionan que *S. cerevisiae* no modifica la fermentación ruminal por efecto de la adición de levadura en la dieta de los animales.

Crosby, en 1995, indica que no existe respuesta al cultivo de levadura sobre la fermentación y digestibilidad ruminales debido a que no se encontró efecto sobre el pH ruminal, N-NH₃, tasa de fracción de flujo, volumen ruminal, concentración de ácidos grasos totales, y la digestibilidad total aparente de la materia seca, fibra detergente ácida y fibra detergente neutro. Así mismo se han registrado resultados diversos en relación a la digestibilidad del alimento, (Flachowsky *et al.*, 1993); (Mir y Mir, 1994); (Andrighetto *et al.*, 1993); (Plata *et al.*, 1994); (Hernández 1999).

2.4.1.2.2 Características nutricionales

Las levaduras y sus medios de cultivos pueden contener nutrientes (ácidos orgánicos, vitaminas del grupo B, enzimas, aminoácidos) que estimulan el crecimiento de bacterias que digieren la celulosa y utilizan el ácido láctico (Callaway y Martin, 1997; Nisbet y Martin, 1991).

2.4.1.2.3 Contenido de proteína

El contenido de proteína de la levadura fresca es de 483 g/Kg en MS, y posee un alto valor biológico que se debe al buen perfil de aminoácidos (Cuadro 5). Es buena fuente de la mayoría de las vitaminas del complejo B (Burgstaller, 2007).

Cuadro 4. Contenido de nutrientes de la levadura de cerveza.

Componente	B. Húmeda	B. Seca
	(%)	(%)
Humedad	80.15	
Proteína Bruta	9.60	48.36
Fibra Bruta	0.28	1.41
Cenizas	1.37	6.90
Grasa Bruta	0.01	0.05
Proteína Degradable		24.44
Proteína de Paso		22.56
Proteína Soluble		1.17
Fibra Neutro Detergente		7
C.N.F		42

Fuente: FEDNA, 2004; Cervecería Cuauhtémoc, 2007.

Cuadro 5. Perfil de aminoácidos de la levadura de cerveza.

Aminoácidos	mg/g
Aspártico	1.86
Glutámico	6.63
Serina	1.54
Glicina	1
Alanina	1.98
Metionina	0.14
Valina	1.06
Fenilalanina	0.66
Leucina	1.75
Isoleucina	1.17
Lisina	7.75

Fuente: Cervecería Cuauhtémoc, 2007.

2.4.1.2.4 Contenido de minerales

La levadura de cerveza se caracteriza por su alto contenido de fósforo (cuadro 6), el cual proviene principalmente de las nucleoproteínas por lo que es muy disponible (Burgstaller, 2007) y además presenta bajo contenido de calcio (Black, *et al.*, 1991) y sodio.

Cuadro 6. Contenido promedio de minerales en los subproductos de cervecería en comparación con otros ingredientes (Kg/MS).

Ingrediente	Ca (g)	P (g)	Mg (g)	Na (g)	Mn (mg)	Cu (mg)	Zn (mg)
Levadura de Cerveza	2.6	17.0	2.6	2.4	59	64	92
Grano de Cerveza	3.8	6.7	2.2	0.4	40	24	138
Pasta de Soya	3.1	7.0	3.0	0.2	33	19	70
Harina de Pescado	54.9	35.6	2.9	6.8	21	7	86
Cebada	0.8	3.9	1.3	0.3	18	6	32
Maíz	0.4	3.2	1.0	0.3	9	4	31
Trigo	0.7	3.8	1.3	0.2	35	7	65
Avena	1.2	3.5	1.4	0.4	48	9	36

Fuente: Burgstaller, 2007.

2.4.1.2.5 Contenido de energía

De acuerdo a los datos bromatológicos (cuadro 4) se tienen reportes de los cálculos de los nutrientes digestibles totales y de la producción de energía (cuadro 7).

Cuadro 7. Contenido de nutrientes digestibles totales y energía de la levadura de cerveza.

En Base a Materia Seca	
Nutrientes Digestibles Totales (%)	76.03
Energía Digestible (Mcal/Kg)	3.352
Energía Metabolizable (Mcal/Kg)	2.936
Energía Neta de Mantenimiento (Mcal/Kg)	1.978
Energía Neta de Lactancia (Mcal/Kg)	1.743

Fuente: Cervecería Cuauhtémoc, 2007.

2.5 Enzimas de interés industrial

Algunos de los carbohidratos de los alimentos son polímeros como la celulosa, pectinas, almidón, y pueden ser sujetos a la degradación enzimática, por lo que debe señalarse que la celulasa es una enzima que hidroliza la pared celular de las semillas de cebada y adjuntos. Por lo tanto, la reducción de los alimentos a unidades pequeñas y absorbibles depende principalmente de la fragmentación química que se produce gracias a las enzimas. Las enzimas digestivas, como todas las enzimas, presentan especificidad de sustrato y son sensibles a la temperatura, pH y ciertos iones, (Badui, 2006).

2.5.1 Generalidades

Una enzima es una proteína que actúa como catalizador biológico, llevando a cabo reacciones bioquímicas a muy altas velocidades no se consume durante la reacción y en general presenta un elevado grado de especificidad (Badui, 2006).

Las enzimas son catalizadores de origen proteico producidas por los organismos vivos (Prado, et al., 1999).

La palabra enzima se deriva del griego y significa “en la levadura”, siendo usada por primera vez en 1878 por Kühne. El término se aplicó comúnmente a extractos de microorganismos (Prado, *et al.*, 1999).

Cabe señalar que el término de “catalizador biológico” no es exclusivo de las enzimas, sino que también se le atribuye a las “xoenzimas”, catalizadores proteicos creados en el laboratorio; las “abzimas”, anticuerpos monoclonales con actividad “enzimática”; así como el hecho reconocido de que tanto el ARN como la hemoglobina poseen actividades catalíticas. Tres son las principales características que hacen notables a las enzimas sobre otros catalizadores: el poder catalítico, su especificidad y la capacidad para

regular su capacidad catalítica por una variedad de compuestos naturales (Prado, *et al.*, 1999).

- Como consecuencia de su naturaleza proteica, la actividad catalítica de las enzimas depende del pH y de la temperatura de reacción.
- La segunda característica importante de la actividad enzimática es la especificidad de las reacciones catalizadas por enzimas. Muchas enzimas son específicas tanto en la naturaleza del sustrato que utilizan, como en la reacción que catalizan.
- La tercera característica importante de las enzimas es que su actividad catalítica puede ser regulada por pequeños iones u otras moléculas (Prado *et al.*, 1999).

Las enzimas funcionan como catalizadores de las reacciones químicas vitales, por lo que son las responsables de las transformaciones metabólicas en los seres vivos; aceleran las reacciones bioquímicas en relación con reacciones no catalizadas a temperaturas alrededor de los 37° C (Bárzana y López, 1992).

Todas las células, incluyendo microorganismos y organismos superiores, producen enzimas. Su acción está estrechamente ligada con las reacciones metabólicas, y la mayoría de las transformaciones químicas requeridas para mantener activas a las células tardarían mucho tiempo en efectuarse o simplemente no procederían si no estuvieran presentes las enzimas (Badui, 2006).

Su estudio en el campo de los alimentos es de primordial interés debido a que son responsables de algunos cambios químicos que sufren los alimentos, cambios que pueden resultar en beneficios (maduración de frutas) o perjuicios (oxidación de ácidos grasos y oscurecimiento enzimático). Por otro lado, muchos productos alimenticios se obtienen a través de reacciones bioquímicas que se efectúan por medio de enzimas endógenas del alimento,

por las que se le añaden o las producidas por los microorganismos utilizados en la elaboración de alimentos fermentados (Badui, 2006).

2.5.2 Aplicación en la industria de alimentos

El uso de enzimas para la producción de alimentos se remonta muchos siglos atrás. En la antigüedad, diversos pueblos utilizaban las hojas de ciertas plantas para envolver carne, lo que facilita la acción de proteasas vegetales (papaína, bromelina y ficina) sobre las proteínas del tejido animal, provocando su ablandamiento. Así mismo, algunos grupos humanos utilizaban el estómago de corderos y becerros como recipiente, causando accidentalmente la coagulación de la leche con enzimas asociadas a este órgano. Ahora se sabe que la acción de las proteasas presentes en el estómago (principalmente quimosina) sobre las caseínas provoca su coagulación, proceso que es indispensable en la manufactura del queso (Badui, 2006).

En el sector alimentario, el interés actual de la aplicación de enzimas en procesos de tecnología enzimática-se enfoca principalmente a (Badui, 2006):

- ✓ La conservación de alimentos o de sus componentes (por ejemplo, vitaminas).
- ✓ Al uso más eficiente de materias primas.
- ✓ Al mejoramiento de la calidad sensorial de los alimentos (textura y sabor).

Otros ejemplos de la tecnología enzimática actual se enlistan a continuación (Badui, 2006):

- Producir alimentos bajos en calorías.
- Eliminar compuestos anti nutricionales de ciertas materias primas.
- El uso de enzimas en medios no acuosos para la producción de compuestos quirales y para la síntesis de polímeros especiales.

- La síntesis de edulcorantes, como el aspartamo, empleando la reacción inversa de una proteasa.
- La producción de ciclodextrinas a partir de almidón.
- El diseño de enzimas “a la medida” de acuerdo a los requerimientos del proceso de ingeniería de proteínas y evolución dirigida logrando modificar su estabilidad térmica o su especificidad.
- La producción a gran escala de enzimas por medios de ingeniería genética. La quimosina recombinante fue la pionera de esta área.
- La aplicación de enzimas o de células inmovilizadas en la producción de materias primas de aplicación en alimentos, como en la producción de jarabes fructosados, de trehalosa y de isomaltulosa; de ácido fumarico; o de aminoácidos como el ácido aspártico o la alanina.

Todas las enzimas son proteínas, tienen una estructura tridimensional globular y solo presentan actividad cuando tienen una conformación espacial que permite establecer una disposición óptima de los aminoácidos de su centro activo o sitio catalítico. Actualmente se conoce la existencia de más de 3,000 tipos de reacciones catalizadas por enzimas; muchas enzimas ya han sido aisladas, purificadas y cristalizadas (Badui, 2006).

2.5.3 Nomenclatura y clasificación

Los primeros nombres que se les dieron a las enzimas fueron triviales, sin seguir ningún sistema de nomenclatura. Este nombre trivial consiste en adicionar el sufijo “asa” al sustrato en que actúa. Sin embargo, no todos los nombres dados a las enzimas siguen esta regla (Prado, *et al.*, 1999).

Los principales grupos de enzimas son (Prado, *et al.*, 1999):

- a) Reacciones de oxidación-reducción, catalizadas por oxidoreductasas.
- b) Reacciones de transferencia de grupo, catalizadas por transferasas.
- c) Reacciones hidrolíticas, catalizadas por hidrolasas.

- d) Reacciones de eliminación, en las cuales se forma un doble enlace, catalizado por liasas.
- e) Reacciones de isomerización, catalizadas por isomerasas.
- f) Reacciones en las cuales dos moléculas son unidas con un gasto energético (normalmente ATP), catalizadas por ligasas (o sintetisas).

Posteriormente, las enzimas son clasificadas siéndoles asignado un número compuesto de cuatro pares (a, b, c, d) (Prado, *et al.*, 1999).

- El primer número (a) indica el tipo de reacción catalizada y puede tener valores del uno al seis de acuerdo a la clasificación del tipo de reacción dada anteriormente.
- El segundo número (b) indica la subclase, la cual usualmente especifica el tipo de sustratos o de enlace que rompe.
- El tercer número (c) indica la subclase, dando una definición más precisa de la reacción catalizada en términos del tipo de electrón aceptor (oxidoreductasas) o del tipo de grupo removido (liasas), etcétera.
- El cuarto número (d) indica el número de serie de la enzima en esta subclase.

Cabe señalar que el sistema de nomenclatura y clasificación de enzimas se basa solo en la reacción catalizada y no tomo en cuenta el origen de la enzima. En teoría, a partir de los veinte aminoácidos naturales, se podría sintetizar un número infinito de proteínas. Sin embargo, se estima que en la naturaleza existen unas dos mil, aunque esta cifra es algo inferior si se considera las pequeñas variaciones de una misma proteína según sea la especie considerada (Prado, *et al.*, 1999).

2.5.4 Polisacaridasas

Las enzimas polisacaridasas hidrolizan los enlaces glucosídicos de los carbohidratos de cadena larga, como la celulosa, el glucógeno y el almidón. Las polisacaridasas más comunes son las amilasas, que hidrolizan

todo excepto los enlaces glucosídicos terminales de dentro del almidón y del glucógeno, produciendo disacáridos y oligosacaridos, (Badui, 2006).

Las amilasas se segregan en vertebrados por las glándulas salivales y el páncreas, y en la mayor parte de invertebrados por las glándulas salivales y el epitelio intestinal. La celulosa la producen microorganismos simbioses del tubo digestivo de animales huéspedes tan distintos como vacas y termitas, que por si mismas son incapaces de producir la enzima que se precisa para la digestión de la celulosa; esta molécula consta de unidades de glucosa polimerizadas por enlaces beta-1,4, (Badui, 2006).

Por otra parte Annison y Lewis, (1966) reportan que los carbohidratos de los productos vegetales consumidos por los rumiantes varían desde azúcares simples y disacáridos hasta componentes de la pared celular de las plantas, de alto peso molecular, celulosa y hemicelulosas. Esta complejidad considera a los pastos, que en una forma u otra son el alimento más importante de los rumiantes. Se ha demostrado que contienen los materiales hidrocarbonados siguientes: glucosa, fructosa, sacarosa, los oligosacáridos taquiosa, rafinosa y melibiosa, pentosanas, fructosanas, y celulosa y hemicelulosas que contienen varios de los siguientes azúcares: glucosa, xilosa, ácido glucurónico, galactosa, ácido galacturónico y arabinosa.

Cada uno de los constituyentes hidrocarbonados de la dieta de los rumiantes es degradado en alguna extensión del rumen. Los azúcares simples son atacados rápidamente, con producción de ácidos no volátiles y ácidos grasos volátiles inferiores de cadena simple. Los polisacáridos son atacados con variables rapidez; los materiales más difíciles son las celulosas y las hemicelulosas, Annison y Lewis (1966).

Las pentosanas, de las cuales las principales son las xilanas, forman de 16 a 20% de la materia seca de los pastos y del heno. La digestión extensa de la pentosana de la dieta se realiza en el rumen. Annison y Lewis,

(1966) aportan que el contenido de xilosa de la ingesta que deja el rumen de bovinos es de aproximadamente 60 a 80 g de xilosa por día que pueden fermentar.

2.5.4.1 Xilanasas

Las xilanasas son enzimas hidrolíticas que participan en el rompimiento de los enlaces glicosídicos β -1,4 presentes en los polisacáridos celulosa y hemicelulosa, respectivamente (Rivers, *et al.*, 1988).

El interés por las xilanasas empezó alrededor de los años 50 debido a su enorme potencial para convertir la lignocelulosa en glucosa y azúcares solubles. Cabe señalar que la lignocelulosa es la fuente de energía renovable más abundante de la tierra. Está formada por tres componentes principales que son: celulosa, hemicelulosa y lignina, y su contenido es bajo en cenizas, proteínas, grasas y ceras (Rivers, *et al.*, 1988).

2.5.4.1.1 Especificidad

Como enzimas que son, las xilanasas son biocatalizadores (incrementan la velocidad de las reacciones químicas al reducir la energía de activación necesaria para la transformación de sustratos en productos), que catalizan la degradación del xilano, polisacárido abundante en la pared celular vegetal (Gallardo, 2007).

