

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”**

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



Aislamiento, caracterización y estudio de la microflora eucariotas del líquido ruminal del ganado Holstein, alimentado con dietas enriquecidas con productos de la industria cervecera (masilla, y levadura) con aplicaciones biotecnológicas.

Por:

ANA KARINA PEREZ GUZMAN

Tesis

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

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Febrero 2011

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

Aislamiento, caracterización y estudio de la microflora eucariotas del líquido ruminal del ganado Holstein, alimentado con dietas enriquecidas con productos de la industria cervecera (masilla y levadura) con aplicaciones biotecnológicas.

Presentado por:

ANA KARINA PÉREZ GUZMÁN

TESIS

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

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

El presente trabajo se ha dirigido por el presente comité:

Presidente

Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez

Vocal

Dr. Jesús M. Fuentes Rodríguez

Vocal

Lic. Laura O. Fuentes Lara

Vocal

M.C. Alberto Guerrero Rodríguez

Universidad Autónoma Agraria /
"ANTONIO NARRO"



COORDINACIÓN DE
CIENCIA ANIMAL

Dr. Ramiro López Trujillo

COORDINADOR DE CIENCIA ANIMAL

Febrero 2011

AGRADECIMIENTOS

A Dios por haberme dado la vida, por estar siempre a mi lado y darme fuerzas para seguir adelante a pesar de los problemas, siempre me guías con tu mano y sabiduría.

A mi Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, “Alma Terra Mater” por haber aceptado que formara parte de ella, y realizar mis estudios profesionales.

A la Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez, por su apreciable cooperación para concluir este proyecto y por haberme brindado su apoyo incondicional.

Al M.C Alberto Guerrero, por haberme brindado su apoyo incondicional para poder terminar este proyecto.

A la Lic. Laura O. Fuentes Lara y Dr. Jesús M. Fuentes Rodríguez, por su confianza por aceptar revisar este trabajo.

A la LCN. Laura Maricela Lara López, por haberme brindado su apoyo incondicional y su paciencia a lo largo de la elaboración de esta tesis.

A mis amigos. Nora, Elena, Cyntia, Benito, Eriberto, Yorfe, Gaby, Gabriel y Ulda por su sincera amistad y apoyo incondicional y así como a todo mis compañeros de generación.

DEDICATORIAS

A Dios: Por ser mi guía y estar siempre conmigo.

Con Amor y admiración a mis padres:

Sr. Juan Pérez Ballinas

Sra. Minerva Guzmán Juárez

Por inculcarme los valores y principios que me han permitido salir adelante, por estar siempre pendiente de mí, por confiar en mí y apoyarme siempre.

A mi hermana:

Marisol Pérez Guzmán que ha sido un gran apoyo incondicional en todo momento por su amor y cariño.

A mi pequeño sobrino:

Elías Abraham Pérez Guzmán por ser la alegría de mi familia.

A mis amigos:

A todos mis amigos por darme siempre ánimos por compartir buenos y malos momentos.

INDICE

	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Antecedentes	1
1.2 Justificación	2
1.3 Hipótesis	3
1.4 Objetivo General	3
1.4.1 Objetivo Especifico	3
II REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1 Rumen	4
2.1.1 Ambiente ruminal	5
2.1.2 Población microbiana	5
2.1.3 Temperatura y Ph	6
2.1.4 Anaerobiosis	6
2.2 Microorganismos ruminales	7
2.2.1 Bacterias	7
2.2.2 Protozoarios	8
2.2.3 Hongos y Levaduras	9
2.3 Metabolismo ruminal	11
2.3.1 Carbohidratos	12
2.3.2 Proteínas	14
2.4 Alimentación de rumiantes con subproductos agroindustriales	15
2.4.1 Industria cervecera	16
2.4.1.1 Masilla	16
2.4.1.2 Características nutricionales	16
2.4.1.3 Levadura	17
2.4.1.3.1 Descripción mitológica	18
2.5 Enzimas de interés industrial	20
2.5.1 Generalidades de enzimas	20
2.5.2 Aplicación a la industria alimentaria	21
2.5.3 Clasificación de proteasa dependiendo de su sitio activo	22
III MATERIALES Y METODOS	24
3.1 Localización de área de estudio	24
3.2 Acondicionamiento de ganado Holstein y obtención de líquido ruminal	24

3.3	Aislamiento de microorganismos en PDA	25
3.4	Caracterización macro y microscópicamente de las especies fúngicas aisladas en PDA	25
3.5	Purificación de los microorganismos aislados	26
3.6	Producción de proteasa	27
3.6.1	Ensayo de screening	27
3.6.2	Medio pontecorvo	27
3.6.3	Selección del material biológico	28
3.6.4	Curva de crecimiento en medio líquido para la producción de la enzima proteasa	28
3.6.5	Turbimetria	29
3.6.6	Determinación de proteína extracelular (enzima) por el uso de Biuret	30
3.6.6.1	Método de Biuret	30
3.7	Cinética enzimática	30
IV	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
4.2	Acondicionamiento del ganado Holstein y obtención del líquido ruminal	32
4.3	Aislamiento de microorganismos en PDA	33
4.4	Caracterización macro y microscópicamente de las especies fúngicas aisladas en PDA	35
4.5	Purificación de los microorganismos aislados	39
4.6	Producción de proteasa	41
4.6.1	Curva de crecimiento para el medio líquido para la producción de la enzima proteasa	42
4.6.2	Determinación de proteína extra celular (enzima) por el método de Biuret	43
4.7	Cinética enzimática	44
V	CONCLUSIONES	46
VI	LITERATURA CITADA	47

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Perfil nutricional de la masilla	19
Cuadro 2. Clasificación de proteasas	23
Cuadro 3. Componentes del medio pontecorvo	29
Cuadro 4. Solución de oligoelementos para medio pontecorvo	30
Cuadro 4. Preparación de muestras para cuantificación de proteínas totales por el método de Biuret	33

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1.	Vías del metabolismo de los carbohidratos en el rumen	15
Figura 2.	Crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en agar glucosado de Sabouraud durante 2 días a 24 °C.	21
Figura 3.	Levaduras de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Microscopía de contraste de fases, x 580 aumentos.	21
Figura 4.	Fotografía de obtención de líquido ruminal mediante bomba nasogástrica	35
Figura 5.	Muestra la fotografía de la morfología macroscópica de cepas de levaduras del líquido ruminal de bovinos sembradas en agar papa dextrosa (PDA).	36
Figura 6.	Fotografía de las características microscópicas de colonia codificada como VAM	38
Figura 7.	Fotografía de las características microscópicas de colonia codificada como VAM	39
Figura 8.	Fotografía de las características microscópicas de colonia codificada como 2704-1, teñidas con azul de	40
Figura 9.	Fotografía de las características microscópicas de colonia codificada como 2704-1, teñidas con azul de	40
Figura 10.	cepas puras de levaduras de líquido ruminal, A) 2704-1, B) 2704-2, C) 1004-1,	41
Figura 11.	cepas aisladas en tubos	42
Figura 12.	Fotografía de levaduras para la producción de una proteasa	43
Figura 13.	Curva de crecimiento de la cepa VAM 205-1 en medio pontecorvo a 20- 25°C	45
Figura 14.	Cuantificación de proteína extracelular por el método de Biuret	46
Figura 15.	Enzimática a diferentes tiempos de fermentación de la cepa 2 de VLM # 205.	47

RESUMEN

El rumen es considerado una gran cámara de fermentación que proporciona el medio conveniente para el cultivo continuo de la población microbiana. La ingestión de alimento en forma casi continua y las contracciones de las paredes junto con la absorción o pasaje de los metabolitos bacterianos constituyen un continuo reabastecimiento de substratos que permite el crecimiento de una densa y variada población microbiológica.

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

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

Se purificaron y conservaron 4 cepas en PDA a las cuales se les realizaron pruebas para la producción de una enzima proteasa.

Se seleccionó una cepa pura para el estudio enzimático. Se monitoreó la curva de crecimiento microbiano en medio líquido pontecorvo, la cual presentó una velocidad específica de crecimiento de 0.197 DO/h empleando un medio específico usando leche descremada y deslactosada (caseína) como única fuente de carbono

La determinación de proteína extracelular mediante el método de Biuret presentó su máximo valor a las 96 h de fermentación con una V_0 de 0.13 mg/mL.h de proteína.

La curva de crecimiento en medio líquido específico mostró una fase exponencial a las 96 h con un máximo de actividad enzimática de 0.743U

Palabras clave: *microorganismos ruminales, levaduras y actividad proteasa.*

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

El rumiante es una especie de mamífero herbívoro de vital importancia, su dieta, principalmente constituida por forrajes, proporciona nutrientes especialmente celulosa, hemicelulosa y pectinas, sin embargo, estos compuestos no son tan fáciles de degradar para estos animales (Annison y Lewis, 1966).

Existe un grupo de microorganismos que son los encargados de convertir este tipo de moléculas complejas en otras más simples para favorecer la digestión de los animales y así puedan ser utilizadas como fuentes de energía (Annison y Lewis, 1966). La fermentación de los rumiantes se lleva a cabo en una interacción entre la dieta, la población microbiana y el propio animal (García *et al.*, 2007).

Es por ello que en el presente estudio se da a conocer de manera específicamente en el campo de investigación, para la cual es necesario, una serie de elementos que la componen entre los que destacan el estudio de la microflora de microorganismos eucariotas de líquido ruminal del ganado Holstein. La concentración de las poblaciones microbianas que viven en el rumen en anaerobiosis y aerobiosis, específicamente para bacterias, protozoarios y hongos son de 10^{10} células/mL, 10^6 células/mL y 10^4 células/mL respectivamente. Para permitir que los organismos de crecimiento lento; tales, como los hongos y protozoarios ruminales puedan reproducirse se necesita permanencia prolongada del alimento dentro del rumen de 48 a 72 hrs y sostener así la concentración de las poblaciones microbianas. Los tiempos de multiplicación varían de 5-14 hrs para los protozoarios y de 24-30 hrs para los hongos (Annison y Lewis, 1966).

La alimentación del ganado lechero puede realizarse adicionando subproductos de la industria cervecera como la masilla y levadura las cuales son capaces de modificar la flora microbiana del rumen.

1.2 Justificación

La importancia de la microflora de los rumiantes, en particular la de las bacterias, hongos y protozoarios ha sido valorada en las últimas décadas. En este contexto, la presente investigación representa la obtención de información relevante y de gran beneficio para la elaboración de nuevas enzimas de interés industrial. Estas tienen un amplio campo de estudio el cual aún no ha sido explorado teniendo como resultados enzimas de más bajo costo y de origen microbiano.

En el rumen existen cepas microbianas que son capaces de producir enzimas de interés industrial y que han sido insuficientemente estudiadas. Estos microorganismos dependen de la dieta del rumiante (Annison y Lewis, 1966). La relación de su incompleto o excesivo aporte a la fermentación explica parte de este interés, por lo que se ha decidido estudiar el método de suplementación.

La alimentación del ganado lechero puede realizarse adicionando subproductos de la industria cervecera como la masilla y levadura las cuales son capaces de modificar la flora microbiana del rumen.

Es por ello que en el presente estudio se da a conocer de manera específicamente en el campo de investigación, para la cual es necesario, una serie de elementos que la componen entre los que destacan el estudio de la microflora de microorganismos eucariotas de líquido ruminal del ganado Holstein.

1.3 Hipótesis

La adición de masilla y levadura de cerveza en la ración de vacas Holstein genera especificidad en las principales características morfológicas de la microflora eucariota siendo útiles para nuevos estudios biotecnológicos.

1.4 Objetivo General

Aislar e identificar macroscópico, microscópico y bioquímicamente microorganismos eucariotas del líquido ruminal del ganado Holstein, alimentado con dietas enriquecidas con productos de la industria cervecera (masilla, y levadura) con aplicaciones biotecnológicas.

1.4.1 Objetivos Específicos

- Aislar los microorganismos del líquido ruminal en (agar papa dextrosa) PDA.
- Caracterizar macroscópica y microscópicamente las especies microbianas analizadas.
- Purificar y mantener las cepas obtenidas.
- Identificar el metabolismo de las cepas obtenidas.
- Seleccionar un microorganismo para la producción de una enzima de interés industrial mediante el diseño de un medio de cultivo inductor.
- Determinar y cuantificar la actividad enzimática mediante técnicas espectrofotométricas.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Rumen

Los rumiantes constan de un estómago con cuatro compartimentos: el rumen, el retículo, el omaso y el abomaso. El rumen es un pre-estomago en donde los alimentos consumidos por los animales rumiantes son fermentados para poder ser transformados en energía. El rumen representa un 80% del total del estomago la capacidad del rumen en los adultos varían mucho con la edad y el tamaño oscila entre cien a trescientos litros en los bovinos. 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 rumen es considerado una gran cámara de fermentación que proporciona el medio conveniente para el cultivo continuo de la población microbiana. La ingestión de alimento en forma casi continua y las contracciones de las paredes junto con la absorción o pasaje de los metabolitos bacterianos constituyen un continuo reabastecimiento de substratos que permite el crecimiento de una densa y variada población microbiana (Annison y Lewis, 1966).

Los bovinos secretan grandes cantidades de saliva alcalina reguladora de pH no solamente como ayuda para la masticación y deglución, sino atendiendo la necesidad de mantener condiciones físico-químicas en el contenido o en las paredes del rumen – retículo (Annison y Lewis, 1966).

Se calcula que el 10% del contenido ruminal está constituido por protoplasma microbiano. La mayoría de los microorganismos del rumen son bacterias y protozoos ciliados. Hay además levaduras y flagelados particularmente en animales jóvenes. El único elemento común a todos los

organismos presentes es que son anaerobios o anaerobios facultativos (Annison y Lewis, 1966).

2.1.1 Ambiente ruminal

El rumen es un órgano donde se almacena parcialmente forrajes y cereales entre otros alimentos conocidos por la vaca; este material mezclado con otro residuos no digeridos es mantenido a una temperatura y presión osmótica constante. El pH se mantiene entre 6 y 7 por una acción tipo buffer, atribuida principalmente a la gran secreción de saliva que contiene grandes proporciones de bicarbonato de sodio, potasio y urea y en segundo lugar por la absorción de ácidos a través de la pared ruminal (Escobosa, 2010).

También provee un ambiente apropiado, con un suministro generoso de alimentos para el crecimiento y reproducción de una gran cantidad de microorganismos (protozoos, hongos, bacterias). Mientras que crecen, los microorganismos ruminales producen aminoácidos, fundamentales para las proteínas. Muchas de las células microbianas formadas en este órgano son digeridas en el conducto gastrointestinal y constituyen la principal fuente de proteínas y vitaminas del animal (Ørskov, 1992).

2.1.2 Población microbiana

La población microbiana en el rumen es principalmente anaeróbica compuesto por, bacterias, protozoarios ciliados y hongos en menor cantidad. El número relativo de las diferentes especies dependerá de la composición y estructura de la dieta, así como de las múltiples interacciones entre ellos (Ørskov, 1992).

Las bacterias predominantes que se aíslan del ciego incluyen varios géneros encontrados en el rumen. También son predominantes los bacilos Gram negativos, como *Bacteroides*, *Butyrivibrio* y *Fusobacterium*. También se

encuentran cocos Gram positivos como *Streptococcus bovis* y *S. faecalis* y algunas especies de *Selenomonas*. (Hungate, 1966)

2.1.3 Temperatura y pH

El pH es uno de los factores más variables del ambiente ruminal, es afectado por la naturaleza del alimento, forma física del mismo, frecuencia de la ingesta, etc. (Calsamiglia y Castillejos 2005). En condiciones de pastoreo, los cambios de pH son muy marcados, y están asociados a la ingesta. Varias experiencias han demostrado que la efectividad del crecimiento de las bacterias predominantes en el rumen varía considerablemente con el pH. Las bacterias celulolíticas y las metanógenas son afectadas intensamente una vez que el pH del rumen desciende por debajo de 6.0. También son afectados los protozoos del rumen por el descenso de pH determinado por un consumo excesivo de concentrados en la dieta. Si se mantiene el pH en 5.5 puede aparecer en el rumen un elevado número de protozoos (Calsamiglia y Castillejos 2005).

La temperatura del rumen se sostiene de 38 a 42 °C por un mecanismo regulador de temperatura propio del animal (Annison y Lewis, 1966).

2.1.4 Anaerobiosis

Los microorganismos que habitan el rumen viven y se reproducen en condiciones de ausencia de oxígeno. El oxígeno que entra por el proceso de deglución y rumia es rápidamente eliminado por los gases dióxido de carbono y metano, que genera el proceso de fermentación en cantidades importantes. También existen bacterias encargadas de eliminar el oxígeno, permitiendo que el rumen este siempre en anaerobiosis (Calsamiglia y Castillejos 2005).

El proceso de fermentación aeróbica en el rumen convierte los substratos (principalmente carbohidratos y proteínas) en proteína microbiana y otros productos finales de la fermentación (ácidos grasos volátiles,

CO₂, metanopéptidos y aminoácidos) los cuales son metabolizados por los rumiantes (Rodríguez, 2003).