Las endoxilanasas o xilanasas (endo- β -1,4-xilanasas; EC 3.2.1.8) son las enzimas específicas que actúan sobre la cadena principal del xilano hidrolizando los enlaces internos β (1 \rightarrow 4) entre moléculas de xilosa, dando lugar a una mezcla de xilooligosacáridos de diferentes tamaños (Gallardo, 2007).

2.5.4.1.2 Microorganismos que las producen

Las xilanasas son producidas por bacterias y hongos xilanólíticos, algunas de las cuales producen múltiples xilanasas con varias actividades específicas. Se ha reportado que la bacteria *C. flavigena* produce al menos seis xilanasas en presencia de bagazo de caña como fuente de carbono (Sunna, y Antranikian, 1997).

Dentro de las bacterias productoras de xilanasas, el género *Cellulomonas* ha sido uno de los más estudiados como es el caso de *Cellulomonas avigena* (Cazemier, *et al.*, 1999), así como especies del género *Bacillus* como *Bacillus subtilis* (Gallardo, 2007) y *Brevibacillus brevis* y *Geobacillus pallidus* (Quintero, 2007).

La mayoría de los microorganismos celulolíticos son capaces de producir tanto celulasas como xilanasas; sin embargo, algunos otros solo producen celulasas o xilanasas (Gong, *et al.*, 1979).

La producción microbiana de estas enzimas está sujeta a diferentes mecanismos de regulación. A partir de los estudios realizados tanto en hongos como en bacterias se ha propuesto un modelo general de regulación controlado por dos mecanismos principalmente. Por un lado, la inducción que se lleva a cabo por el sustrato natural xilana para las xilanasas y por otro la represión por fuentes de carbono de bajo peso molecular como la xilosa, arabinosa o xilobiosa (Gong, *et al.*, 1979).

La producción microbiana de enzimas surge de la existencia de un nivel basal de enzimas; aquí el microorganismo sintetiza y exporta a la superficie celular pequeñas cantidades de enzimas, inician la hidrólisis del sustrato y producen pequeños oligosacáridos que entran a la célula siendo los verdaderos inductores que encienden la transcripción de los genes (Gong, *et al.*, 1979).

La capacidad de degradar xilano está ampliamente distribuida entre los microorganismos saprófitos, tanto bacterias como hongos, así como

entre la microbiota del rumen. Estos microorganismos poseen complejos sistemas enzimáticos para llevar a cabo la degradación del xilano (Gallardo, 2007).

Los xilanos son heteropolisacáridos y su degradación total para producir xilosa y/o arabinosa es llevada a cabo, por un grupo de enzimas que participan sinérgicamente. Las más conocidas son las β -D-xilanasas (E.C. 3.2.1.8) las cuales rompen al azar los enlaces glucosídicos de la cadena principal de la molécula. La arabinofuranosidasa (E.C. 3.2.1.55) hidroliza las cadenas laterales de arabinosa, mientras que las acetil xilan esterases (E.C. 3.1.1.72) liberan grupos acetatos. La glucoronidasa (E.C. 3.2.1.139) remueve las cadenas laterales de ácido glucorónico a partir de unidades de xilosa. Las β -xilosidasas (E.C. 3.2.1.37) son enzimas activas sobre oligosacáridos cortos, llevando a cabo la hidrólisis de los enlaces β -1,4-aril-xilopiranosido produciendo xilosa (Biely, 1993).

2.5.4.1.3 Usos y aplicaciones

La biotecnología de las xilanasas empezó al principio de los años 80, primero en la alimentación animal seguida por aplicaciones en la industria de alimentos. Posteriormente estas enzimas empezaron a usarse en las industrias de lavandería, textil y la de la pulpa y papel. En las últimas dos décadas su uso se ha incrementado en forma considerable y actualmente representan cerca del 20% del mercado mundial de las enzimas (Ponce y Pérez, 2002).

Una de las aplicaciones más importantes de las xilanasas en la industria de la pulpa y del papel. El pulpeo kraft involucra el cocimiento alcalino de la pulpa para remover el 95% de la lignina presente en la madera. El 5% remanente le confiere a la pulpa el color café pardo oscuro. Por razones estéticas y para mejorar las propiedades del papel es necesario un paso de blanqueo, el cual tradicionalmente se hacía por un proceso multietapas, que utiliza cloro o dióxido de cloro. Los productos alternos de estos compuestos químicos son sustancias orgánicas cloradas, algunas de

las cuales son tóxicas, mutagénicas, persistentes y bioacumulativas que causan numerosos daños en los sistemas biológicos. En los últimos 10 años, la industria de la pulpa y el papel utiliza mezclas de xilanasas en el proceso de blanqueo, con esto se ha logrado realizar la brillantez de las pulpas y disminuir la cantidad de cloro utilizado en las etapas de blanqueo, además de resultar muy efectivas con respecto a los costos (Kulkarni, 1999).

Hoy en día, un número significativo de fábricas en todo el mundo utilizan el proceso completo de blanqueo con xilanasas. Además, diferentes productos, incluyendo papeles para revistas y papeles con determinado tejido que son manufacturados con pulpas tratadas enzimáticamente, han sido introducidos al mercado con éxito (Kulkarni, 1999).

Cabe señalar que es indispensable que la preparación de xilanasas este completamente libre de celulasas, ya que esto traería serias implicaciones económicas en términos de pérdida de celulosa, calidad de la pulpa degradada y un incremento en los costos del tratamiento de efluentes (Kulkarni, 1999).

La xilanasas, como las celulasas, también se usan en la industria alimentaria en la clarificación de jugos y vinos, licuefacción de mucílago de café; extracción de saborizantes y pigmentos, aceites de plantas y semillas; maceración de materia vegetal; acondicionamiento de piensos para aves y cerdos y en la industria de la panificación, entre otras (Kulkarni, 1999).

En la industria de la panificación las xilanasas, especialmente la endo-1,4- β -xilanasas, se adiciona a la masa para mejorar su calidad, obteniéndose productos de panadería con mejor textura y sabor. El efecto de las xilanasas es incrementar el volumen específico de los panes, sin provocar un efecto colateral negativo en el manejo de la masa (Matt, 1992).

2.5.4.2 Quitosanasas

El quitosán es un polímero lineal formado por monómeros de D-glucosamina, los que se encuentran unidos por enlaces $\beta(1-4)$, siendo nombrada químicamente: 2 Amino-2-Desoxi- β -D-Glucopiranosas. El quitosán es un producto natural derivado de la quitina, que es un polisacárido presente en el exoesqueleto de artrópodos y zooplancton marinos, formando parte de la pared celular de algunas familias de hongos y levaduras, también está presente en las alas de especies de insectos, siendo importante señalar que estos polisacáridos son dos de los más abundantes en la naturaleza. Se define el quitosán y la quitina como solubles o insolubles en ácido acético a 0.1 mol L^{-1} (Hernández, 2004).

El quitosán es un producto con una amplia gama de aplicación en distintas ramas como la biomedicina, biotecnología, medicina, tratamientos de aguas, industria alimenticia, floculación y coagulación de proteínas y aminoácidos. Estudios realizados anteriormente demuestran que tanto el quitosán como sus productos oligoméricos de degradación presentan actividad antifúngica y antibacteriana *in vitro*, además de ser elicitores de mecanismos de defensa en plantas (Hernández, 2004).

Los oligosacáridos de quitosán pueden obtenerse por dos métodos fundamentalmente: químicos y enzimáticos. Sin embargo la degradación enzimática de los polímeros de quitosán posee una mayor efectividad, debido a que el curso de la reacción de hidrólisis y la distribución de los productos de ella, están sujetos a mejor control, además de propiciar este método un rendimiento mayor de los productos de hidrólisis (Hernández, 2004).

2.5.4.2.1 Aplicaciones en alimentos

- Desacidificación y clarificación de jugos.
- Industria panadera.
- Como agente antimicrobiano.

- Empleo en alimentos dietéticos
- Como emulsificante
- Como preservante
- Películas comestibles

Bebidas y vinos. El quitosán ha sido también usada acertadamente para evitar la coloración de jugo de manzana a niveles de 200 ppm o más (Hernández, 2007).

Microencapsulación de enzimas alimenticias. En la industria alimenticia, la microencapsulación puede ser empleada para enmascarar organolépticamente el gusto amargo y olores desagradables en alcaloides, sales o aceites de pescado (Hernández, 2007).

Inmovilización de células y enzimas. Tales sistemas tienen perspectivas prometedoras debido a la relevante gama de aplicaciones especializadas en sistemas alimenticios. Las enzimas inmovilizadas ofrecen la posibilidad de conservar su actividad en solventes orgánicos. Otra ventaja intrínseca de inmovilizar las enzimas, es que pueden ser reutilizadas muchas veces. La dosis de quitosán como un componente funcional (espesante, emulgente, goma alimentaria) generalmente no excede el 0.5% de la masa del producto (Hernández, 2007).

2.5.4.3 Pectinasas

La textura de las frutas y las verduras se debe a la presencia de pectinas que forman parte de la pared celular, por lo que la acción de las pectinasas altera las características de estos alimentos. Estas enzimas se han clasificado en (Badui, 2006):

- Pectinometilesterasas o pectinoesterasas que al hidrolizar los enlaces éster metílico, liberan metanol (que a veces se asocia erróneamente a la fermentación de frutas) y producen pectinas de bajo metoxilo e incluso ácido poligalacturónico; son abundantes e importantes en las frutas, sobre todo en los cítricos como la naranja.

- Poligalacturonasas, que rompen el enlace glucosídico α -(1-4) del ácido galacturónico de las pectinas por una acción que se puede llevar a cabo tanto en el interior del polímero (endo) como a partir de los extremos (exo); cuando lo hacen en el interior; la viscosidad se reduce rápidamente; y cuando actúa a partir de los extremos, producen moléculas libres de ácido galacturónico y la viscosidad no se afecta tan rápidamente.
- Pectinoliasas o pectinotranseliminadas, que son las liasas de mayor importancia en la tecnología de alimentos; su acción produce dobles ligaduras entre los carbonos 4 y 5 de la molécula de ácido D-galacturónico, lo que trae como consecuencia el rompimiento del enlace glucosídico por β -eliminación, principalmente en las pectinas de alto metoxilo. No se encuentran en las frutas; solo las producen los microorganismos, por lo que las contaminaciones microbianas de las frutas (antes o después de la cosecha) traen consigo un deterioro muy grave en la calidad y vida de anaquel del producto.
- Pectatoliasas que actúan en los ácidos poligalacturónicos o en las pectinas de bajo metoxilo, con una acción similar descrita por las pectinoliasas; solo las producen las bacterias y no se encuentran en forma natural en los vegetales.

2.5.4.3.1 Aplicaciones en alimentos

Los jugos de tomate, naranja, limón, toronja, deben su viscosidad y turbiedad a las pectinas en suspensión que se liberan de sus tejidos en el proceso de extracción; la acción de las pectinasas causa la hidrólisis, la desesterificación y la desestabilización de los coloides, provocando su precipitación y la consecuente pérdida de sus características (cuadro 8).

El consumidor no acepta estos jugos sin su correspondiente turbiedad; por lo tanto, durante su manufactura es necesaria la inactivación enzimática endógena (Badui, 2006).

Cuadro 8. Aplicaciones de enzimas pécticas en el procesamiento de alimentos.

Enzima	Alimento	Propósito o Función
Enzimas Pécticas	Chocolate/cocoa	Actividad hidrolítica durante la fermentación del cacao.
	Café	Hidrolizar la cubierta gelatinosa durante la fermentación de las bayas.
	Jugos de Frutas	Aumentar el rendimiento de extracción por prensado, clarificación, mejorar procesos de concentración.
	Aceite de Oliva	Tratamiento de aceitunas para mejorar la extracción.
	Vino	Clarificación.

Fuente: (Badui, 2006).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Localización del área de estudio

La presente investigación se llevó a cabo en los laboratorios del Departamento de Producción Animal de la UAAAN, el material biológico (masilla) fueron proporcionados por la empresa cervecera Cuauhtémoc Moctezuma, de Monterrey, Nuevo León. Este trabajo se dividió en 6 etapas, las cuales se describen a continuación.

ETAPA I: Acondicionamiento de los animales en estudio, mediante una dieta balanceada, adicionada con subproductos agroindustriales (masilla) y obtención de líquido ruminal.

3.2 Acondicionamiento de ganado Holstein y obtención de líquido ruminal

Se emplearon 4 animales multíparas de la raza Holstein los cuales fueron alimentados durante 120 días con una dieta balanceada con la adición de residuos agroindustriales de la industria cervecera (cuadro 9).

Mediante una bomba nasogástrica se obtuvieron 400 mL de líquido ruminal, el cual fue recolectado en recipientes estériles y transportado en jarras de anaerobiosis. Se cuidaron las condiciones de manejo y transporte de 40° C y anaerobiosis para mantener viables los microorganismos.

El líquido ruminal obtenido se filtró con gasa para lograr una mayor uniformidad y menor viscosidad. Posteriormente fue sometido a una centrifugación a 2,500 rpm durante 15 minutos.

Cuadro 9. Dieta de ganado lechero alimentado con masilla.

INGREDIENTES BALANCEADOS	DIETA CON MASILLA
Sorgo Rolado	30,09
Salvadillo	5
Harinolina	8,61
S. Algodón	13
Silo Maíz	5
Heno Avena	0
Alfalfa	23
MASILLA	14 %
Levadura	0
Prem. Minerales	0,6
Bicarbonato	0,7
Cons. MS	16,75
TCO	22,53
Costo	2,74

Fuente: Montero, 2009.

ETAPA II: Aislamiento preliminar de microorganismos bacterianos en agar nutritivo (AN)

3.3 Aislamiento de microorganismos en AN

El aislamiento se realizó en medio sólido para que los microorganismos cultivados se pudieran diferenciar de acuerdo a sus características macroscópicas. Se preparó el AN (BIOXON) de la siguiente manera: se diluyeron 23 g de agar, en 1000 mL de agua destilada, posteriormente se solubilizó y se esterilizó en una autoclave (PRESTO) a 121 ° C y 15 lb de presión por 15 min. Se vaciaron de 15 a 20 mL de AN en cajas Petri. Posteriormente se tomaron 0.5 mL de líquido ruminal y se sembraron en las cajas, con la ayuda de un asa de Digrasky.

Las cajas fueron incubadas (ARSA) a 39 - 40°C en condiciones anaeróbicas (jarra de anaerobiosis). El tiempo de incubación dependió del tiempo en que se observó crecimiento uniforme de los microorganismos procariotas; se revisaron cada 24 hrs.

3.3.1 Caracterización macroscópica de las especies bacterianas aisladas en AN

Una vez que se observó el crecimiento uniforme, se registraron las características macroscópicas de las colonias.

ETAPA III: Aislamiento de microorganismos bacterianos en medio de cultivo comercial específico para anaerobios-agar Schaedler (AS)

3.4 Aislamiento de microorganismos en AS

Se preparó un medio comercial AS (DICKINSON) de la siguiente manera: se diluyeron 41.9 g de agar, en 1000 mL de agua destilada, posteriormente se solubilizó (se hierve a flama de mechero) y se esterilizo en una auto clave (121°C-15 lb-15 min). Se vaciaron 15 – 20 mL de (AS) en las cajas Petri.

Posteriormente se tomaron 0.5 mL de líquido ruminal y se sembraron en las cajas, con la ayuda de un asa de Digrasky. Las cajas fueron incubadas a 39 - 40°C en condiciones anaerobias (jarra de anaerobiosis). El tiempo de incubación dependió del tiempo en que se observó crecimiento uniforme de los microorganismos procariotas; se revisaron cada 24 hrs.