2.2 Microorganismos ruminales

En el rumen existen principalmente bacterias, protozoarios ciliados y hongos anaeróbicos obligados (estrictos y aerotolerantes) que son los encargados del proceso de fermentación para simplificar los nutrientes a moléculas sencillas y puedan ser absorbidas para las paredes intestinales del rumen (Rodríguez, 2003).

2.2.1 Bacterias

El número de bacterias es aproximadamente de 10^{10} por gramo de contenido o de fluido. Solo del 1 al 2 % de los microorganismos son aeróbicos, los microorganismos restantes son estrictamente anaeróbicos. A continuación se citan los grupos de bacterias dependiendo de las funciones que éstas tiene en el proceso de fermentación.

Digestoras de celulosa: la celulosa es biodegradada por microorganismos tales como *Bacteroides succinogenes*, *Butivibrio fibria sovens* que existen hasta en un 15% de la flora bacteriana estos microorganismos atacan a las partículas de las plantas.

Digestoras de hemicelulosa: una gran cantidad de forraje consumido por el rumiante contiene hemicelulosa. Las bacterias que digieren celulosa también digiere hemicelulosa, tal es el caso de *Riminococcus albus*, *Bacteroides ruminocola*.

Digestoras de almidones. en el rumen, bacterias como *Streptococcus bovis* y *Bacteroide amylophilus* producen enzimas aminolíticas que desdoblan los almidones, dando productos intermediarios como los lactatos.

Fermentadoras de azúcar: todas las bacterias que ingieren polisacáridos también utilizan disacáridos o monosacáridos; en general los heno de leguminosas contienen grandes cantidades de azúcares.

- Bacterias que utilizan ácidos: los lactatos, succinatos y formatos son descompuestos por varias especies: *Vibrio succinogenes*, *Peptostreptococcus efaceni* de esta manera los ácidos no se acumulan en el rumen.
- Bacterias metanogénicas: estas bacterias aceptan el hidrogeno con el bióxido de carbono y producen metano. El metano es perdido por el animal.
- Bacterias proteolíticas: la mayoría de estas cepas son aeróbicas facultativos de genero *Bacillus*, como el *B. beliceniformis*, algunos *Clostridium* y bacilos gran negativos.
- Bacterias lipolíticas: estas bacterias hidrolizan las grasas en glicerol y ácidos grasos. Durante el proceso de fermentación que toma lugar en el rumen.

Este tipo de microorganismos cuentan con la capacidad para hidrolizar las proteínas de las dietas hasta convertirlas en proteínas microbianas (Escobosa, 2010).

2.2.2 Protozoarios

Este es un grupo de microorganismo que requieren un medio anaeróbico y es altamente especializado la mayoría son ciliados y algunas especies

flagelados, son sensibles a un pH menos de 5.5 y pueden ser cultivadas bajo condiciones anaeróbicas donde podrán mantener su actividad fuera del rumen por 4 o 6 h. En el contenido ruminal el número de protozoarios varía entre 10^3 a 10^6 por ml del líquido ruminal siendo mayor el número a medida que la dieta es más abundante (Escobosa, 2010).

El establecimiento de la población de protozoos ciliados depende de la presencia de otros animales que ya tengan protozoos en su rumen. Se sabe que los protozoos son sumamente sensibles a un pH bajo. Con el consumo de alimentos con menor capacidad para fermentar (ej. forrajes) y el aumento de la secreción de saliva, el pH del rumen se torna más alcalino y entonces pueden establecerse los protozoos. Los niveles correspondientes a animales adultos se alcanzan entre la 5 y 9 semanas de edad dependiendo de la dieta (Rodríguez, 2003).

Todos los protozoos almacenan grandes cantidades de polisacáridos tipo almidón de reserva, que utilizan cuando se agotan los suministros exógenos de energía. Los protozoos del rumen son proteolíticos y parecen disponer de una cistein-proteasa junto con elevada actividad aminopeptidasa y una actividad limitada desaminasa. Aminoácidos y amoníaco son excretados como productos finales de su digestión de proteína (Forsberg *et al.*, 1984).

Los protozoos ingieren activamente bacterias como fuente de proteína y compiten eficazmente por sustratos. Excepto por tamaño, los protozoos no muestran preferencias por alguna determinada especie de bacterias del rumen, e ingieren también especies que no son propias del rumen (Escobosa, 2010).

2.2.3 Hongos y levaduras

La población de los hongos en el rumen es de 10, 000-1,000,000 de células por mL, los hongos filamentosos se desarrollan mejor en condiciones de temperatura media a baja (Wallace, 1991).

El grado de colonización de los hongos ruminales se relaciona con el tipo y calidad de la dieta sobre la cual crecen (Grenet *et al.*, 1989). Los hongos del rumen son particularmente abundantes en animales alimentados con dietas altas en fibra y su número aumenta en alimentos tales como pajas, forrajes de baja calidad y residuos de cosecha.

Los hongos son células eucariotas que presentan las siguientes características.

- Membranas citoplasmática que contienen quitina, formada por N-acetil glucosamina y otros polisacáridos.
- Citoplasmas que contienen mitocondrias y retículo endoplasmático.
- Membrana nuclear.
- Cromosomas: Son células heterótrofas es decir, se nutren de compuestos orgánicos. Presentan pared rígida y su reproducción puede ser sexuada o asexual.

Guadix (2006) establece una clasificación para los hongos agrupándolos en:

- Unicelulares: como las levaduras.
- Pluricelulares: como los mohos, formadas por estructura tubulares denominadas hifas, muy ramificadas y rodeadas de pared rígida.

La formación de las hifas se realiza a partir de una espora que da lugar a un tubo germinal y este a un tubo tubular. La ramificación de las hifas forma una masa algodonosa y entrelazada de hifas secundarias denominadas micelio. La parte del micelio que penetra en el sustrato se denomina micelio vegetativo y la parte libre micelio aéreo reproductor (Guadix, 2006).

Las esporas presentan dos membranas: una interna denominada endoespora y otra externa o exoespora, la estructura, formación y pigmentación

ayudan mucho a la identificación de los hongos: Algunos hongos se originan a partir de la separación de parte del micelio, ocurriendo posteriormente la gemación. Es el caso de las levaduras. Otros hongos son dimórficos, es decir pueden aparecer en forma de levadura o en forma de micelial dependiendo de las condiciones donde se desarrolle. (Guadix, 2006)

La presencia de los hongos en el rumen fue descubierta en los años 70 dice Orskov (1992). Anteriormente la fase móvil o zoosporo era confundida con un protozoo flagelado y el esporangio, adherida a las partículas de fibra no era identificada al estudiar el líquido ruminal (Ørskov, 1992).

Los géneros más frecuentes en el rumen son *Neocallimastix*, *Caecomyces*, *Pyromyces* *Orpinomyces* (Van Soest, 1982).

Los hongos no predominan en el rumen debido a su lento tiempo de reproducción en comparación con las bacterias, 6-9 vs 0.5-3.5 h. Existen evidencias de la presencia de hongos en el duodeno, sin embargo esta no ha sido aún confirmada (Varga y Kolver, 1997). Los hongos presentes en el rumen tienen la capacidad de presentar actividad celulasa y hemicelulosa, pero no pueden degradar la pectina y el ácido poligalacturónico (Fonty y Joblin, 1991), ni pueden degradar la lignina, los rizoides penetran y facilitan la degradación de la pared celular (Van Soest, 1982).

Los hongos son capaces de penetrar la cutina y la lignina proporcionando nuevos sitios para la adhesión bacteriana de ahí su importancia en la degradación de las fibras. Los hongos como *Neocallimastix frontalis* tiene alta actividad proteolítica extracelular del tipo metalo proteasa (Wallace, 1991).

2.3 Metabolismo ruminal

El metabolismo microbiano ruminal se regula fundamentalmente por la cantidad y la velocidad de fermentación de los hidratos de carbono, que a su vez depende de sus características físicas y químicas. La fermentación de los hidratos de carbono proporciona esqueletos carbonados y energía en forma de ATP para el crecimiento microbiano (Stern, *et al*, 1994).

2.3.1 Carbohidratos

Los hidratos de carbonos estructurales o fibrosos se definen genéricamente como aquellos que se encuentran en la pared de las células vegetales y que son selectivamente retenidos en una solución neutro detergente. Los hidratos de carbono no fibrosos o no estructurales incluyen los almidones, los azúcares y las pectinas, y son típicamente fermentados con mayor facilidad en el rumen. Es necesario indicar que las pectinas, desde el punto de vista fisiológico, son hidratos de carbono estructurales. Sin embargo, no están unidos de forma covalente con la porción lignificada de la pared celular y son fermentados fácilmente en el rumen (entre el 90 y el 100%), por lo que se consideran, desde el punto de vista de su fermentabilidad ruminal (Nocek y Tamminga, 1991).