3.4.1 Caracterización macro y microscópicamente de las especies bacterianas aisladas en AS

Una vez que se observó el crecimiento uniforme, se registraron las características macroscópicas de las colonias, y por medio de la técnica de tinción de Gram (anexo 1) se definieron las características microscópicas.

ETAPA IV: Purificación y mantenimiento de las cepas obtenidas

3.5 Purificación de los microorganismos aislados

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 placas que contenían 15 a 20 mL de AS.

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 (AS), 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 estrió, para lograr la separación de las colonias de manera efectiva. Las cajas fueron incubadas a 39- 40°C en condiciones anaerobias.

Las colonias obtenidas se purificaron y mantuvieron en tubos de cultivo añadiéndoles AS 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: Identificación del metabolismo bioquímico de las cepas bacterianas obtenidas.

3.6 Identificación del metabolismo microbiano

Se seleccionaron 9 cepas puras y se les realizó la identificación bioquímica. Las pruebas bioquímicas son un método utilizado para la

identificación de bacterias de acuerdo a las características que presenta en sus acciones metabólicas.

El agar se prepara en forma de pico de flauta. Esto determina que existan dos cámaras de reacción dentro del mismo tubo. La porción inclinada (pico) expuesta en toda su superficie al oxígeno es aerobia y la porción inferior (fondo) está protegida del aire y es relativamente anaerobia.

Las pruebas bioquímicas realizadas fueron:

3.6.1 Citrato de Simmons:

En tubos de ensaye, se vaciaron 5 mL de Citrato de Simmons (BIOXON) (24.2 g de citrato en 1000 mL de agua destilada, solubilizar y esterilizar); se inclinaron en forma de pico de flauta. Posteriormente se inocularon y se realizó anaerobiosis en las jarras para incubar 40° C. Se monitorearon cada 24 horas hasta observar cambio de vire en el color del medio.

3.6.2 Agar de hierro y lisina:

En tubos de ensaye, se vaciaron 5 mL de agar Hierro y Lisina (33 g de agar en 1000 mL de agua destilada, solubilizar y esterilizar); se inclinaron en forma de pico de flauta. Posteriormente se inocularon y se realizó anaerobiosis en las jarras para incubar 40° C. Se monitorearon cada 24 horas hasta observar cambio de vire de color.

3.6.3 Caldo Urea:

En tubos de ensaye, se vaciaron 5 mL de ureasa (3.87 g de agar en 100 mL de agua destilada, solubilizar y esterilizar); se inclinaron en forma de pico de flauta. Posteriormente se inocularon y se realizó anaerobiosis en las jarras para incubar 40° C. Se monitorearon cada 24 horas hasta observar cambio de vire de color.

ETAPA VI: Empleo de un microorganismo bacteriano para la producción de una enzima de interés industrial en alimentos, mediante el diseño de un medio de cultivo inductor.

3.7 Producción de quitosanasas

3.7.1 Ensayo (Screening)

Se eligieron los 9 cultivos puros en tubo y se realizaron varios screening para verificar la degradación de quitosán como única fuente de carbono en cada microorganismo.

3.7.2 Medio específico

Se preparó el medio sólido; se disolvieron 18 g de Agar-Agar en 1000 mL de agua destilada, posteriormente se solubilizaron y esterilizaron. La fuente de carbono (quitosán), de bajo peso molecular previamente disuelta en 100 mL de agua destilada al 1%, fue adicionada una vez que el medio se encontraba a temperatura ambiente.

Se vaciaron de 10 a 15 mL de este medio en cajas Petri. Se sembró cada una de las 9 cepas puras por separado con el método de tapete en toda la caja y se incubó a 40° C en condiciones de anaerobiosis.

Al mismo tiempo se preparó el mismo medio sólido empleando un buffer para disolver el quitosán de la siguiente manera: se disolvieron 4.5 g de Agar-Agar en 170 mL de agua destilada, se agregaron 80 mL de buffer ácido acético acetato de sodio 50 mM (AAANa) posteriormente se solubilizaron y esterilizaron. La fuente de carbono (quitosán), se disolvió en el medio ya preparado al 1%, fue adicionada una vez que el medio se encontraba a temperatura ambiente.

Se vaciaron de 10 a 15 mL de este medio en cajas Petri. Se sembró cada una de las 9 cepas puras por separado con el método estriado en toda la caja y se incubó a 40° C en condiciones de anaerobiosis.

3.8 Producción de pectinasa

3.8.1 Ensayo (Screening)

Se eligieron los 9 cultivos puros en tubo y se realizaron varios screening para verificar la degradación de pectina como única fuente de carbono en cada microorganismo.

3.8.2 Medio específico

Se preparó el medio sólido; se disolvieron 18 g de agar-agar en 1000 mL de agua destilada, posteriormente se solubilizaron y esterilizaron. La fuente de carbono (pectina), previamente disuelta en 100 mL de agua destilada al 2%, fue adicionada una vez que el medio se encontraba a temperatura ambiente.

Se vaciaron de 10 a 15 mL de este medio en cajas Petri. Se sembró cada una de las 9 cepas puras por separado con el método estriado en toda la caja y se incubó a 40° C en condiciones de anaerobiosis.

3.9 Producción de xilanasa

3.9.1 Ensayo (Screening)

Se eligieron los 9 cultivos puros en tubo y se realizaron varios screening para verificar la degradación de xilosa como única fuente de carbono en cada microorganismo.

3.9.2 Medio específico sólido

Se preparó el medio sólido específico (ver cuadro 10); se disolvió 18 g de agar-agar en 1000 mL de agua destilada, posteriormente se solubilizaron y esterilizaron. La fuente de carbono (xilosa), previamente disuelta en 100 mL de agua destilada al 2%, fue adicionada una vez que el medio se encontraba a temperatura ambiente (medio específico 1).

Se vaciaron de 10 a 15 mL de este medio en cajas Petri. Se sembró cada una de las 9 cepas puras por separado con el método estriado en toda la caja y se incubó a 40° C en condiciones de anaerobiosis.

Una vez que se observó el crecimiento uniforme, se compararon las características macro y microscópicas de las colonias.

Cuadro 10. Composición química del medio sólido específico para el ensayo de la degradación de xilosa.

Componente	Cantidad (%)
Agar Agar	18
Cloruro de sodio (NaCl)	0.5
Nitrato de sodio (NaNO ₃)	0.3
Cloruro de potasio (KCl)	0.5
Fosfato de potasio (KH ₂ PO ₄)	0.2
Sulfato de magnesio (MgSO ₄)	0.01
Fuente de carbono XILOSA	2

3.9.3 Inducción de la actividad xilanasa en medio líquido específico

Se tomó el cultivo puro y se realizó una inducción en medio específico para la degradación de xilosa.

- Preparación del medio líquido inductor 1: se disolvieron 0.8 g de caldo nutritivo en 1000 mL de agua destilada, se esterilizó y una vez que el medio se encontraba a temperatura ambiente, se adicionó 0.05 g de la fuente de carbono (xilosa). Cada muestra se corrió por duplicado.

Se realizó un inóculo de 1 mL en tubos que contenían 3.5 mL de medio inductor 1, se incubó por 48 h en condiciones anaeróbicas. Posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm por 15 minutos, para separar la biomasa la cual fue re-suspendida nuevamente en medio líquido 1, el cual se aumentó la concentración de xilosa en 0.07g; este paso se repitió hasta alcanzar una concentración de xilosa de 0.5g.

- Preparación del medio líquido inductor 2: se preparó medio mineral el cual contenía NaCl, NaNO₃, KCl, KH₂PO₄, MgSO₄ (cuadro 11) en 100 mL de agua destilada, adicionando acetato de potasio (0.01 g) como fuente alterna de carbono: el medio se esterilizó y una vez que alcanzó la temperatura de 25°C se adicionó la xilosa como fuente de carbono en una concentración de 0.059 g/ 3.5 mL.

Se realizó un inóculo de 1 mL en tubos que contenían 3.5 mL de medio inductor 2, se incubó por 48 h en condiciones anaeróbicas. Posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm por 15 minutos, para separar la biomasa la cual fue re-suspendida nuevamente en medio mineral 2, el cual se aumentó la concentración de xilosa en 0.065 g y se disminuyó la de acetato en 0.0035 g; este paso se repitió hasta alcanzar una concentración de xilosa de 0.07g y eliminar por completo la fuente alterna de acetato de potasio. Finalmente se realizó una

caracterización macro y microscópica para cerciorarse que la morfología coincidiera con la cepa original.

Cuadro 11. Composición química del medio líquido inductor para la degradación de xilosa.

Componente	Cantidad (%)
Cloruro de Sodio (NaCl)	0.5%
Nitrato de Sodio (NaNO ₃)	0.3%
Cloruro de Potasio (KCl)	0.5%
Fosfato de Potasio (KH ₂ PO ₄)	0.2%
Sulfato de Magnesio (MgSO ₄)	0.01%

3.9.4 Curva de crecimiento en medio líquido de tioglicolato de sodio

Se disolvieron 29.5 g de tioglicolato de sodio (TGNa) en 1000 mL de agua destilada posteriormente se solubilizaron y se esterilizaron. En tubos de ensaye (triplicado) con 3.5 mL de TGNa se inocularon 50 µl de una suspensión celular bacteriana de la cepa inducida; posteriormente se incubaron a 40° C, previamente se realizó anaerobiosis, y se monitoreó la cinética a tiempos de 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 108, 132, 156 horas

Cada una de las alícuotas tomadas fue leída mediante turbidez empleando un espectrofotómetro (GENESYS 20) leyendo a una longitud de onda de 590 nm.

3.9.5 Curva de crecimiento en medio líquido específico 2

En un matraz Erlenmeyer de 250 mL se agregaron 100 mL de agua destilada y se disolvieron NaCl, NaNO₃, KCl, KH₂PO₄, MgSO₄ (cuadro 12), posteriormente se solubilizaron y esterilizaron. La fuente de carbono (xilosa

al 2%), previamente fue disuelta y adicionada una vez que el medio se encontraba a temperatura ambiente.

Se vaciaron 3.5 mL de este medio en tubos de ensaye (triplicado) se inocularon con 50 µl de una suspensión celular bacteriana obtenida de la cepa inducida el cual es un cultivo puro; posteriormente se incubaron a 40° C y se realizó anaerobiosis; se corrió una cinética a tiempos de 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 108, 132, 156 horas

Cada una de las alícuotas tomadas fue leída mediante turbidez empleando un espectrofotómetro (GENESYS 20) a 590 nm. Los experimentos se realizaron por triplicado.

Cuadro 12. Composición química del medio líquido específico para producir xilanasa

Componente	Cantidad (%)
Cloruro de Sodio (NaCl)	0.5
Nitrato de Sodio (NaNO ₃)	0.3
Cloruro de Potasio (KCl)	0.5
Fosfato de Potasio (KH ₂ PO ₄)	0.2
Sulfato de Magnesio (MgSO ₄)	0.01
XILOSA	2

3.9.6 Determinación de proteína extracelular 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 a 5,000 rpm (SOLBAT) por 15 minutos (2 ciclos). 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 10 µL de extracto enzimático de los diferentes tiempos de fermentación en tubos de ensaye (duplicado) y 500 µL de Biuret en un baño a una temperatura de 25°C por 30 minutos (incluyendo un blanco y un patrón) posteriormente se agitaron y se leyó la absorbencia a 546nm. Las muestras fueron preparadas de la siguiente manera:

- Blanco:
10 µL de agua destilada + 500 µL de Biuret
- Patrón:
10 µL de solución patrón + 500 µL de Biuret
- Muestra:
10 µL de extracto enzimático + 500 µL de Biuret

Para el análisis de datos se empleó la siguiente ecuación:

$$\text{Conc. de Prot. Total} = \frac{\text{Absorbancia de la Muestra}}{\text{Absorbancia Patron}} \times \text{Concentracion Patron}$$

3.9.7 Determinación de actividad enzimática mediante la técnica de azúcares reductores (Somogy-Nelson):

La cuantificación de actividad xilanasas se determinó mediante la técnica de azúcares reductores mediante el método propuesto por Somogyi 1952, Nelson 1944.

Las muestras obtenidas de los diferentes tiempos, fueron centrifugadas a 5,000 rpm (SOLBAT) por 15 minutos (2 ciclos). El sobrenadante fue separado y empleado como extracto enzimático a diferentes tiempos de fermentación para la determinación de proteína mediante el método de Biuret.

○ Preparación del sustrato

Se pesaron 2g xilosa para posteriormente disolverlos en 100 mL de agua destilada.

○ Cinética enzimática

Se agregaron 200 μ L de sustrato en tubos de ensaye (duplicado) y se colocaron en baño maría (Napco Model 210A) a 40° C. Se añadieron 50 μ L de extracto enzimático obtenido a los diferentes tiempos de fermentación, monitoreando a tiempos de 0, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 75 y 90 minutos.

Cuadro 13. Preparación de muestras para la cinética enzimática.

	Blanco General	Blanco Sustrato	Blanco Enzima
Agua Destilada	250 μ L	50 μ L	200 μ L
Sustrato		200 μ L	
Extracto enzimático			50 μ L
Somogy	250 μ L	250 μ L	250 μ L

○ Cuantificación de azúcares reductores (Somogy-Nelson):

El producto obtenido de la cinética enzimática se cuantificó mediante la técnica de azúcares reductores. La metodología empleada para la medición de azúcares reductores fue la siguiente:

- Se colocaron 250 μ L del reactivo 1 Somogy.
- Se incubó en baño de agua hirviendo a 100°C durante 10 minutos. Se retiró del agua hirviendo y se dejó enfriar a temperatura ambiente.
- Se agregaron 250 μ L de reactivo 2 Nelson y se agitó vigorosamente.
- Se agregaron 4 mL de agua destilada y se agito.

Finalmente se midió la absorbancia en un espectrómetro a una longitud de onda de 660 nm.

Una unidad de actividad xilosa se definió como: **U**= Cantidad de azúcares reductores liberados en mg/mL por cada mL de proteína en 1 hora, empleando xilosa al 2%.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este trabajo de investigación fue realizado en seis etapas para aislar, purificar e inducir a un microorganismo presente en líquido ruminal de bovino y evidenciar que es capaz de producir enzimas polisacaridasas en un medio anaerobio y con condiciones específicas de temperatura y pH.

A continuación se desarrollan los resultados obtenidos de cada una de las de las 6 etapas en las que se dividió esta investigación.

ETAPA I: Acondicionamiento de los animales en estudio, mediante una dieta balanceada, adicionada con subproductos agroindustriales (masilla) y obtención de líquido ruminal.

4.1 Acondicionamiento de ganado Holstein y obtención de líquido ruminal

El acondicionamiento se llevo a cabo satisfactoriamente en 120 días de adicionar a la dieta de las 4 vacas Holstein subproductos de la industria cervecera (masilla)(ver cuadro 9), con un peso vivo inicial de 550 Kg, esto con el fin de adaptar la flora microbiana. Hobson, (1989) menciona que la eficiencia de los rumiantes para utilizar esta gran variedad de dietas se debe a la gran diversidad del ecosistema microbiano ruminal formado por bacterias, protozoarios, hongos y bacteriófagos. Por su parte Kamara (2005) afirma que los microorganismos sobreviven en el rumen bajo diferentes restricciones las cuales pueden darse de manera natural o bien asociadas con la alimentación.