El catabolismo de los polisacáridos implica la degradación extracelular hasta monosacáridos u oligosacáridos de cadena corta, en tanto que el catabolismo intracelular supone la hidrólisis o demolición fosforilativa de los polisacáridos (figura 1). a monosacáridos y ulterior catabolismo del piruvato producido por glicólisis hasta AGV, lactato, succinato, formiato, etanol, CO₂, metano e hidrógeno (Nocek y Tamminga, 1991).

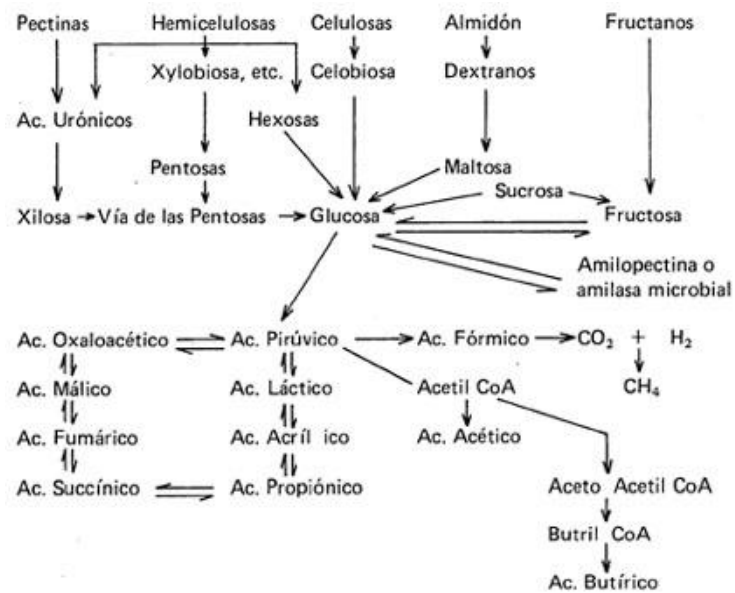


Figura 1: Vías del metabolismo de los carbohidratos en el rumen
(Fuente: Grudsky y Arias, 1983).

La habilidad de un microorganismo ruminal para fermentar algún carbohidrato específico depende 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, alfa galactosidasas, sucrasas, fosforilasas, isomaltasas, etc. Existen algunas enzimas hidrolíticas extracelulares difusibles, 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. Por lo tanto es normal que exista una considerable superposición de funciones entre las diversas especies bacterianas también entre especies bacterianas y protozoarias (Grudsky y Arias, 1983).

2.3.2 Proteínas

Existe una gran variedad de compuestos nitrogenados disponibles para los microorganismos presentes en el rumen. Dichos compuestos incluyen: proteínas de diversa naturaleza, las que varían en solubilidad y contenido aminoacídico, nucleoproteínas que contienen gran variedad de bases púricas y pirimídicas, varios compuestos nitrogenados no proteicos como péptidos, aminoácidos, amoníaco, amidas, aminas, aminas volátiles, sales de amonio, nitritos y nitratos, así como también compuestos como la urea (que además entra al rumen a través del torrente circulatorio y de la saliva) y Biuret, los cuales pueden ser incluidos en forma de aditivos en la ración de los rumiantes(Grudsky y Arias, 1983).

El esquema general del metabolismo nitrogenado microbiano es el siguiente según Grudsky y Arias en (1983).

- Las proteasas y peptidasas hidrolizan las proteínas a péptidos y aminoácidos libres.
- Los aminoácidos se utilizan directamente para la síntesis de proteínas y otros constituyentes celulares microbianos, tales como los constituyentes de la pared celular y ácidos nucleicos.
- Los aminoácidos son también catabolizados a AGV y otros ácidos, CO₂ y amoníaco.
- La urea es hidrolizada a amoníaco por la potente actividad ureásica.
- Los compuestos tales como los nitratos son reducidos a amoníaco.
- El amoníaco se utiliza en la síntesis de los componentes celulares microbianos como las proteínas y otros.

La mayoría del nitrógeno proteico de la dieta se convierte en proteína microbiana, también se excreta como urea (por orina) o proteína fecal no digerida. La proteína dietética escapa al metabolismo de los microorganismos

del rumen, La proteína microbial subsecuentemente abandona el rumen para ser digerida en el abomaso e intestino delgado. Esta proteína microbial es muy digestible para el animal y tiene un alto valor biológico (Grudsky y Arias, 1983).

Normalmente, los productos intermediarios de la hidrólisis proteica (aminoácidos y péptidos), están presentes en grandes cantidades sólo durante un corto tiempo después de la ingestión de la proteína, lo que implica una rápida degradación que produce amoníaco o su fijación rápida en el interior de las células microbianas, Parece ser que la actividad proteolítica está influenciada principalmente por el pH, siendo los valores óptimos entre 6 y 7, Sólo han sido parcialmente caracterizadas las enzimas proteolíticas, las que se encuentran tanto en bacterias como en protozoos del rumen. Estas enzimas parecen ser principalmente intracelulares o ligadas a la superficie de las células microbianas, ya que en el líquido ruminal hay poca actividad proteolítica (Grudsky y Arias, 1983).

2.4 Alimentación de rumiantes con subproductos agroindustriales

De la producción y procesamiento de alimentos para el hombre se originan numerosos subproductos y residuos que pueden ser destinados a la alimentación animal. Un número importante de los mismos tienen características nutritivas diferentes según su origen y el tipo de procesos industrial (Ingrs *et al.*, 2002).

En general presentan la particularidad de ser muy concentrados en uno o más nutrientes (proteínas, lípidos, etc.) por lo que se deben analizar cuidadosamente para así poder combinarlos en forma correcta con otros alimentos en dietas equilibradas (Ingrs *et al.*, 2002).

2.4.1 Industria cervecera

Existen distintos subproductos provenientes de esta industria, siendo los más comunes de malta (seca y húmeda) y los granos de destilería, principalmente cebada con mezclas de maíz y en algunos casos arroz (seco, húmedo o ensilado). Se deben tener precauciones en el almacenaje (duración y protección) de aquellos subproductos húmedos ya que se degradan con facilidad (Ingrs *et al.*, 2002).

Estos subproductos son en general muy ricos en proteína con una degradabilidad intermedia y son considerados, desde un punto de vista nutricional, como un muy interesante ingrediente en raciones para vacas lecheras. Existen evidencias de reducciones en el consumo y la producción de leche si participan por encima del 20% de la ración ofrecida en base materia seca como granos de destilería húmedos (Ingrs *et al.*, 2002).

2.4.1.1. Masilla

Es un residuo industrial, producto de la elaboración de cerveza. Aunque se puede conseguir seca, su costo se eleva y puede resultar incosteable, por lo que la mayor disposición de este subproducto es en forma húmeda, conteniendo de 72 a 78 % de humedad. Tiene excelente valor nutricional, además que aporta un poco de levadura a la ración, lo cual puede ayudar a la digestión y aprovechamiento del alimento consumido (Villarreal, 2000). Niveles hasta del 60 % de la dieta pueden ser suministrados a los ovinos, por lo que el limitante de su inclusión sería básicamente el precio y el nivel de proteína requerido en la dieta.

2.4.1.2 Características nutricionales

En el cuadro 1 se muestra el perfil nutricional de la masilla. La naturaleza fibrosa y bajo contenido de energía la masilla de cerveza es adecuada para los

rumiantes, en especial en las vacas lecheras, para balancear el consumo de los altos contenidos de almidón en la dieta (Dhiman *et al.*, 2003).

Cuadro 1: Perfil nutricional de la masilla.

	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

2.4.1.3. Levadura

Levadura es un nombre genérico que agrupa a una variedad de hongos, incluyendo tanto especies patógenas para plantas y animales, como especies no solamente inocuas sino de gran utilidad. De hecho, las levaduras constituyen el grupo de microorganismos más íntimamente asociado al progreso y bienestar de la humanidad. Algunas especies de levaduras del género *Saccharomyces* son capaces de llevar a cabo el proceso de fermentación, propiedad que se ha explotado desde hace muchos años (Gonzales, 2010)

Según la autora mencionada (Gonzales, 2010) la levadura de más estudio es la *Saccharomyces cerevisiae*, tiene generalmente una forma elipsoidal, con un diámetro que varía de 5 hasta 10 micrómetros.

El tamaño celular aumenta con la edad de la célula. Estructuralmente, la *Saccharomyces cerevisiae* está compuesta por estos constituyentes:

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

2.4.1.3.1 Descripción micológica

La levadura es un hongo levaduriforme que presenta células alargadas, globosas a elipsoidales con gemaciones o blastoconidios multilaterales (de 3-10 x 4,5-1 μm) Ascos con hasta cuatro ascosporas esféricas o elipsoides y de pared lisa en su interior como lo muestra la figura 2 y 3.



Figura 2: Crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en agar glucosado de Sabouraud durante 2 días a 24 °C. Fuente: revista iberoamericana de micología 2004



Figura: 3 Levaduras de *Saccharomyces cerevisiae*. Microscopía de contraste de fases, x580 aumentos. Fuente: revista iberoamericana de micología 2004

2.5 Enzimas de interés industrial

Las enzimas, como catalizadores biológicos, poseen una serie de características muy interesantes para la Industria tienen una elevada especificidad, trabajan en condiciones suaves, son fácilmente accesibles y no alteran el medio ambiente, por todas estas razones, estos biocatalizadores se están utilizando en la industria alimentaria, de detergentes, productos químicos, farmacéuticos y de diagnóstico; Alrededor de un 65% de las enzimas proteolíticas o proteasas que se producen industrialmente están de una u otra manera relacionadas con la industria alimentaria, entre los usos más comunes se encuentra la maduración de quesos, ablandadores de carnes, producción de hidrolizados de proteína, fabricación de pan, por mencionar algunos (Mitra *et al.*,1996; Pandey *yet al.*,2003); aunque es conveniente señalar que con las proteasas alcalinas empleadas en detergentes ocupan 25% del total de la distribución, el 10% restante corresponde en las áreas farmacéuticas y analítica (García *et al.*,1993).

2.5.1 Generalidades de enzimas

Muchas enzimas se han nombrado añadiendo el sub fijo “asa” al nombre del sustrato o a una palabra que describe su actividad. Así la ureasa cataliza la hidrólisis de la urea y la DNA polimerasa cataliza la síntesis de DNA. Otras enzimas, tales como la pepsina y la tripsina tienen nombres que no se refieren a sus sustratos. A veces la enzima tiene dos o más nombres, o dos enzimas diferentes tienen el mismo nombre. Debido a tales ambigüedades y al número siempre creciente de enzimas descubiertas, se ha adoptado por acuerdo de la Unión internacional de Bioquímica un sistema de nomenclatura y clasificación de enzimas. Este sistema distribuye las enzimas en seis clases principales (cuadro 2), cada una de ellas con diferentes subclases, según el tipo de reacción catalizada (Lehninger, 1993).

Cuadro 2.- Clasificación de proteasas (Alqucira, 2003).

N°	Clase	Tipo de reacción catalizada
1	Oxidoreductasas	Transferencia de electrones (iones hidruro o átomos de H)
2	Transferasas	Reacciones de transferencia de grupos
3	Hidrolasas	Reacción de Hidrólisis (transferencia de grupos funcionales al agua)
4	Liasas	Adición de grupos a dobles enlaces, o formación de dobles enlaces por eliminación de grupos
5	Isomerasas	Transferencia de grupos dentro de la molécula dando formas isoméricas
6	Ligasas	Formación de enlaces C – C, C-S, C-O y C-N; mediante reacciones de condensación acopladas a la rotura de ATP.

2.5.2 Aplicación en la industria de alimentos

Para la aplicación industrial de proteasas se recurrió inicialmente a la producción de preparados enzimáticos provenientes, en su mayoría de tejidos animales y vegetales, al incrementarse la demanda de proteasas como consecuencia de su aplicación como aditivo en detergentes utilizados a nivel industrial y doméstico, se desarrollaron tecnologías para producir proteasas de origen microbiano, ya que reúnen propiedades deseables como gran estabilidad en intervalos de pH y temperatura de procesos, así como de la elevada actividad en presencia de compuestos que normalmente inhibirían a las de origen animal y vegetal, además de ser más factible su producción a partir de microorganismos que a partir de tejidos (Cheftel, 1989; Pandey *et al.*, 2003).

Hoy en día existen en el mercado enzimas de origen fúngico que se emplean para la obtención de hidrolizados de proteína como son: Bioproteasa LA450 (Gygyc Biocon), Delvolase (Gist. Brocades), Novozym FM 2,0L, Alcalase 2,4L grado alimenticio, Neutrasa 0.5L grado alimenticio, Flavourzyme 500 MG y Kojizyme (Novo Nordisk), por mencionar algunas (Perera y Aurrekoetxea, 2001; Bjoern *et al.*, 2000). Pero el uso de este tipo de enzimas encarece la recuperación de la proteína, ya que su costo oscila entre 280 y 420 pesos por gramo de enzima. Cabe señalar que existen varias posibilidades de elección de la enzima para una buena obtención de hidrolizados de proteína como es su origen microbiano, tipo de reacción catalizada, naturaleza del centro catalítico, especificidad del sustrato, concentración del sustrato, pH óptimo de actividad, así como la relación costo - rendimiento (Perera y Aurrekoetxea, 2001; Bjoern *et al.*, 2000).

2.5.3 Clasificación de proteasas dependiendo de su sitio activo

Alucira (2003) señala que las enzimas proteolíticas (comúnmente llamadas proteasas) pertenecen al grupo de Hidrolasas, ya que catalizan la degradación de otras proteínas hidrolizando los enlaces peptídicos con diferentes grados de intensidad y de selectividad. Un enlace peptídico es la unión que se realiza entre el grupo ácido de una aminoácido con el grupo amino de otro, con la consecuente eliminación de una molécula de agua. Dependiendo de la naturaleza del sitio sobre el cual actúan las proteasas, éstas se clasifican en:

- a) Endopeptidasas: son aquellas enzimas que hidrolizan los enlaces peptídicos internos de una proteína (tripsina y quimotripsina) dando como resultado cadenas de péptidos.
- b) Exopeptidasas: actúan sobre enlaces terminales de una proteína (aminopeptidasa y carboxipeptidasas). Basándose en su sitio de acción sobre el N o el C terminal.

- c) Aminopeptidasas: actúan sobre el N libre terminal de la cadena polipeptídica liberando un aminoácido o un dipéptido o tripéptido
- d) Carboxipeptidasas actúan sobre el C terminal de la cadena polipeptídica. Se subdividen en cuatro subgrupos dependiendo de su mecanismo catalítico y al grupo funcional presente en su sitio activo.

III. 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 y levadura) fueron proporcionados por la empresa cervecera Cuauhtémoc Moctezuma, de Monterrey Nuevo León. Este trabajo se dividió en 4 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 utilizaron 4 vacas 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.

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.

ETAPA II: Aislamiento de microorganismos fúngicos en agar PDA

3.3 Aislamiento de microorganismos en PDA

El aislamiento se realizó en medio sólido para que los microorganismos cultivados se pudieran diferenciar de acuerdo a sus características macroscópicas. Se preparó el PDA de la siguiente manera: se diluyeron 39 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 PDA 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 a 20 – 25°C en condiciones aeróbicas. El tiempo de incubación dependió del tiempo en que se observó crecimiento uniforme de los microorganismos eucariotas; se revisaron cada 24 hrs.

El organismo debe ser aislado en cultivo puro, natural o artificialmente y deben estudiarse sus características específicas existen varios métodos el más común es conocido con el PDA para evitar el crecimiento de bacterias se puede acidificar con ácido láctico al 25% o de 2 a 3 gotas por caja Petri para esterilizar el cultivo de coloca a 121°C por 1 atm de presión por 15 minutos (Otoya, 1981)

3.4 Caracterización macro y microscópicamente de las especies fúngicas aisladas en PDA

Una vez que se observó el crecimiento uniforme, se registraron las características macroscópicas de las colonias, y por medio de la técnica de tinción azul de algodón se definieron las características microscópicas.

Otoya (1981) indica que luego de tener al hongo aislado se procede a observarlo se debe hacer una observación macroscópica y microscópica.

- Observación macroscópica: esta observación permite determinar el aspecto de la colonia y pigmentación de la colonia.
- Observación microscópica: se puede observar conidias, esclerocios, picnidios, peritecios, desarrollo de hifas con ramificaciones.

ETAPA III: 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 PDA.

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 (PDA), el cual se denominó “zona de descarga”, posteriormente se hicieron 3 diluciones por la técnica de estría abierta cruzada. Calentando al rojo vivo el asa microbiológica cada vez que se estrío, para lograr la separación de las colonias de manera efectiva. Las cajas fueron incubadas a 25 - 30°C en condiciones aeróbicas.