Por otra parte Annison y Lewis (1966) reportan que a medida que crece el rumen va estableciéndose una población mixta de bacterias y protozoarios, además de que la toma frecuente de alimentos por el animal proporciona un suplemento regular de substrato para los microorganismos,

aparte de el contacto con otros animales que da como resultado la forma más rápida de establecer una diversidad mayor de microorganismos.

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 $39^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (figura 6).



Figura 6. Fotografía de la obtención de líquido ruminal mediante empleo de una bomba nasogástrica.

ETAPA II: Aislamiento preliminar de microorganismos bacterianos anaerobios en agar nutritivo (AN)

4. 2 Aislamiento de microorganismos anaerobios en AN

En la figura 7 se muestran las cajas con AN después de haber obtenido un crecimiento homogéneo incubado a 40°C por tiempos de 24 hasta 96 h, por lo tanto representan las cajas que contiene a las colonias originales.

En agar nutritivo se obtuvieron 17 colonias de las cuales dos (VAM 205-2 y VAM 1004-1) presentaron características morfológicas exactamente iguales en todos los aspectos. Sin embargo, la información reportada de características macroscópicas no es suficiente para afirmar si se trata de la misma cepa, ya que existen varias colonias bacterianas pertenecientes a

distintos géneros y especies y pueden presentar morfologías macroscópicas similares.

4.2.1 Caracterización macroscópica de las especies bacterianas aisladas en AN

La colonia VAM 1004-5 es la única que posee un color rosa claro, así como la colonia VAM 1004-3 que presentó un color en amarillo huevo; Annison y Lewis (1966) reportan a los microorganismos *Ruminococcus flavefaciens* y *Bacteroides succinogenes* como cepas que poseen la característica particular de una coloración amarillo intenso.

La colonia VAM 1004-2 es la única colonia que presentó un color ámbar, además se obtuvieron 4 colonias de color beige (VAM 205-1, VAM 1502-3, VAM 4906-2, VAM 1004-7), las cuales presentaron características diferentes entre ellas.

Un dato importante es que solo una colonia, la VAM 1502-4 mostró superficie rugosa y las restantes, fueron de superficie lisa (ver cuadro 14).

Se obtuvieron 2 colonias (VAM 4906-1 y 2) de las cuales no se caracterizaron debido a que no se lograron distinguir sus características por el crecimiento saturado en la caja Petri.

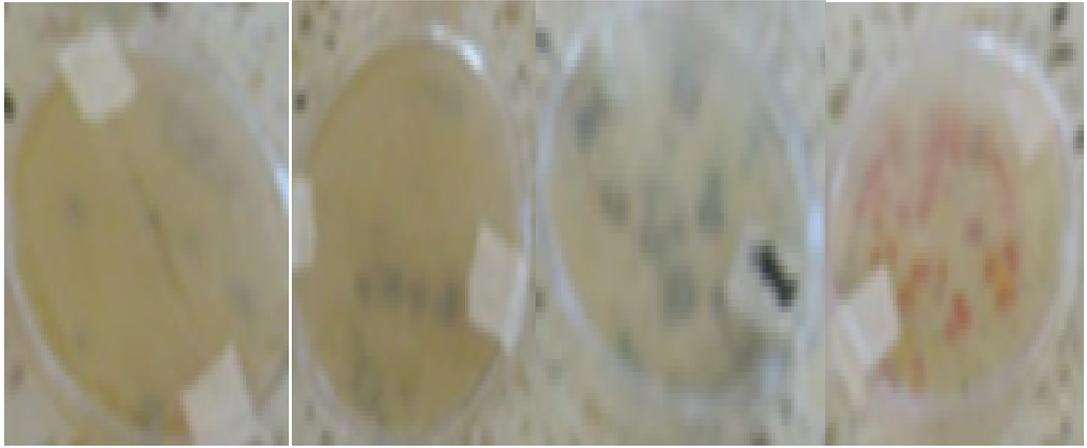


Figura 7. Fotografía que muestra el crecimiento microbiológico empleando medio de agar nutritivo a 40 °C y en condiciones anaeróbicas.

Cuadro 14. Morfología macroscópica de los microorganismos aislados en agar nutritivo.

CAJA VAM # 205											
# COLONIA	TAMAÑO	COLOR	FORMA	ELEVACION	SUPERFICIE	ASPECTO	BORDES	LUZ REFLEJADA	LUZ TRANSMITIDA	CONSISTENCIA	# DE REPETICIONES
1	Muy chica	Beige	Irregular	Convexa	Lisa	Húmeda	Enteros	Mate	Opaca	Suave y viscosa	2
2	Chico	Amarillo claro	Circular	Convexa	Lisa	Húmeda	Enteros	Brillante	Traslucida	Suave y viscosa	11
3	Mediano	Blanco	Irregular	Convexa	Lisa	Húmeda	Irregulares	Brillante	Traslucida	Suave y viscosa	14
CAJA VAM # 1502											
1	Muy chica	Amarillo claro	Circular	Plana	Lisa	Húmeda	Enteros	Brillante	Traslucida	Suave y viscosa	22
2	Chico	Blanco	Irregular	Plana	Lisa	Húmeda	Irregulares	Brillante	Traslucida	Dura y viscosa	13
3	Chico	Beige	Irregular	Convexa	Lisa	Húmeda	Irregulares	Brillante	Opaca	Suave y viscosa	1
4	Chico	Blanco	Circular	Plana	Rugosa	Seca	Enteros	Mate	Transparente	Dura y viscosa	1
CAJA VAM # 4906											
1	No determinado	Amarillo	Circular	Plana	Lisa	Húmeda	Enteros	Brillante	Traslucida	Suave y viscosa	No se pueden contar
2	No determinado	Beige	Irregular	Plana	Lisa	Húmeda	Irregulares	Mate	Traslucida	Suave y viscosa	No se pueden contar
CAJA VAM # 1004											
1	Chico	Amarillo claro	Circular	Convexa	Lisa	Húmeda	Enteros	Brillante	Traslucida	Suave y viscosa	3
2	Chico	Ámbar	Irregular	Convexa	Lisa	Húmeda	Enteros	Brillante	Traslucida	Suave y viscosa	1

3	Chico	Amarillo huevo	Circular	Plana	Lisa	Seca	Enteros	Mate	Opaca	Dura y viscosa	1
4	Chico	Blanco	Circular	Plana	Lisa	Húmeda	Enteros	Brillante	Traslucida	Suave y viscosa	1
5	Mediano	Rosa claro	Circular	Convexa	Lisa	Húmeda	Enteros	Brillante	Opaca	Suave y viscosa	1
6	Mediano	Blanco	Circular	Pulvinada	Lisa	Húmeda	Irregulares	Brillante	Transparente	Suave y viscosa	1
7	Chico	Beige	Circular	Convexa	Lisa	Húmeda	Enteros	Brillante	Traslucida	Suave y viscosa	1
8	Mediano	Amarillo	Irregular	Convexa	Lisa	Húmeda	Irregulares	Brillante	Traslucida	Suave y viscosa	1

VAM= Vaca Alimentada con Masilla

ETAPA III: Aislamiento de microorganismos bacterianos en medio de cultivo comercial específico para anaerobios-agar Schaedler (AS)

4.3 Aislamiento de microorganismos en AS

El rumen puede ser considerado como una gran cámara de fermentación que proporciona el medio conveniente para el cultivo continuo de la población microbiana (Annison y Lewis, 1966), por lo tanto las bacterias obtenidas en AS crecieron bajo las mismas condiciones que el rumen proporciona tanto de anaerobiosis como de temperatura.

Hungrate, (1966) describe que en general y debido a las condiciones que prevalecen en el rumen, la mayor parte de los microorganismos son anaerobios o anaerobios facultativos, es por ello que se empleó AS como medio de cultivo específico para anaerobios y se obtuvieron 20 colonias; este número es mayor al de las colonias obtenidas en AN, sin embargo, esta diferencia no es significativa. En las figuras 8 y 9 se pueden observar las colonias con un crecimiento homogéneo en medio AS después de 48-96 h de incubación.

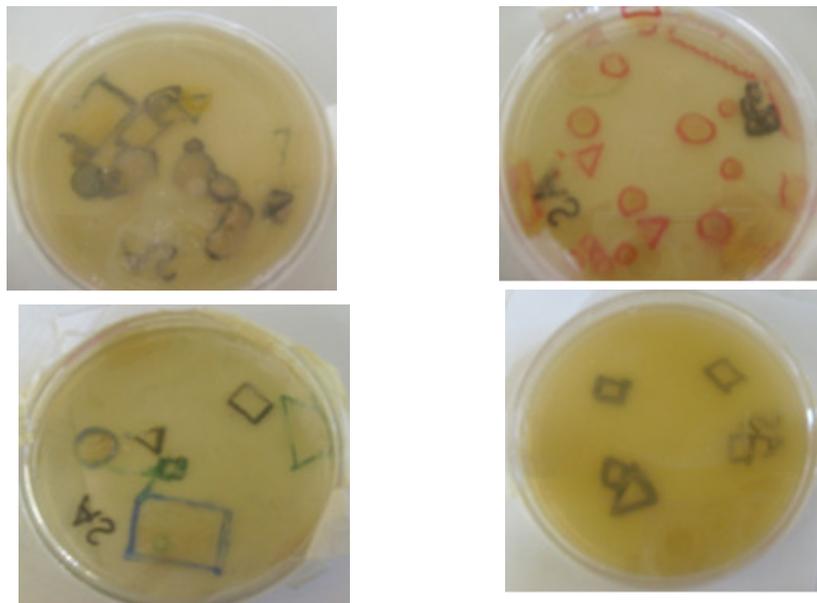


Figura 8. Fotografía que muestra el crecimiento microbiológico empleando medio de agar Schaedler a 40 °C y en condiciones anaeróbicas

4.3.1 Caracterización macroscópica de las especies bacterianas aisladas en AS

Varela, (2002) reporta que una de las características que poseen las bacterias es la capacidad para sintetizar sus propios constituyentes a partir de nutrientes que toman del medio externo; en este caso el agar Schaedler es el medio externo constituido por una fuente de carbono, sales minerales y nitrato como fuente de nitrógeno que es más comúnmente empleado por los microorganismos anaerobios ya que los aerobios prefieren el amoniaco.

Por lo tanto, el crecimiento bacteriano obtenido en las cajas de agar Schaedler es definido por Varela, (2002) como el aumento ordenado de todos los constituyentes químicos en la célula. En este medio se lograron identificar 20 colonias; de las cuales 2 colonias (VAM 205-2 y VAM 1502-6) fueron color beige y presentaban las mismas características macroscópicas, por lo que posiblemente podrían ser la misma colonia, en total existen 19 colonias diferentes entre sí en cuanto se refiere a caracterización macroscópica.

Las dos únicas colonias con superficie granular fueron VAM 1502-5 (figura 10), y VAM 4906-3 (ver figura 8), esta ultima presentó la característica de desprender pigmentos amarillos.

Se reporta en la literatura que el número total de bacterias normalmente presentes en el contenido de líquido ruminal es de unas 10^{10} UFC por gramo y la proporción de cada tipo depende de la dieta del animal (Annison y Lewis, 1966). Por lo tanto, lo descrito anteriormente coincide con los resultados obtenidos en la caja VAM 205 (ver figura 9) ya que se obtuvieron 18 cepas de las cuales se encontró que existen 11 cepas idénticas con un tamaño mediano por lo tanto son las más abundantes, en otras palabras, el contenido de líquido ruminal sembrado en esta caja poseería una gran cantidad de biomasa (Ver cuadro 15).

La colonia VAM 1004-2 (figura 11) es la única que presentó un color blanco; sin embargo, el número total de colonias crecidas en esta caja fue de 4.

4.3.2 Caracterización microscópica de las especies bacterianas aisladas en AS

Annison y Lewis (1966) reportan que los grupos más notables presentes en líquido ruminal son: bacilos pequeños y cocos, esto coincide con los resultados obtenidos de la caracterización microscópica de las nueve cepas bacterianas purificadas ya que 7 cepas son del género *Bacilo* y 2 con forma cocoide.

CAJA VAM # 205												
#	TAMAÑO	COLOR	FORMA	ELEVACION	SUPERFICIE	ASPECTO	BORDES	LUZ	LUZ	CONSISTENCIA	# DE	GRAM

Cuadro 15. Morfología macro y microscópica de los microorganismos aislados en agar Schaedler.

COLONIA								REFLEJADA	TRANSMITIDA		REPETICIONES	
1	Mediano	Café claro	Circular	Convexa	Lisa	Húmeda	Enteros	Brillante	Traslucida	Suave y viscosa	11	Bacilos Gram (-)
2	Chico	Beige	Circular	Convexa	Lisa	Húmeda	Enteros	Brillante	Traslucida	Suave y viscosa	1	Bacilos Gram (-)
3	Mediano	Beige	Irregular	Plana	Rugosa	Húmeda	Regulares	Mate	Opaca	Dura y viscosa	2	-----
4	Grande	Amarillo intenso	Irregular	Plana	Lisa	Húmeda	Irregulares	Brillante	Traslucida	Suave y viscosa	2	
5	Muy grande	Beige	Irregular	Plana	Rugosa	Húmeda	Irregulares	Brillante	Traslucida	Suave y viscosa	2	Cocobacilos Gram (-)
CAJA VAM # 1502												
1	Mediano	Ámbar centro y beige alrededor	Circular	Convexa	Lisa	Húmeda	Enteros	Brillante	Traslucida	Suave y viscosa	1	-----
2	Mediano	Ámbar	Circular	Plana	Rugosa	Seca	Irregulares	Mate	Opaca	Dura y viscosa	1	-----
3	Mediano	Crema con centro	Circular	Convexa	Lisa	Húmeda	Enteros	Brillante	Traslucida	Suave y viscosa	1	-----

		ámbar										
4	Grande	Beige intenso	Irregular	Plana	Lisa	Húmeda	Enteros	Brillante	Opaca	Suave y viscosa	1	Cocobacilos Gram (-)
5	Chico	Beige	Irregular	Plana	Granular	Seca	Enteros	Mate	Opaca	Dura y viscosa	1	-----
6	Chico	Beige	Circular	Convexa	Lisa	Húmeda	Enteros	Brillante	Traslucida	Suave y viscosa	1	Bacilos Gram (-)
7	Grande	Beige	Irregular	Plana	Lisa	Húmeda	Irregulares	Brillante	Opaca	Suave y viscosa	1	Bacilos Gram (-)
CAJA VAM # 4906												
1	Grande	Beige intenso	Circular	Convexa	Lisa	Húmeda	Enteros	Brillante	Traslucida	Suave y viscosa	2	-----
2	Mediano	Beige con blanco al rededor	Circular	Pulvinada	Lisa y granular alrededor	Seca	Irregulares	Mate	Opaca	Suave y viscosa	1	-----
3	Mediano	Amarillo huevo	Circular	Convexa	Granular	Húmeda	Irregulares	Brillante	Opaca	Suave y viscosa	1	Cocos Gram (+)
4	Mediano	Amarillo	Irregular	Plana	Rugosa	Húmeda	Enteros	Mate	Opaca	Suave y viscosa	1	-----

5	Grande	Beige	Irregular	Convexa	Lisa	Húmeda	Irregulares	Brillante	Traslucida	Suave y viscosa	4	Bacilos Gram (-)
6	Mediano	Beige con café en el centro	Circular	Pulvinada	Lisa	Húmeda	Enteros	Brillante	Opaca	Suave y viscosa	1	-----
CAJA VAM # 1004												
1	Mediano	Beige	Irregular	Plana	Lisa	Húmeda	Irregulares	Brillante	Transparente	Suave y viscosa	1	-----
2	Mediano	Blanco	Circular	Convexa	Lisa	Húmeda	Enteros	Mate	Traslucida	Suave y viscosa	4	Cocos Gram (+)

VAM = Vaca Alimentada con Masilla

En la figura 9 muestra que las colonias de la muestra VAM 205-1 son bacterias Gram negativas del género *Bacilos* presentando características de forma bacilar pequeños ovalados, con puntas redondas, delgados y cortos. En comparación con la colonia VAM 1502-6 son muy parecidos a excepción del tamaño microscópicamente hablando y comparado con la colonia 205-1 con forma de bacilos delgados son diferentes a los de la colonia 205-2 ya que son de forma gruesa.