Las colonias obtenidas se purificaron y mantuvieron en tubos de cultivo añadiéndoles PDA 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 IV: Producción y cuantificación enzimática

3.6 Producción de proteasa

3.6.1 Ensayo de (Screening)

Se eligieron 4 cepas puras en tubos de ensayo y se realizó un screening para ver la degradación de la proteasa como única fuente de carbono

3.6.2 Medio Pontecorvo

Se preparó un medio sólido disolviendo los componentes de los cuadros 3 y 4 en un litro de agua destilada.

Cuadro 3: Componentes del medio pontecorvo

Componente	Cantidad (g/L)
Leche	15 mL
KH₂PO₄	2.47
(NH₄)₂SO₄	6.6
CaCl₂	0.48
MgSO₄ 7H₂O	0.38
NaCl	0.32
FeSO₄ 7H₂O	0.124
Oligoelementos	1 mL
Extracto de levadura	0.05
Agar- agar	19

Cuadro 4: Solución de oligoelementos para medio pontecorvo

Componente	Cantidad (g/L)
ZnSO₄ 7H₂O	2.2
H₃BO₄	1.1
MnCl₂ 4H₂O	0.5
CoCl₂-6H₂O	0.16
CuSO₄ 5H₂O	0.16

Una vez disueltos los componentes del medio de cultivo se y esterilizó a 121°C por 15 minutos y se vaciaron de 10 a 15 mL de este medio en cajas Petri. Se sembró cada una de las 4 cepas puras por separado con el método estriado en toda la caja y se incubó a 20 - 25° C.

3.6.3 Selección del material biológico

De las 4 cepas puras que se sembraron en el medio pontecorvo se seleccionó una para producción la enzima proteasa esta elección se llevó acabo por crecimiento homogéneo en menor tiempo

3.6.4 Curva de crecimiento en medio líquido para la producción de la enzima proteasa

Se diseñó un el medio líquido específico para inducir al microorganismo a producir la enzima proteasa. En un matraz Erlenmeyer se agregó 100 mL de agua destilada y se disolvió los componentes de la tabla 1 y 2. Se disolvió y esterilizo a 121°C por 15 minutos y una vez que alcanzó temperatura ambiente, se adicionó la fuente de carbono leche deslactosada light (Lala) tetrapack agitando suavemente para permitir su homogenización.

Se realizó un inculo inicial de 50 µL del tubo con cultivo puro de la cepa seleccionada en tubos los cuales se incubaron bajo condiciones aeróbicas a

25 °C y posteriormente se siguió una cinética de crecimiento celular tomando alícuotas por tiempos de 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 196 hr.

La curva de crecimiento se determinó espectrofotométricamente a una longitud de onda de 590 nm mediante la técnica de turbidimetría.

3.6.5 Turbidimetría

Este método da información sobre el contenido de macromoléculas, y no sobre el número de células. En el laboratorio de microbiología se usa un espectrofotómetro y se mide la absorbancia de la suspensión de microorganismos en comparación con un blanco que es el medio esterilizado, sin inóculos. Cuanto mayor es el número de células en suspensión, menor es el porcentaje de luz que atraviesa el medio. Se cumple una ley similar a la de Lambert-Beer y expresando la relación en términos de masa microbiana y absorbancia, la ecuación es la siguiente:

$$A = k \times W$$

Donde: A= absorbancia

k= constante

W= masa molecular

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

3.6.6 Determinación de proteína extracelular (enzima) por el método de Biuret

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

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

Se agregaron 200 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, posteriormente se agitaron y se leyó la absorbencia a 570nm.

3.6.6.1 Método de Biuret

Fernández (2010]) menciona que el método del Biuret se basa en la formación de un complejo coloreado entre el Cu^{2+} y los grupos NH de los enlaces peptídicos en medio básico. 1Cu^{2+} se acompleja con 4 NH. La intensidad de coloración es directamente proporcional a la cantidad de proteínas (enlaces peptídicos) y la reacción es bastante específica, de manera que pocas sustancias interfieren. La sensibilidad del método es muy baja y sólo se recomienda para la cuantificación de proteínas en preparados muy concentrados (por ejemplo en suero).

3.7. Cinética enzimática

Se colocaron los tubos con 400 µl muestra (leche) en una gradilla y en baño María a 40°C, se les agregó 100 µl de extracto enzimático al tiempo de (0, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 120min), esto con la ayuda de las micropipetas

calibradas, se sacaron los tubos del baño María una vez que se les agregó el extracto enzimático e inmediatamente se les agregó 500µl de reactivo de Biuret, esto para detener la reacción enzimática del microorganismo. Reactivo y se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro a 570 nm.

Para conocer el efecto de las condiciones de reacción sobre la enzima y el sustrato, se prepararon una muestra patrón y una muestra blanco (Cuadro 5).

Cuadro 5. Preparación de muestras para cuantificación de proteínas totales por el método de Biuret

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

Para el análisis de datos se utilizó la siguiente ecuación

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

Conc. Patrón = 60 mg/ml.

IV.RESULTADOSYDISCUSIÓN

Este trabajo de investigación fue realizado en cuatro etapas para aislar, purificar e inducir a un microorganismo presente en líquido ruminal de bovino y evidenciar que es capaz de producir enzimas proteasas.

A continuación se presentan los resultados obtenidos de cada una de las de las 4 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.

4.2Acondicionamiento de ganado Holstein y obtención de líquido ruminal.

El acondicionamiento se llevó a cabo favorablemente en 120 días del consumo de la dieta de las 4 vacas Holstein adicionadas con subproductos de la industria cervecera (masilla-levadura) 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.

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 $39 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (figura 4).



Figura 4: Fotografía de obtención de líquido ruminal mediante bomba nasogástrica

ETAPA II: Aislamiento de microorganismos fúngicos en agar PDA

4.3 Aislamiento de microorganismos en PDA

Se preparó un medio especial para el crecimiento de hongos y levaduras en este caso se utilizó agar papa dextrosa (PDA), El Agar Dextrosa y Papa es un medio utilizado para el cultivo de hongos y levaduras, se prepararon cajas Petri para observar el crecimiento de 24 a 96 hrs de incubación en condiciones de aerobiosis a temperaturas de 20- 25°C.

En la figura 5 se muestran fotografías de las cajas con PDA después de haber obtenido un crecimiento homogéneo incubado a 20 – 25° C por tiempos de 24 hasta 96 hrs, por lo tanto representan las cajas que contiene a las colonias originales.

En este medio sólido (PDA) se obtuvieron 4 cepas diferentes de células eucariotas (levaduras) las cuales mostraron un crecimiento homogéneo y uniforme en el tiempo de 24-96 hrs una de ellas codificada como VAM 1004 -1 presentó una coloración amarillenta y el resto de coloración clara y cremosa. Macroscópicamente todas las cepas tienen una morfología diferente.

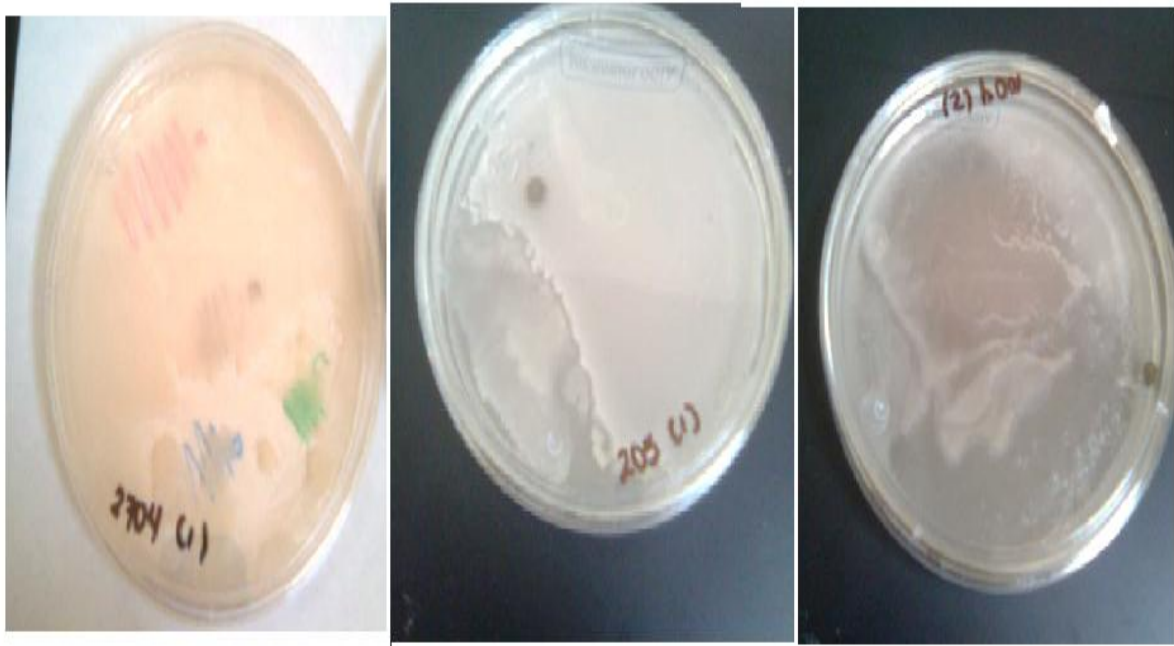


Figura 5: Muestra la fotografía de la morfología macroscópica de cepas de levaduras del líquido ruminal de bovinos sembradas en agar papa dextrosa (PDA).