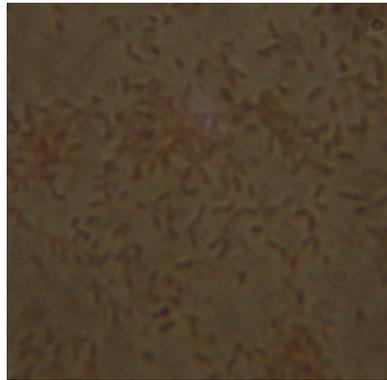


Figura 9. Fotografía de las características microscópicas de colonia codificada como VAM 205-1, teñida con Gram.

En la figura 10 se observan las características microscópicas de la VAM 205-2, la cual es un bacilos Gram negativo de tamaño pequeño y ovalado, puntas redondas, gordos y cortos, estas características coinciden con las del microorganismo asilado *Succinivibrio dextrinosolvens* el cual fermenta diversos azúcares (Annison y Lewis, 1966).

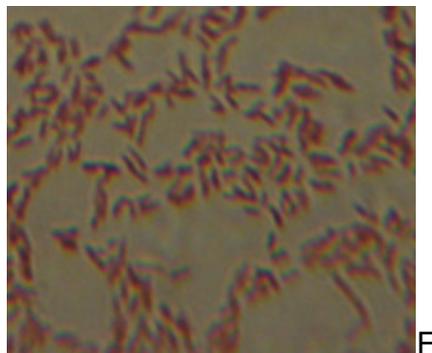


Figura 10. Fotografía de las características microscópicas de colonia codificada como VAM 205-2, teñida con Gram.

La colonia 5 de la caja VAM 205 posee características de tamaño demasiado pequeños los cuales presentaron una morfología de cocobacilos delgados, cortos y ovalados Gram negativos como se muestra en la figura 11.

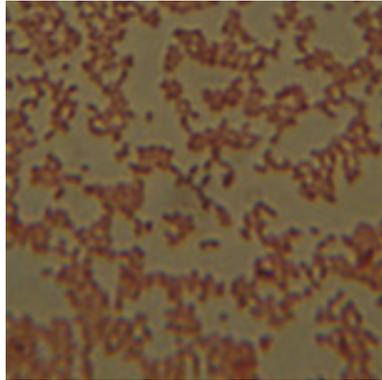


Figura 11. Fotografía de las características microscópicas de colonia codificada como VAM 205-5, teñidas con Gram.

Cocobacilos pequeños, ovalados, con puntas redondas, delgados y cortos Gram negativos son las características presentadas por la colonia numero 4 de la caja VAM 1502, (ver figura 12). En comparación con los cocobacilos de la colonia VAM 205-5 fueron más pequeños en cuanto a tamaño y macroscópicamente son de elevación plana, forma irregular, aspecto húmedo, luz reflejada brillante y consistencia suave y viscosa, las dos colonias.

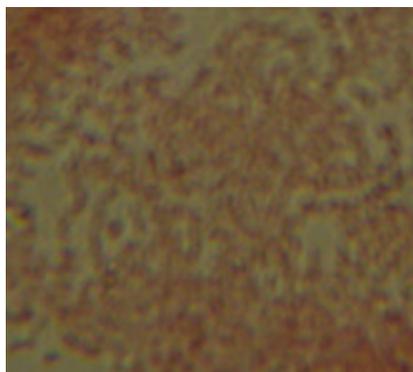


Figura 12. Fotografía de las características microscópicas de colonia codificada como VAM 1502-4, teñidas con Gram.

El análisis microscópico de la colonia numero 6 de la caja VAM 1502 indica que son microorganismos bacilares de tamaño muy chico con puntas redondas, ovalados y delgados a continuación se muestran en la figura 13. Si se comparan con las demás colonias se encontró que: las colonias VAM 205-1, VAM 205-2, VAM 1502-7, y VAM 4906-5 son bacilos Gram negativos.

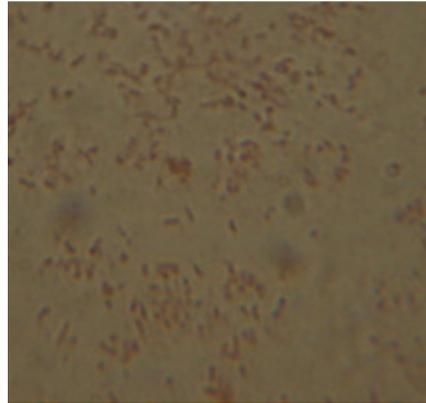


Figura 13. Fotografía de las características microscópicas de colonia codificada como VAM 1502-6, teñidas con Gram.

La colonia VAM-1502-7 es un microorganismo Gram negativo con forma de bacilos ovalados y godos con punta redonda de tamaño chico., como se muestra en la figura 14. Estas características coinciden con las morfología microscópicas de la colonia VAM 4906-5 además de que macroscópicamente son muy parecidas, a diferencia de la elevación y la luz transmitida.

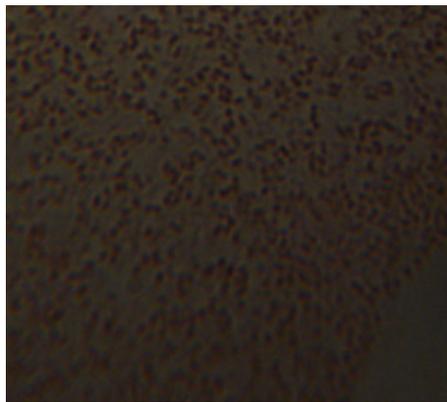


Figura 14. Fotografía de las características microscópicas de colonia codificada como VAM 1502-7, teñidas con Gram.

En la caja VAM 4906 colonia 3 se identificaron bacterias en forma de cocos de un tamaño chico y redondo. Comparada con la colonia VAM 1004-2 son microscópicamente muy parecidos a excepción del tamaño y macroscópicamente son muy diferentes sobre todo en color, superficie, bordes, luz reflejada y luz transmitida (figura 15).

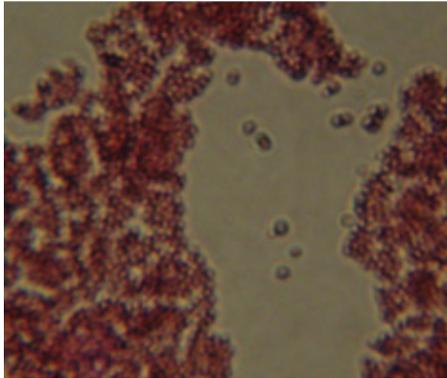


Figura 15. Fotografía de las características microscópicas de colonia codificada como VAM 4906-3, teñida con Gram.

En la figura 16 se observan microorganismos bailares Gram negativos con forma ovalada, puntas ovaladas, gordos y de tamaño corto, los cuales pertenecen a la colonia 4906-5.

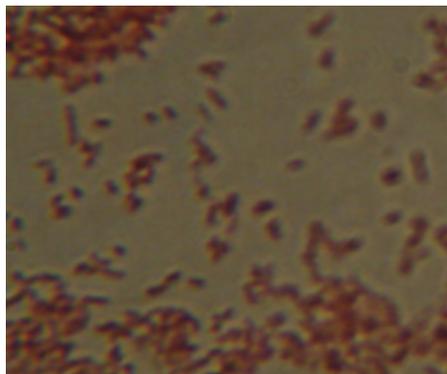


Figura 16. Fotografía de las características microscópicas de colonia codificada como VAM 4906-5, teñidas con Gram.

En la figura 17 se muestra la colonia 2 de la caja VAM 1004 en donde se identificaron bacterias bacilares con tamaño mediano, Gram positiva de morfología redonda. Anisson y Lewis (1966) reportan que *Ruminococcus flavefaciens* y *Ruminobacter parvum* son cocos Gram negativos caracterizadas por poseer un pigmento amarillo aislados de líquido ruminal. Comparado estas bacterias aisladas en forma de cocos no coinciden ya que la bacteria VAM 4906-3 y VAM 1004-2 se retuvieron el colorante cristal violeta, por lo tanto se trataban de bacterias Gram positivas.

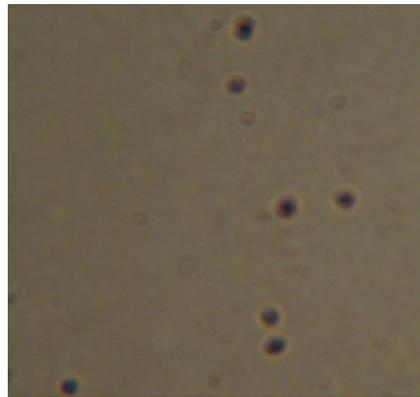


Figura 17. Fotografía de las características microscópicas de colonia codificada como VAM 1004-2, teñidas con Gram.

Comparando los resultados con la literatura se encontró que se aislaron 7 bacterias del género *Bailus* Gram negativas. Annison y Lewis (1966) reportan que *Bacteroides succinogenes* es un bacilo Gram negativo de color amarillo y estrictamente anaerobio; sin embargo, no coincide el color de la colonia con las 7 cepas que se identificaron.

Selenomonas ruminantium y *Desulphovibrio* son dos microorganismos aislados de líquido ruminal los cuales se describen como: bacilos Gram negativos, anaerobios y capaces de fermentar azúcares. *Veillonella gazogenes* y *Propionibacterium sp.* pertenecen al grupo de los cocos Gram positivos, además de fermentar azúcares y formar ácidos propiónico, acético, CO₂ y H₂.

(Annison y Lewis 1966). Comparados estos microorganismos con los aislados en AS poseen características similares.

ETAPA IV: Purificación y mantenimiento de las cepas obtenidas

4.4 Purificación de los microorganismos aislados

Las nueve cepas purificadas se inocularon en tubos con AS, dando como resultados diferentes tiempos de crecimiento uniforme, los cuales se muestran en el cuadro 16.

Cuadro 16. Tiempos de crecimiento de las cepas puras en medio de cultivo AS.

TIEMPO DE CRECIMIENTO		
24 Horas	48 Horas	96 Horas
VAM 1004-2	VAM 1502-4	VAM 205-5
VAM 205-2	VAM 1502-6	VAM 4906-3
VAM 4906-5	VAM 1502-7	
	VAM 205-1	

En la figura 18 se observan las 9 cepas puras. Una de las características importantes de las cepas VAM 1502-4, VAM 1502-6 y VAM 1502-7 es que rompieron el medio, esto es un signo de que son productoras de gas, lo cual puede ser debido por un proceso fermentativo de azúcares presentes en el medio o bien por la utilización de compuestos azufrados que generan ácido sulfúrico.



Figura 18. Fotografía de cepas purificadas y conservadas en AS.

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

4.5 Identificación del metabolismo microbiano

Las pruebas bioquímicas determinan la actividad metabólica, las preferencias nutricionales y la capacidad enzimática de un microorganismo a partir de un sustrato definido, el cual se encuentra incorporado en un medio de cultivo y que en muchas ocasiones está relacionado con un indicador que marque cambios en pH proporcionales al consumo del nutriente de interés.

4.5.1 Citrato de Simmons

Es una de las pruebas empleadas usado para diferenciar enterobacterias, el crecimiento consume el ácido y como consecuencia se produce un incremento de pH en el medio y el indicador vira de verde a azul rey o azul de prusia.

La utilización del citrato como única fuente de carbono se detecta mediante el crecimiento y la alcalinización del medio. Este aumento de pH se visualiza como el indicador azul de bromotimol que vira al alcalino a pH 7.6.

En la figura 19 el tubo azul pertenece a la cepa VAM 205-2 que fue la única que se observó citrato positivo a las 48 horas y hubo un cambio de vire en el indicador azul de bromotimol modificando el pH del medio (tabla 17), por lo que es posible que esta cepa sea un *Streptococcus*. Se ha demostrado que los estreptococos son microorganismos importantes de la flora del rumen. Briggs (1966) mediante exámenes serológicos detallados de los estreptococos del rumen, demostró que la bacteria principal presente en el rumen de bovino es *Streptococcus bovis* del grupo D de Lancefield. Hay detalles que indican que los estreptococos del rumen son anaerobios facultativos.



Figura 19. Fotografía de la cepa VAM 205-2 del metabolismo microbiano (Citrato de Simmons)

4. 5 2 Agar de hierro y lisina

Durante las primera etapas de la incubación el fondo virara el indicador de pH de medio al acido (amarillo) por la fermentación de la glucosa. Luego si

el aminoácido (lisina) es descarboxilado se forman aminas que provocan un retorno al color original del medio hacia un viraje al básico (color violeta).

Por lo tanto las cepas VAM 205-1, VAM 205-2 y, VAM 1502-7 a las 48 horas obtuvieron la desanimación positivas así como también las cepas VAM 1502-4 y, VAM 1502-6 solo que fueron positivas a las 24 horas dando como resultado un color rojo intenso como se muestra en la figura 20; esta desaminación produce un ácido y un NH_3 y se visualiza en la superficie mediante la aparición de un color rojo intenso y la producción de H_2S a partir de tiosulfato visualizado por la precipitación de sulfuro ferroso de color negro (ver tabla 17). Sin embargo, las demás cepas fueron negativas quedando de color amarillo.



Figura 20. Fotografía de la cepa VAM 1502-4 del metabolismo microbiano (Agar de Hierro y Lisina)

4.5.3 Caldo Urea

La urea es una diamida del ácido carbónico que puede ser hidrolizada con liberación de amoníaco y dióxido de carbono. La ureasa es una enzima que poseen muchas especies de microorganismos que pueden hidrolizar urea de acuerdo a la siguiente reacción química:



El amoniaco reacciona en solución para formar carbonato de amonio, produciéndose alcalinización y aumento de pH del medio. Las nueve cepas puras dieron urea negativa, esto significa que los microorganismos no producen la enzima ureasa (ver cuadro 17).

Cuadro 17. Resultados de pruebas bioquímicas para cada cepa.

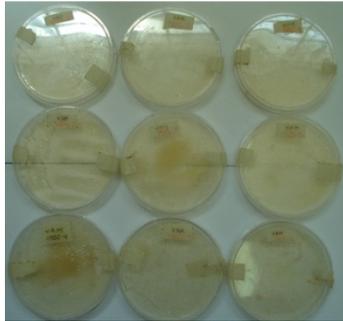
CEPA	CITRATO DE SIMMONS	24 Hrs.	48 Hrs.	Agra LIA	24 Hrs.	48 Hrs.	UREA	24 Hrs.	48 Hrs.
VAM 205-1	-			+		✓	-		
VAM 205-2	+		✓	+		✓	-		
VAM 205-5	-			-			-		
VAM 1004-2	-			-			-		
VAM 1502-4	-			+	✓		-		
VAM 1502-6	-			+	✓		-		
VAM 1502-7	-			+		✓	-		
VAM 4906-3	-			-			-		
VAM 4906-5	-			-			-		

ETAPA VI: Empleo de un microorganismo bacteriano para la producción de una enzima de interés industrial en alimentos, mediante el diseño de un medio de cultivo inductor.

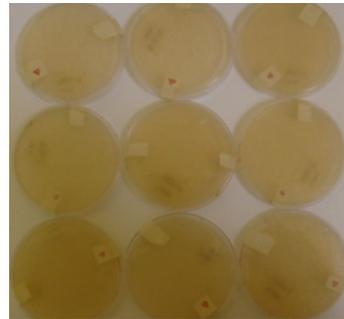
4.6 Producción de la enzima quitosanasa

En la figura 21 se muestra el crecimiento obtenido empleando el medio solido 1 y 2 en los cuales no se observa crecimiento después de 144 h de

incubación; por lo tanto, ninguna de las nueve cepas tiene la capacidad de emplear al quitosán como fuente de carbono y producir la enzima quitosanasa, por lo que se sugiere se realice una inducción de la enzima, ya que reportes en la literatura mencionas que los microorganismo ruminales son capaces de producir quitinasas.



a)



b)

Figura 21. Fotografía de cajas empleando quitosán como fuente de carbono con a) Medio Solido sin buffer y b) Medio solido con Buffer (AAANa 50 mM).

4.7 Producción de la enzima pectinasa

En la figura 22 no se observa un crecimiento tras 120 h de incubación, por lo que se sugiere que los microorganismos seleccionados no tienen la capacidad de hidrolizar la pectina; o bien, es necesario modificar las condiciones del medio de cultivo específico probado en esta etapa y realizar una inducción de la enzima pectinasa.

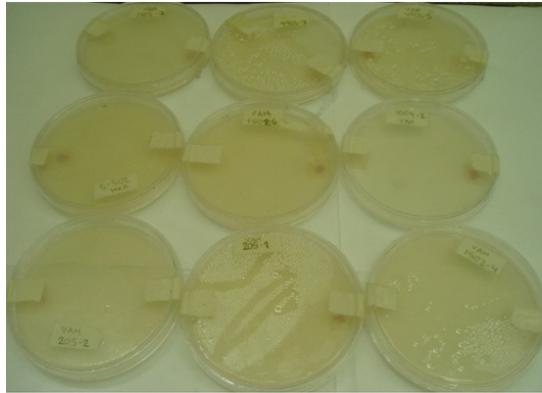


Figura 22. Fotografía de cajas con medio solido y pectina

4.8 Producción de la enzima xilanasa

En la figura 23 se muestran las cajas con medio solido específico empleando como única fuente de carbono la xilosa donde la cepa VAM 1502-4 fue la única que presentó un crecimiento después de 35 días de haberse incubado en placa y posteriormente se paso a tubo.

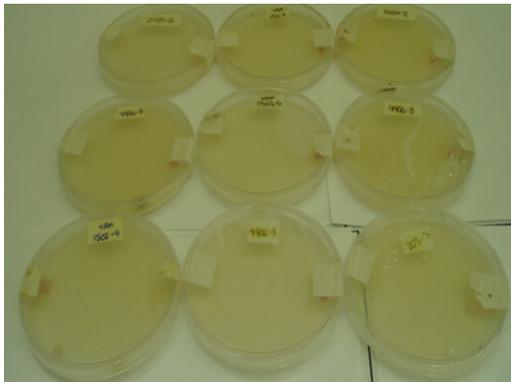


Figura 23. Fotografía de cajas con medio solido y xilosa

4.8.1 Inducción de la actividad xilanasa en medio líquido específico

Se utilizo la cepa pura VAM 1502-4 para la inducción en medio líquido inductor 1 y 2.

En medio líquido inductor 1 hubo se presentó poco crecimiento celular, por lo que fue una característica determinante para trabajar con el medio inductor 2.

En la figura 24 se observa que en el medio líquido inductor 2 se formó un botón (biomasa) por lo que se dedujo la cepa bacteriana VAM 1502-4 presentaba la capacidad para producir la enzima xilanasa ya que hidrolizó a la xilosa empleándola como única fuente de carbono e incorporándola a su metabolismo celular.



Figura 24. Fotografía de medio líquido inductor 2.

4.8.2 Curva de crecimiento en medio líquido de Tioglicolato de sodio

En la figura 29 se muestra el crecimiento de la cepa aislada en tioglicolato de sodio; el cual es un medio que se utiliza para determinar el efecto del oxígeno sobre el crecimiento microbiano, puede observarse que a las 12 horas el microorganismo empieza con su fase exponencial hasta las 48 horas, lo cual representa según Varela (2002), que las células se dividan a una velocidad constante determinada por la naturaleza intrínseca de la bacteria y por las condiciones del medio, por lo tanto existe un marcado aumento del

número total de células viables, que puede ser expresado en forma exponencial.

Es decir hay un crecimiento constante de las bacterias, ya que abundan los nutrientes y el microorganismo es capaz de completar el ciclo celular incrementando su número de manera exponencial (2^n), presentando una velocidad específica de crecimiento de 0.0158 DO/h.

Durante esta fase los microorganismos crecen y se multiplican a una velocidad exponencial, gracias al proceso de fisión binaria, ya que en esta etapa del cultivo celular existe abundancia de nutrientes, por lo que los microorganismos son capaces de orientar sus procesos metabólicos principalmente a la multiplicación y crecimiento celular. Su tasa de crecimiento es constante durante este periodo donde el microorganismo dobla su número a intervalos regulares. La población es más uniforme en términos de sus propiedades químicas y fisiológicas durante esta fase: por lo tanto, los cultivos en fase exponencial son usados en estudios bioquímicos y fisiológicos (Prescott, 1996).

En la curva de crecimiento (figura 25) se puede observar que el microorganismo tardó 12 horas en adaptarse a los nutrientes del medio, sin olvidar que no existe oxígeno para su crecimiento, por lo tanto en las primeras 12 horas entra en una fase de latencia y el crecimiento exponencial se da después de las 12 horas de fermentación.

Posteriormente se observa un descenso de la curva, lo que indica según Varela (2002), que el número de bacterias viables disminuye, ocasionado por el agotamiento de nutrientes o la acumulación de desechos tóxicos lo cual la tasa de muerte se incrementa; esto ocurre después de las 48 horas, presentándose una fase denominada fase de muerte y ocurre a las 108 hrs de fermentación

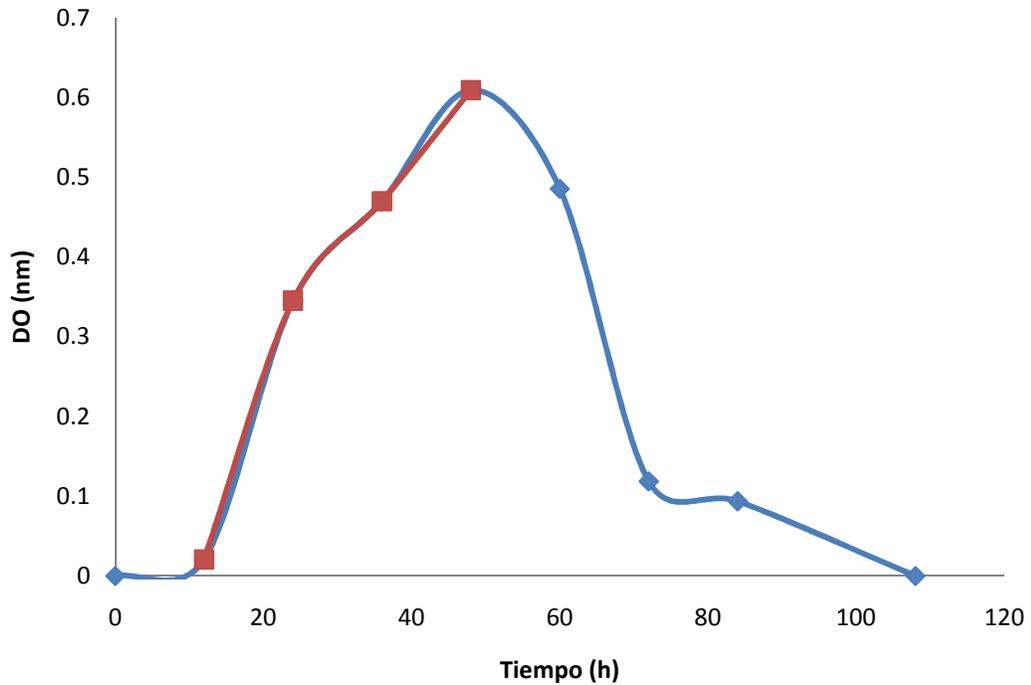


Figura 25. Curva de crecimiento de la cepa VAM 1502-4 en medio de tioglicolato de sodio a 40° C

4.8.3 Curva de crecimiento en medio líquido específico 2

Se diseñó un medio específico para la producción de la enzima xilanas, empleando como única fuente de carbono la xilosa. En la figura 26 se muestra el crecimiento de la cepa aislada VAM 1502-4 en el medio líquido específico; en la cual se puede observar una fase de adaptación o latencia de 12 horas, posterior a la cual comienza la fase de crecimiento exponencial o logarítmico que dura hasta las 60 horas; durante esta fase se determinó una velocidad específica de crecimiento de 0.0008DO/h. Después de 60 horas de cultivo se detecta una disminución drástica en la lectura de absorbancia, para posteriormente estabilizarse permitiendo decir que se trata de una fase estacionaria donde el crecimiento microbiano desacelera debido al agotamiento de nutrientes y acumulación de residuos tóxicos; esta estabilización comienza a decrecer a las 132 horas, lo que podría significar el comienzo de a fase celular; son embargo, es necesario seguir la cinética por un periodo de tiempo mas

largo para poder definirlo ya que no se siguió después de las 156 horas de incubación.

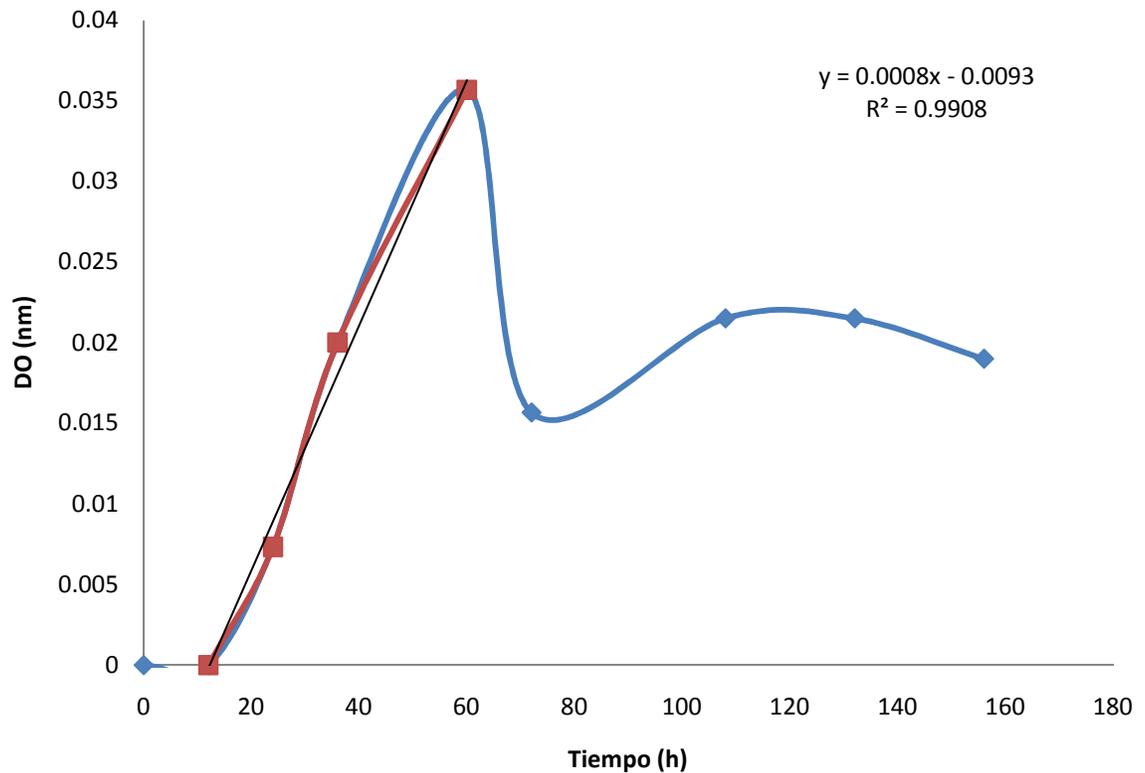


Figura 26. Curva de crecimiento de la cepa 1502-4 en medio líquido específico con xilosa incubados a 40° C

4.8.4 Determinación de proteína extracelular por el método de Biuret

Las enzimas xilanasas son enzimas que hidrolíticas (Rivers, et al., 1988) que participan en el rompimiento de los enlaces glucosídicos β 1-4, presentes en los polisacáridos (Gallardo R. 2007) como la xilosa.

Proteína extracelular se define como la cantidad de enzima xilanasas en mg/mL. En la figura siguiente se puede observar que la mayor cantidad de

enzima xilanasa producida es de 68.2723 mg/mL en un tiempo de fermentación de 60 minutos.

La literatura reporta que dentro de las bacterias productores de xilanasas son: *Cellulomonas avigenea* (Cazemier, et al., 1999), *Bacillus subtilis* (Gallardo R. 2007), *Brevibacillus brevis* y *Geobacillus pallidus* (Quintero, 2007).

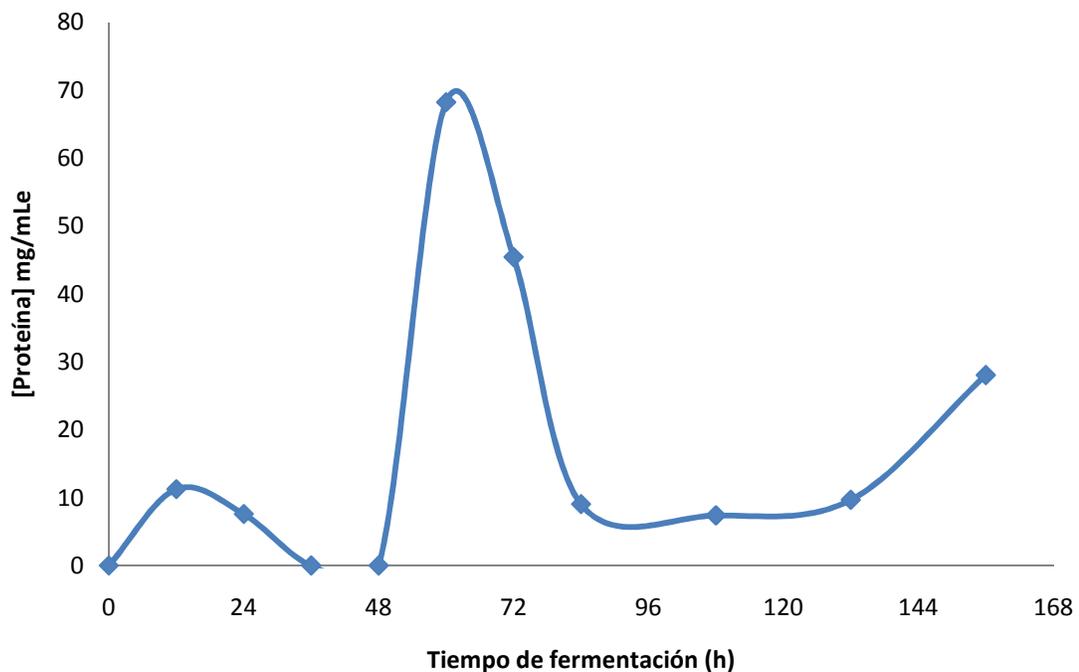


Figura 27. Determinación de proteína extracelular por el método de Biuret de la cepa VAM 1502-4

4.8.5 Determinación de actividad enzimática mediante la técnica de azúcares reductores (Somogy-Nelson)

Badui (2006), explica el funcionamiento de una enzima como catalizador, siendo uno de los más aceptados el desarrollo de Michaelis y Menten en 1913, este modelo aplica a esta investigación considerando, que cuando el reactivo o sustrato (S); en este caso la xilosa, está en contacto con la enzima (E); xilanasa, rápidamente se combinan para formar un complejo enzima sustrato

(ES). Posteriormente, de este complejo se libera tanto el producto; moléculas de xilooligosacaridos (Gallardo, 2007), así como la enzima; xilanasas, dejándola disponible para combinarse con una nueva molécula de sustrato.