La selección de las cepas fue de acuerdo a sus características macroscópicas, (coloración, tamaño, bordes, etc.) se describen en el cuadro 5. La mayoría presenta una coloración beige, con bordes regulares y de consistencia cremosa.

4.4 Caracterización macro y microscópicamente de las especies fúngicas aisladas en PDA

El cuadro 5 muestra la caracterización macro y microscópica obtenida

Cuadro 5.- Características microscópicas de levaduras

DIETA CON LEVADURA Y MASILLA			
Color de la colonia	Código	Características macroscópicas	Características Microscópicas
Cremosa	VAM-205-1	Pequeña, redonda, opaca, irregular.	Cilíndrica
Cremosa	VAML2704-1	Regulares , mediana, opaca, cremosa, regular	Cilíndricas
Amarilla	VAM-1004-1	Regulares , mediana, cremosa,	Cilíndrica
Cremosa	VAML-2704-2	Pequeña, redonda, seca, opaca, regular.	Cilíndrica

Las levaduras que se pudieron aislar fueron en menor cantidad en comparación de las bacterias ya que éstas últimas representan la mayor proporción (10X12) de la biomasa seguidos de los protozoarios. Estos resultados coinciden con los propuestos (Annison y Lewis, 1966) ya que menciona que las levaduras se encuentren en 10^4 /ml cantidad en el líquido ruminal.

La concentración de las poblaciones microbianas que viven en el rumen en anaerobiosis y aeróbicos, específicamente para bacterias, protozoarios y

hongos son de $10^{10}/\text{ml}$, $10^6/\text{ml}$ y $10^4/\text{ml}$ respectivamente. Para permitir que los organismos de crecimiento lento; tales, como los hongos y protozoarios ruminales puedan reproducirse se necesita permanencia prolongada del alimento dentro del rumen de 48 a 72 hrs y sostener así la concentración de las poblaciones microbianas. Los tiempos de multiplicación varían de 5-14 hrs para los protozoarios y de 24-30 hrs para los hongos (Annison y Lewis, 1966).

Al caracterizar microscópicamente las levaduras seleccionadas se encontraron formas típicas de levaduras, ovaladas y cilíndricas.

La figura 6 muestra a la cepa VAM-205 la cual es una levadura de color beige y cremoso microscópicamente es de forma cilíndrica con esporas en sus extremos de tamaño pequeño y comparado con las demás son muy parecidas microscópicamente sin embargo, macroscópicamente representan diferencias significativas principalmente en forma de la colonia.

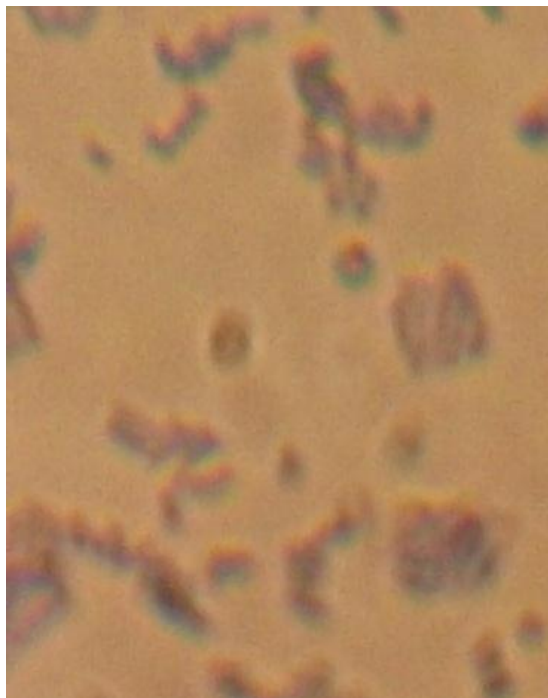


Figura 6.- Fotografía de las características microscópicas de colonia codificada como VAM 205-5, teñidas con azul de algodón

De tamaño pequeño en forma cilíndrica, opaca, irregular la figura 7 muestra la cepa marcada con el numero 1004 -1, microscópicamente parecida a la cepa 205 de la misma manera suaves y cremosas ambas colonias. Teñida con azul de algodón.

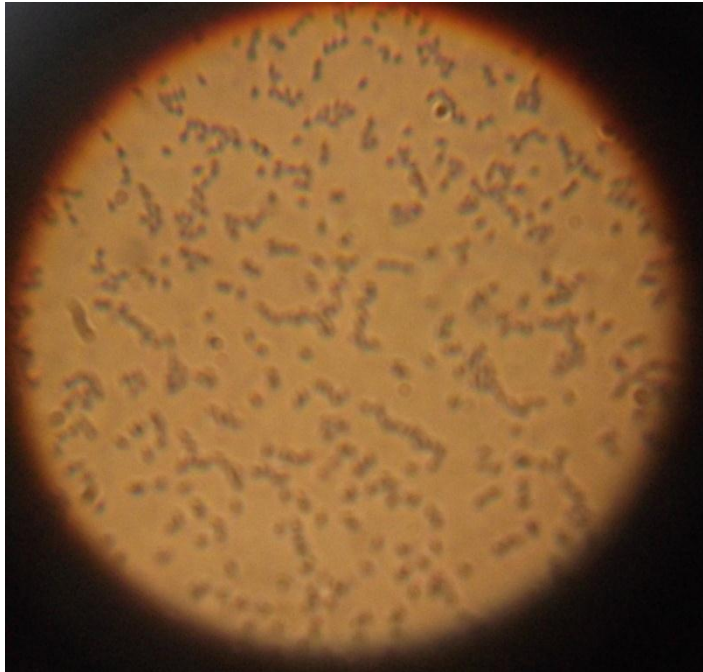


Figura 7.- Fotografía de las características microscópicas de colonia codificada como VAM 1004-1, teñidas con azul de algodón

La muestra 2704-2 muestra una forma cilíndrica pequeña, opaca, seca que en comparación a la muestra 2704-1 son muy parecidas microscópicamente ambas teñidas con azul de metileno.

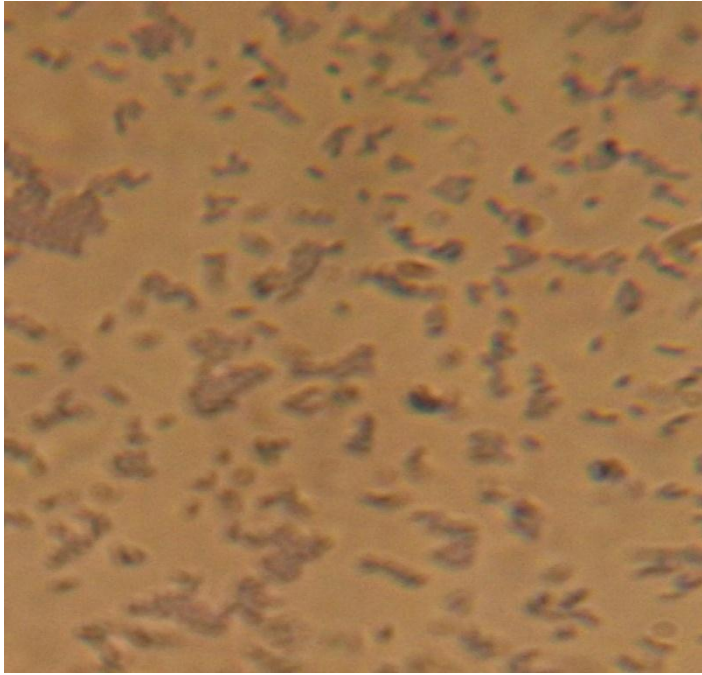


Figura 8: Fotografía de las características microscópicas de colonia codificada como 2704-1, teñidas con azul de algodón

La figura 9 muestra la cepa marcada con el número 2704-2 de forma cilíndrica de tamaño pequeño y teñido con azul de metileno.