Gallardo. R. (2007), señala que las enzimas xilanasas son biocatalizadores por lo tanto incrementan la velocidad de las reacciones químicas al reducir la energía de activación necesaria para transformar los sustratos en productos.

Gong, *et al.*, (1979) describe que la inducción para producir xilanasas se lleva a cabo por el sustrato natural xilosa, mediante un nivel basal; el microorganismo sintetiza y exporta a la superficie celular pequeñas cantidades de enzimas las cuales son las que inician la hidrólisis del sustrato xilosa y producen pequeños oligosacáridos que entran en la célula siendo los verdaderos inductores que inician la transcripción de los genes.

En la siguiente figura se observa la mayor cantidad de enzima xilanasas que actúa sobre el sustrato xilosa (U) hidrolizándolo, en un tiempo de fermentación de 60 horas de fermentación y a los 45 minutos de haber transcurrido la reacción donde se produce una cantidad de 2.1194 U.

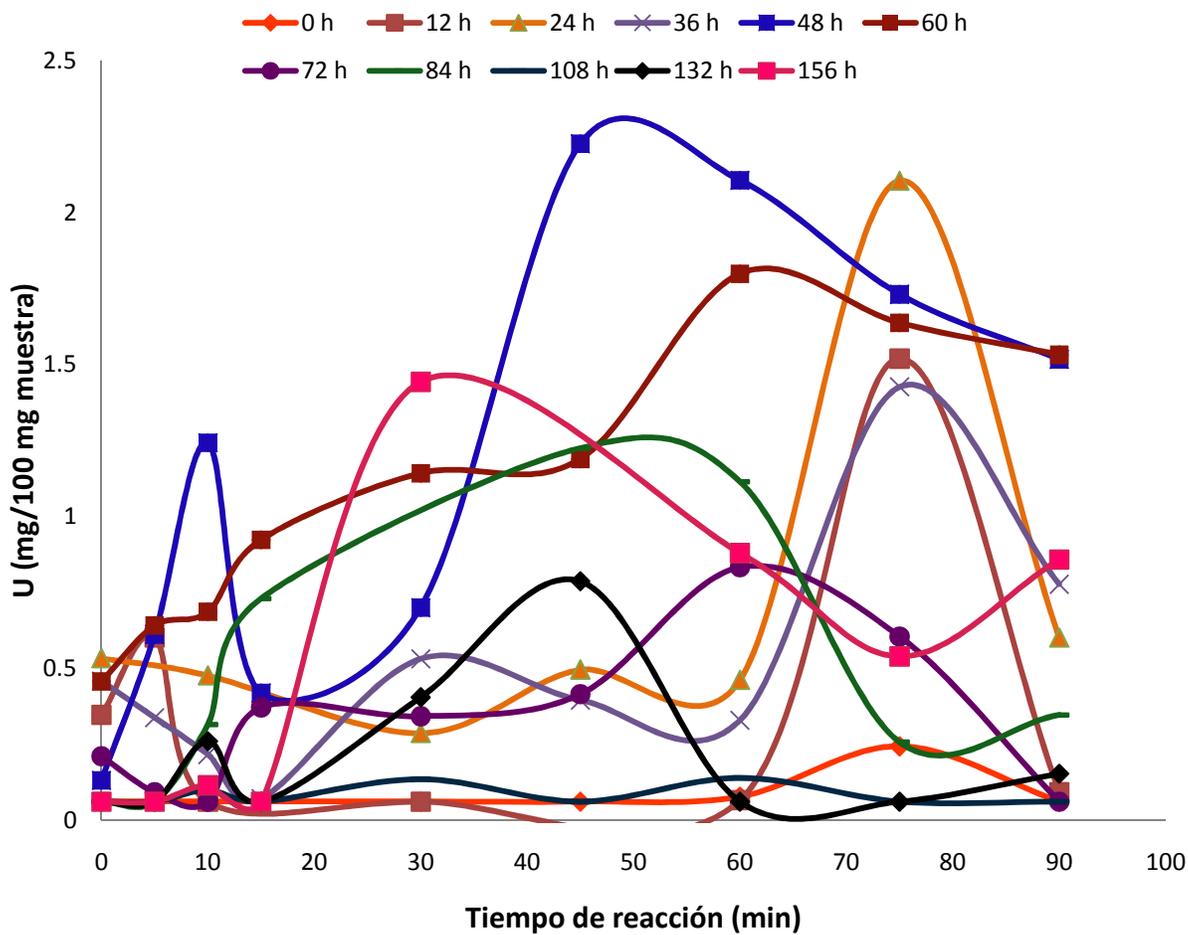


Figura 28. Determinación de la actividad xilanasa de la cepa VAM 1502-4 en medio específico a 40 °C empleando xilosa al 2%.

5. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos de la presente investigación se concluye que:

La utilización de los subproductos de la industria cervecera representa un área de oportunidades para emplearlos en dietas para ganado dándoles valor agregado utilizándolos de manera apropiada.

Fue posible aislar, purificar y conservar un microorganismo productor de enzimas de interés de la industria alimentaria, la cepa VAM 1502-4 con actividad xilanasa.

Se obtuvieron 17 colonias de microorganismos empleando agar nutritivo con características predominantes tales como: bordes enteros, consistencia suave y viscosa.

Se obtuvieron 20 colonias de microorganismos en agar Schaedler predominado colonias de forma circular, superficie lisa, aspecto húmedo y bordes enteros.

Se lograron aislar, purificar y conservar nueve cepas en agar Schaedler las cuales se caracterizaron micro y macroscópicamente. Donde microscópicamente predominaron los bacilos Gram negativos, por lo tanto la adición de masilla en la alimentación de ganado Holstein incrementa la concentración de este tipo de bacterias en el líquido ruminal presente en rumen de bovino.

El metabolismo bioquímico de las 9 cepas aisladas fue reportado como: citrato positivo en la cepas VAM 205-2 a las 48 horas; en agar de hierro y lisina, las cepas VAM 205-1, VAM 205-2 y VAM 1502-7 fueron positivas a las 48 horas

y las cepas VAM 1502-4 y VAM 1502-6 fueron positivas a las 24 horas; en ureasa todas las cepas fueron negativas.

Se aisló, purifico, y conservo a 9 cepas de líquido ruminal de ganado Holstein alimentado con masilla predominando los bacilos Gram negativos.

Se demostró que el microorganismo bacteriano codificado como VAM 1502-4 después de haber realizado la inducción enzimática, produce la enzima xilanasa empleando como fuente de carbono la xilosa.

Se determino que la mayor cantidad de enzima xilanasa producida se obtuvo en un tiempo de fermentación de 60 horas.

6. LITERATURA CITADA

1. Annison. E. F., y Dyfed Lewis. M. A. 1966. El metabolismo en el rumen. Editorial Hispano Americana. México. Pp. 2-6;10-21.
2. Andrighetto, I., Bailoni, L., Cozzi G., Berzaghaghghi, P. 1993 Effects of yeast culture addition on digestion in sheep fed a high concentrate diet. *Small Ruminant Research*. 12:27-34.
3. Arcos-García, J.L., Castrejón, F.A., Mendoza, G.D., Pérez-Gavavilán, E.P. 2000 Effect of two comercial yeast cultures with *Sacharomyces cerevisiae* on ruminal fermentation and digestion in sheep fed sugar cane tops. *Livestock Production Science, Holanda*. 63:153-157.
4. Adams, D.C., Galyean, M.L., Kiesling, H.E., Wallace, J.D., Finker M.D. 1981. Influence of viable yeast culture, sodium bicarbonate and monensin on liquid dilution rate, rumen fermentation and feedlot performance of growing steers and digestibility in lambs. *J. Anim. Sci.* 53(3):780-789.
5. Adesipe, Y.M., Olayiwole, M.B., Fulani, I., J. 1993. Economic analysis of intensive beef production based on different sources of protein rations in Northern Nigeria. *World Review of Animal Production*. 19: 1, 71-77.
6. Bryant, M. P. and Burkey, L. A., Numbers and some predominant groups of bacteria in the rumen of cow fed different rations. *J. Dairy Sci.*, 1953, 36, 218–224.
7. Bryant, M. P. and Small, N., Characteristics of two new genera of anaerobe curved rods isolated from the rumen of cattle. *J. Bacteriol.*, 1956, 72, 22–26.

8. Bryant, M. P., *Ruminococcus*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (ed. Sneath, P. H. A.), Williams and Wilkins, Baltimore, 1986, vol. 2, pp. 1093-1097.
9. Bryant, M. P., Small, N., Bouma, C. and Robinson, I. M., Studies on the composition of the ruminal flora and fauna of young calves. *J. Dairy Sci.*, 1958, 41, 1747-1767.
10. Black, H., Edwards, S., Kay, M. and Thomas, S. 1991. *Distillery By-products as Feeds for livestock*. Aberdeen, The Scottish Agricultural College.
11. Burgstaller, G. 2007. Levadura de cerveza, un ingrediente proteico de alto valor para los animales domésticos. Boletín informativo. Unión de cerveceros Babáros. Escuela Superior General de Kassel, Witzenhausen, Inglaterra.
12. Badui, D. S. 2006. *Química de los alimentos*. 4 Ed. Editorial Pearson. México. Pp. 75-78:301-302:324:330:332.
13. Biely, P. 1993. *Hemicellulose and hemicellulases*. Ed. Coughlan y Hazlewood (Portland Press Research Monograph) Pp. 29.
14. Brownlee. 1956. En referencia del libro. Annison. E. F., y Dyfed Lewis. M. A. 1966. *El metabolismo en el rumen*. Editorial Hispano Americana. México. Pp. 3.
15. Callaway, E.S., Martín, S.A. 1997 Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on ruminal bacteria that utilize lactate and digest cellulose. *J. Dairy Sci.* 80:2035-2044.

16. Crosby, Ma. 1995 Efecto de la dosis de un cultivo de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) en la fermentación y en la digestibilidad ruminal de la fibra en borregas. Tesis Maestría. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Méx.
17. Chahademana, I., Offer, N.W. 1990 The effect of dietary inclusion of yeast culture on digestion in the sheep. *Anim. Prod.* 50:483-489.
18. Calsamiglia, A. Bach y A. Ferret S.. 2004. SUBPRODUCTOS HUMEDOS. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. Madrid, España. 28 pp.
19. Conrad, H. R. and A. L. Moxon. 1979. Transfer of dietary selenium to milk. *J. Dairy Sci.* 62:404.
20. Callaway, E. S., and S. A. Martin. 1997. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* culture on ruminal bacteria that utilize lactate and digest cellulose. *J. Dairy Sci.* 80:2035-2044.
21. Cervecería Cuauhtémoc Moctezuma. 2007. Analisis de laboratorio Kjendhal y perfil de aminoácidos. Cervecería Cuauhtémoc Moctezuma S.A de C.V. Monterrey Nuevo León. Reporte de Laboratorio.
22. Cazemier A. E., Verdoes J. C., van Ooyen A. J., Den Camp H. J. M. 1999. Molecular and biochemical characterization of two xylanase-encoding genes from *Cellulomonas pachnodae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (9): 4099-4107.
23. Dawson, K.A. 1992 Current and future role of yeast culture in animal production: A review of research over the last Seven Years. In: E. Lyons Ed.

Biotechnology in the Feed Industry, Proceedings of Alltech's Ninth Annual Symposium. Nicholasville, KY. USA. P 269-291.

24. Dawson, K.A. 1993 Current and future role of yeast culture in animal production: A Review of Research over the last Seven Years. In: E. Lyons Ed. Biotechnology in the Feed Industry, Proceedings of Alltech's Ninth Annual Symposium. Nicholasville, KY. USA. p. 269-291.
25. Dilley, D. 1988 Getting paid for milk quality: Improving milk composition, Alltech's fourth symposium on Biotechnology in the Feed Industry. Nicholasville, K.Y., USA. p. 45-65.
26. Dawson, K.A., Newman, K.E. 1987 Fermentation in rumen stimulating continuous cultures receiving probiotic supplements. J. Anim. Sci. 66(suppl.1):500.
27. Dawson, K.A.; Newman, K.E., Boling, J.A. 1990 Effects of microbial supplements containing yeast and lactobacilli on roughage-fed ruminant, microbial activities. J. Anim. Sci. 68:3392-3398.
28. Drenan, M.J., Moloney, A.P. 1993 Effect of yeast culture on growth of beef cattle fed on grass silage plus barley- based concentrates. Irish Journal of Agricultural and Food Research. 32(2):125-132.
29. Dahlen, C. R., Zehnder, C. M., Hachmeister, K., Adikema, M. E., Dicostanzo, A., Lamb, G. C., Miller, L. R. And Chester-Jones, H. 2005. Effects of Including Malting Industry Byproducts in Feedlot Diets on Performance and Beef Quality The Professional Animal Scientist. 21:22-29.

30. Dhiman , T. R., Bingham, H. R., Radloff, H. D. 2003. Production Response of Lactating Cows Fed Dried Versus Wet Brewer`s Grain in Diets With Similar Dry Matter Content 1,2. J. Dairy Sel. Vol. 86, Iss. 9; Pp. 2914.
31. Dixon, R., and J. Combellas. 1983. A note on preservation of wet brewers grains. Trop. Anim. Prod. 8:151.
32. De Boer, E., and P.V. Nelson. 1995. Introduction to Food Borne Fungi. Eds. Samson et al. Central bureau voor Schimmecultures, Barn, The Netherlands.
33. Deswysen, A. G., and Vanbelle, M. 1982. Brewer`s yeast and brewer`s grains, fresh or ensiled: a feed of high palatability for sheep. Proceedings of the International Colloquium on Tropical Animal Production for the Benefit of Man. 1982, 370.
34. Elsdén y Phillipson. 1948. En referencia del libro. Annison. E. F., y Dyfed Lewis. M. A. 1966. El metabolismo en el rumen. Editorial Hispano Americana. México. Pp. 28.
35. Flachachachowsky, G., Tiroke, K., Matthey, M. 1993 Influence of yeast
36. (*Saccharomyces cerevisiae* as Yea-Sacc or Levaferm) on in sacco dry matter degradability and ruminal parameters of variously fed small ruminants. Archives of Animal Nutrition. 42(2):159-169.
37. Fallon, R.J., Harle, F. 1987 The effect of yeast culture inclusion in the concentrate diet on calf performance. J. Dairy Sci. 70:2051-2062.
38. Gallowaway, D.L., Goetschch, A.L., W. Sun, Forester Jr, L.A. 1991 Effect of addition of sodium bicarbonate salt, *Aspergillus oryzae* culture extract, niacin, lysine or phenylalanine to ground corn-based supplements on feed

- intake and digestion by Holstein steers consuming Bermuda grass (*Cynodon dactylon*) hay. *Animal Feed Sci. and Technology*. 32:261-273.
39. Gedek, B., Enders, C., Ahrens, F., Roques, C. 1993 The effect of *Saccharomyces cerevisiae* (BIOSAF Sc 47) on ruminal flora and rumen fermentation pattern in dairy cows. *Ann Zootech.* 42:175.
 40. Gómez-Alarcón, R.A., Dudas, C., Huber, J.T. 1987 Effect of *Aspergillus oryzae* (Amaferm) and yeast on feed utilization by Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 70, suppl.1:218.
 41. Greive, D.G. 1979 Feed intake and growth of cattle fed liquid brewer's yeast. *Can. J. Anim. Sci.* 59:89.
 42. García R. S., 2007 Artículo Técnico "Las Levaduras para la Alimentación de los porcinos (*Saccharomyces Cerevisiae*)" Engormix, México.
 43. Grudsky P. Roberto., Arias B. José Luis. 1983. Aspectos generales de la microbiología del rumen. *Monografías de Medicina Veterinaria*, Vol. 5 (2).
 44. Gong. Ch., Tsao. G.T. 1979. *Ann. Rep. Ferment. Process.*3. Pp. 111.
 45. Gallardo Roman Oscar. Octubre 2007. Caracterización de nuevas xilanasas bacterianas. Ingeniería de enzimas con la xilanasas B de *Paenibacillus Barcinonesis*. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona. Barcelona.
 46. Gutierrez. 1955. En referencia del libro. Annison. E. F., y Dyfed Lewis. M. A. 1966. El metabolismo en el rumen. Editorial Hispano Americana. México. Pp. 13 y 14.

47. Hien, N.H., Fleet, G.H. 1983a Variation of (1-3) beta glucanases in *Saccharomyces cerevisiae* during vegetative growth, conjugation and sporulation. *J. of Bacteriol.* 156(3):1214-1220.
48. Hernández, D. R. 1999 Efecto de un cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* en consumo, digestibilidad y variables ruminales en borregos alimentados con pasto ovillo (*Dactylis glomerata*) cosechado a dos intervalos de rebrote. Tesis de maestría en ciencias. Colegio de Posgraduados, Montecillo Méx. 74p.
49. Harrison, G.A.; Hemken, R.W.; Dawawson, K.A.; Harmon, R.J., Barker, K.B. 1988 Influence of addition of yeast culture supplement to diets of lactating cows on ruminal fermentation and microbial populations. *J. Dairy Sci.* 71:2967-2975.
50. Harrison, G.A., Hemken, R.W., Dawawson, K.A., Harmon, R.J., Newman, K.E., Morehead, M.C. 1987 Yeast culture supplements in diets of lactating cows. *J. Dairy Sci.* 70(suppl. 1):218.
51. Hoyos, G., García, L., Medina F. 1987 Effects of feeding viable microbial feed additives on performance of lactating cows in a large dairy herd. *J. Dairy Sci.* 70(suppl. 1):217.
52. Harris, B., Lobo, R. 1988 Feeding yeast culture to lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 70(suppl. 1):276.
53. Hungate, R. E. 1966, *The rumen and its microbes*. 1ra. Edición. Academic Press, New York.
54. Hungate, R. E., *Studies on cellulose fermentation 1. The culture and physiology of an anaerobic cellulose digesting bacterium.* *J. Bacteriol.*, 1944, 48, 499–513.

55. Hungate, R. E., The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. *Bacteriol. Rev.*, 1950, 14, 1–49.
56. Hobson, P. N. and Howard, B. H., Microbial transformations. In *Handbuch der Tierernährung*, Verlag Paul Parey, Hamburg, 1969, vol. I. 130. Allison, M. J., Dawson, K. A., Mayberry, W. R. and Foss, J. G., *Oxalobacter formigenes* gen. nov. sp. nov.: oxalate degrading anaerobes that inhabit gastrointestinal tract. *Arch. Microbiol.*, 1985, 141, 1–7.
57. Hernández Beltrán Vaima. 2007. “La quitina y el quitosán, polisacáridos animales de gran importancia”. *Monografias.com*. 8 de Mayo de 2010. <http://www.monografias.com/trabajos53/quitina-quitosana/quitina-quitosana2.shtml>
58. Hernández II. 2004. “El quitosán un productos bioactivo de diversas aplicaciones”. *Cultivos Tropicales*. Vol. 25 No. 3. Pp. 97
59. Heald y Oxford. 1953 y 1955 . En referencia del libro. Annison. E. F., y Dyfed Lewis. M. A. 1966. *El metabolismo en el rumen*. Editorial Hispano Americana. México. Pp. 13.
60. Johnson, C. O. L. E., Hurber, J. T., and King, K. J. 1997. Storage and utilization of brewers grains in diets for lactating cows. *J. Dairy Sci.* 66:73-79.
61. Kumar, V.K., Sareen, P.K., Singh, S. 1994 Effect of *Saccharomyces cerevisiae* yeast culture supplements on ruminal metabolism in buffalo calves given a high concentrate diet. *Brit Soc. Anim Sci.* 59:209-215.

62. Kamra, D. N. (2005) Rumen microbial ecosystem. *Current science*.89:1-10
Hobson, P. N., *The Rumen Microbial Eco-system*, Elsevier Applied Science, London, 1989
63. Kulkarni. N., Shendye. A., Mala. R. 1999. *FEMS Microbiol. Rev.* 23. Pp. 411.
64. Latham. M. J., Sharpe, E. and Weiss, N., Anaerobic cocci from the bovine alimentary tract, the amino acids of their cell wall peptidoglycans and those of various species of anaerobic *Streptococcus*. *J. Appl. Bacteriol.*, 1979, 47, 209–221.
65. Llamas, Juan Angel. 2008. Concentración de Ácidos Grasos Volátiles en líquido ruminal de toretes Charolais en engorda alimentados con diferentes niveles de macilla y levadura de cerveza. Tesis de licenciatura. UAAAN. Coahuila, México.
66. Mcleod, K.R., Karry, K.J., Dawson, K.A., Mitchchell, Jr., G.E. 1991. Influence of yeast culture and monensin on ruminal metabolic end products and feedlot performance, In:T.P. Lyons Ed. *Biotechnology in the feed Industry*. Alltech's Techical Publications. Nicholasville. KY.USA.
67. Mir, Z., Mir, P.S. 1994 Effect of the addition of live Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) on growth and Carcass Quality of Steers Fed High-Forage or High-Grain Diets and on Feed Digestibility and In Situ Degradability. *J. Anim. Sci.* 72:537-545
68. Mutsvangwa, T., Edwards, I.E., Tops, J.H., Paterson, G.F.M. 1992 The effect of dietary inclusion of yeast culture (Yea-Sacc) on patterns of rumen fermentation, food intake and growth of intensively fed bulls. *Anim. Prod.* 55:35-40.

69. Merchen, N., Hanson, T., and Klopfenstein, T. 1979. Ruminant bypass of brewers dried grains protein. *J. Anim. Sci.* 49:192.
70. Montero, G. 2009. Respuesta productiva de vacas lactantes alimentadas con dietas adicionadas con subproductos de cervecería. Tesis de Maestría. UAAAN. Saltillo, Coahuila, México.
71. Matt. J., et al. 1992. *Progress in Biotechnology.* 7. Pp. 349.
72. Nava Cuéllar, Cuauhtémoc y Díaz Cruz, Antonio. 2001. "Introducción a la Digestión Ruminal". Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM.
73. Nisbet, D. J., and Martin, S.a. 1991. Effect of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on lactate utilization by the ruminal bacterium *Selenomonas ruminantium*. *J. Anim. Sci.* 69:4628.
74. Odenyo, A. A., Mackie, R. I., Stahl, D. A. and White, B. A., The use of 16S rRNA probes to study competition between rumen fibrolytic bacteria: development of probe for *Ruminococcus* species and evidence for bacteriocin production. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1994, 60, 3688–3696.
75. Plata, P.F. Y Mendoza, M.G. 1993 Efectos principales de los probióticos en los rumiantes. Memorias del curso internacional de nutrición de rumiantes. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. 1983b Separation and characterization of six(1-3) beta glucanases from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. of Bacteriology.* 156,3:1204-1213.
76. Plata, P.F., Mendoza, M.G., Barcena-Gama, González, M.S. 1994 Effect of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on neutral detergent fiber digestion in steer fed oat straw based diets. *Anim. Feed Sci. and Technol.*49:203-210.

77. Peyroche, A., Courbeyrette, R., Rambourg, A. and Jackson, C. L. 2001. The ARF exchange factors Gea1p and Gea2p regulate Golgi structure and function in yeast *Journal of Cell Science* 114, 2241-2253.
78. Ponce N. T., y Pérez A. O. "Celulosas y Xilansas". XXX Aniversario de Biotecnología y Bioingeniería Cinvestav, Sep-Oct 2002. Avance y Perspectiva Vol.21.México. Pp. 273-277.
79. Prado, B., Huerta, O., Rodríguez, S. y Saucedo, C. 1999. Colección Tópicos en Biotecnología; Avances en Purificación y Aplicación de Enzimas en Biotecnología. Editorial Casa Abierta al Tiempo. Universidad Autónoma Metropolitana. Pp. 15-17: 25
80. Quintero, D.; Velasco, Z.; Valbuena, O.; Contrera, I. 2007. Identificación de actividad total de xilanasas en bacterias termófilas del centro termal las trincheras. Universidad de Carabobo.
81. Rodríguez, A. y Valencia E. 2008. Microbiología Ruminal. Ruminantia. Vol: 3, No 1.
82. Rose, A.H. 1987a Yeast culture a microorganism for all especies a theoretical look at its mode of action. Proceedings. Alltech's third annual symposium. Biotechnology in the Feed Industry. Nicholasville, kentuki. U.S.A.
83. Robinson, P.H., Garrett, J.E. 1999 Effect of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) On adaptation of cows to postpartum diets and on lactational performance. *J. Anim. Sci.* 77:988-999.

84. Reaño, A., Melendez, A., Marquez, J., and Combellas, J. 1992. Influence of fish meal and dehydrated brewers grains on intake, live-weight gain and rumen digestion of growing cattle consuming fresh cut forage. Venezuela. *Livestock Research for Rural Development*. 4(2):67.
85. Rounds, W., and Klopfenstein, T. 1975. Brewers dried grains in ruminant rations. *J. Anim. Sci.* 41:415.(Absrr.).
86. Rodriguez, J. y Chacón, C. 1997. Evaluación del consumo y la calidad de la leche en vacas mestizas de mediana producción a diferentes niveles de suplementación con nepe húmedo de cervecería. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* 5(Supl. 1): 154-156.
87. Rivers, D. B., Emert. H. G. 1998. *Biol. Wastes*.26.Pp. 199.
88. Smith, T. 2003. Wet brewers grains in total mixed rations. Agriculture Technician Institute. St. John's, N. L.
89. Semptey, F., Devisschcher, A. 1991 A french approach to optimizing rumen utilization of forage. In: T. P. Lyons Eds. *Biotechnology in the Feed Industry*. Alltech's Technical Publications. Nicholasville. KY.USA.
90. Sunna A., Antranikian G. 1997. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*, 17:425-430
91. Sugden. 1953. En referencia del libro. Annison. E. F., y Dyfed Lewis. M. A. 1966. *El metabolismo en el rumen*. Editorial Hispano Americana. México. Pp. 14.

92. Teh, T.H., Sahahlu, T., Escobabar, E.N., Cushawhawhaw, J.L. 1987 Effect of live yeast and sodium bicarbonate on lactating goats. *J. Dairy Sci.* 70. Suppl.1: 200. (Abstr.).
93. Varela, G. Grotiuz, 2002. Temas de bacteriología y virología médica. Fisiología y metabolismo bacteriano. Pp. 43-57
94. <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/FisiologiayMetabolismoBacteriano.pdf>
(Consultado 10 Enero 2010)
95. Williams, P.E.V. 1989 The mode of action of yeast culture ruminants diets: review of the effect on rumen fermentation patterns. In: T.P. Lyons Eds. Alltech's 5th Annual symposium on Biotechnology in the Feed Industry. Nicholasville. K.Y.
96. Williams, A.G. Coleman, G.S. 1988 The rumen protozoa. In: P.N. Hobson (Ed). *The Rumen Microbial Ecosystem*. Elsevier Applied Sci. London and New York. pp 77-128.
97. Wiedmeier R.D., Arambel, M.J., Welters, J.L. 1987 Effect of yeast culture and *Aspergillus oryzae* fermentation extract on ruminal characteristics and nutrient digestibility. *J. Dairy Sci.* 70: 2063 –2068.
98. Wadhwa, D. R. 1995. Clinico-biochemical therapeutic studies on brewer's grains toxicity in buffaloes, *Indian J. Vet. Med.* 15:87-89.
99. Waller, J., T. Klopfenstein, and Poos, M. 1980. Distillers feeds as protein sources for growing ruminants. *J. Anim. Sci.* 51:1154.
100. Wattiaux. M. A. y Armentano L. E. "Metabolismo de Carbohidratos en Vacas Lecheras". 2008. Pp. 9-12;17-20.

ANEXOS

Anexo 1.TINCIÓN DE GRAM

La tinción de Gram es un tipo de tinción diferencial empleado en microbiología para la visualización de bacterias. Para ello se tomó una asada del cultivo y se suspendió en un portaobjetos que poseía una gota de agua destilada, se homogenizó la suspensión de bacterias y se extendió un poco en el portaobjetos; posteriormente se fijó la muestra con calor. Una vez fijada y seca la preparación, se cubrió por completo la superficie, donde se encontraba la muestra, con cristal violeta durante 1 minuto y se enjuagó suavemente al chorro del agua. Todas las células se tiñen de color azul-violeta. Se añadió la solución de lugol (I2IK) y se dejó reaccionar por 1 minuto; se enjuagó suavemente y se decoloró con una solución de alcohol-acetona (50/50 v/v) por unos cuantos segundos para después enjuagarse de inmediato. Las células Gram positivas siguen de color azul-violeta, mientras que las Gram negativas se decoloran. Finalmente se cubrió la superficie de la preparación con una solución de safranina y se dejó actuar por 1 minuto para finalmente enjuagar con agua destilada. Las células Gram positivas (G+) se vuelven azul-violeta y las Gram negativas (G-) rosas o rojas.

Se dejó secar la preparación por completo para después observar los microorganismos teñidos, empleando un microscopio óptico (WESTOVER) a 100X con aceite de inmersión.

Anexo 2. TECNICA DE SOMOGYI-NELSON

*Reactivo 1 (Somogyi):

Solución A: 25 g de carbonato de sodio anhidrido (Na_2CO_3), 25 g de tartrato de sodio y potasio tetrahidratado ($\text{KNa}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), 20 g de bicarbonato de sodio (NaHCO_3) y 200 g de sulfato de sodio (Na_2SO_4) se disolvieron en agua destilada y se aforó a 1 litro.

Solución B: en 200 mL de agua destilada se agregaron 4 gotas de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) disolver 30 g de sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$).

El reactivo 1 se preparó mezclando 1 mL de solución en 25 mL de solución A.

*Reactivo 2 (Nelson):

Solución A: en 450 mL de agua destilada se disolvió 21 mL de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) y 25 g de molibdato de amonio ($(\text{CNH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$).

Solución B: 3 g de arsenato de sodio heptahidratado ($\text{NaHAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) se disolvieron en 25 mL de agua destilada.

El reactivo 2 se preparó mezclando lentamente la solución 1 y 2 en agitación y se aforaron a 500 mL. Posteriormente se calentó a 55°C durante 30 min.