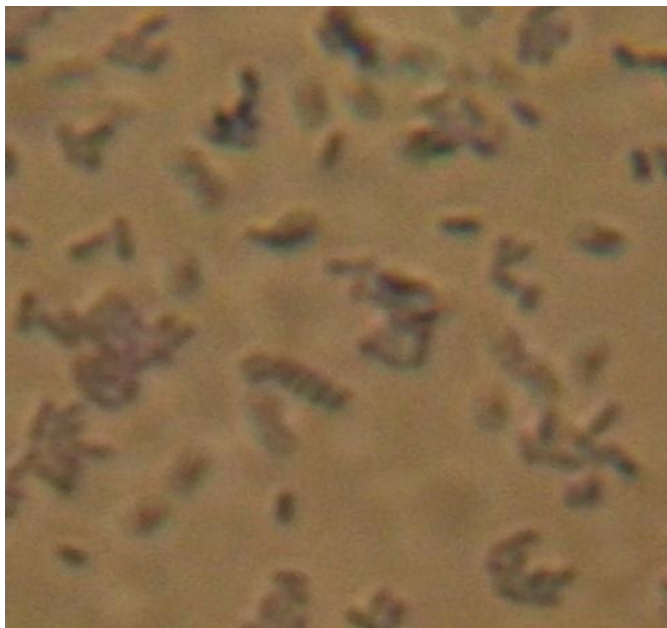


Figura 9: Fotografía de las características microscópicas de colonia codificada como 2704-1, teñidas con azul de algodón

ETAPA III: Purificación y mantenimiento de las cepas obtenidas

4.5 Purificación de los microorganismos aislados

Las cepas obtenidas del líquido ruminal fueron aisladas en cajas Petri de 20 – 25°C en condiciones de aerobiosis por el cual se determinaron que a las 72 hr está en su fase exponencial.



A)



B)



C)



E)

Figura 10: cepas puras de levaduras de liquido ruminal, A) 2704-1, B) 2704-2, C) 1004-1, E) 205-1.

Las cuatro cepas purificadas se inocularon en tubos con PDA, dando como resultados diferentes tiempos de crecimiento uniforme, los cuales se muestran en el cuadro 6.

De acuerdo con Mantilla (2002) la cepa cepas 205VAM-1, cuenta con características macro y microscópicamente de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* cepas 205VAM-1, así como la cepa 1004 VAM-1 como la 2704-1 puede tratarse de alguna variedad de *schizosaccharomyces* de acuerdo a sus características microscópicas tiene forma de bastón y mide normalmente de 3 a 4 micrómetros de diámetro y de 7 a 14 micrómetros de longitud (carrillo, 1997).

La cepa 2704-2 Lara (1997), describe sus características macroscópicas podría tratarse de la una levadura *Zygosaccharomyce*.

Cuadro 6. Tiempos de crecimiento de las cepas puras en medio de cultivo PDA

TIEMPO DE CRECIMIENTO				
96 horas	120 horas	144horas	168horas	192horas
	205-1		1004-1	
			2704-1	2704-2

La figura 10 muestra las cepas aisladas en tubos de las cuales ninguna presento cambio de coloración en la cepa así como en el medio.

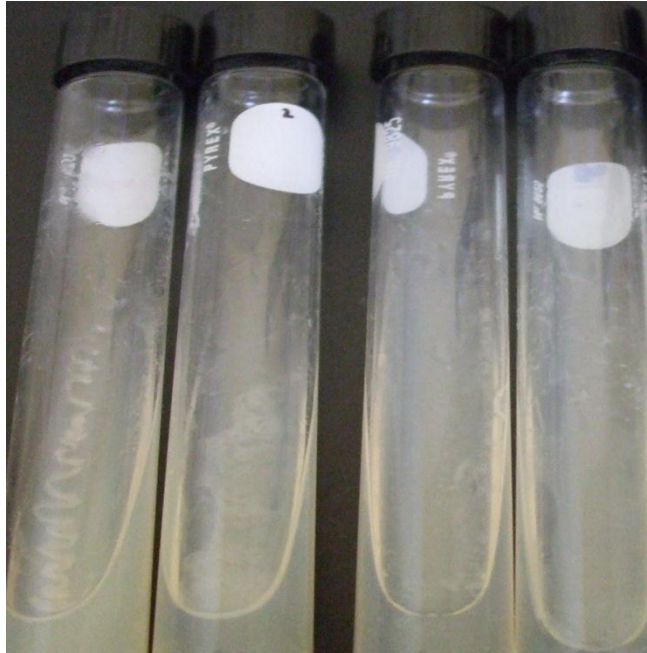


Figura 11: cepas aisladas en tubos

ETAPA IV: Producción y cuantificación enzimática

4.6 Producción de proteasa

Hoy en día existen en el mercado enzimas de origen fúngico que se emplean para la obtención de hidrolizados de proteína como son: Bioproteasa por mencionar algunas (Perera y Aurrekoetxea, 2001; Bjoern y *et al.*, 2000).

Por esta razón se ha propuesto un medio sólido para la producción de una enzima proteasa controlando temperatura y pH para que sea un medio específico, para la obtención de extractos enzimáticos se ha utilizado 4 cepas diferentes obtenidas del líquido ruminal.

De las 4 cepas sembradas 3 no tuvieron crecimiento a las 72 hr, por lo que se infiere que a ese tiempo no se presentó crecimiento lo cual puede ser debido a varias razones, ya que primero emplean la fuente de carbohidratos de la leche y luego la proteína que es más compleja.

En la figura 12 se muestra la cepa con una crecimiento a las 72 hr de manera uniforme y mostrando una coloración beige y cremosa.



Figura 12. Fotografía de levaduras para la producción de una proteasa

4.6.1 Curva de crecimiento en medio liquido para la producción de la enzima proteasa

En la figura 11 se muestra el crecimiento de la cepa aislada en medio pontecorvo el cual es un medio específico para su crecimiento, esta fue monitoreada por 192 hr.

Su fase exponencial se encuentra a las 72 hr la velocidad de crecimiento es máxima y el tiempo de generación es mínimo. Durante esta fase los microorganismos consumen a velocidad máxima 0.197Do los nutrientes del medio. La evolución del número de células durante esta fase explica la curva de crecimiento (Brock 2003).

En la curva de crecimiento (figura 13) se puede observar que el microorganismo no tardó en adaptarse a los nutrientes del medio, el

crecimiento exponencial se da después de las 12 hr de fermentación. Posteriormente se observa un descenso de la curva lo cual puede ser debido a varias razones, ya que primero emplean la fuente de carbohidratos de la leche y luego la proteína que es más compleja.

Varela (2002), reportó 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 96 hr, presentándose una fase denominada fase de muerte y ocurre a las 192 hr de fermentación.

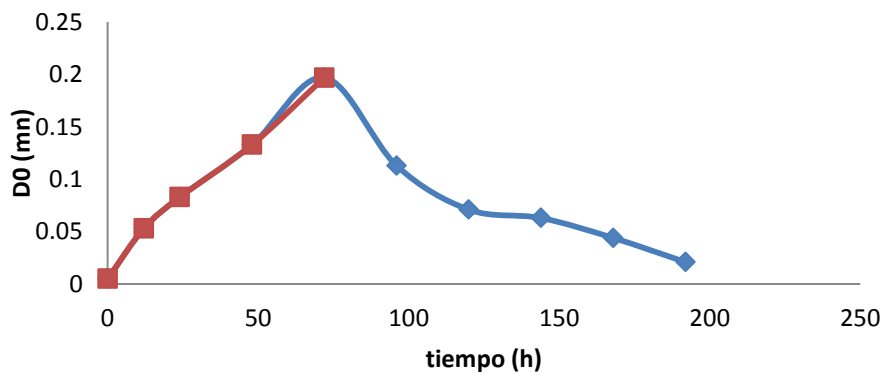


Figura 13. Curva de crecimiento de la cepa VAM 205-1 en medio pontecorvo a 20- 25°C

4.6.2 Determinación de proteína extracelular (enzima) por el método de Biuret

Los hongos son capaces de penetrar la cutina y la lignina proporcionando nuevos sitios para la adhesión bacteriana de ahí su importancia en la degradación de las fibras. Los hongos como *Neocallimastix frontalis* tiene alta actividad proteolítica extracelular del tipo metalo proteasa (Wallace, 1991.)

El grado de colonización de los hongos ruminales se relaciona con el tipo y calidad de la dieta sobre la cual crecen (Grenet *et al.*, 1989). Los hongos del rumen son particularmente abundantes en animales alimentados con dietas altas en fibra y su número aumenta en alimentos tales como pajas, forrajes de baja calidad y residuos de cosecha también tienen actividad proteasa (Cheng y Costerton, 1980).

La figura 14 muestra que la mayor actividad se encuentra entre las 72 y 96 hr de fermentación con una velocidad de 0.002 mg/mL

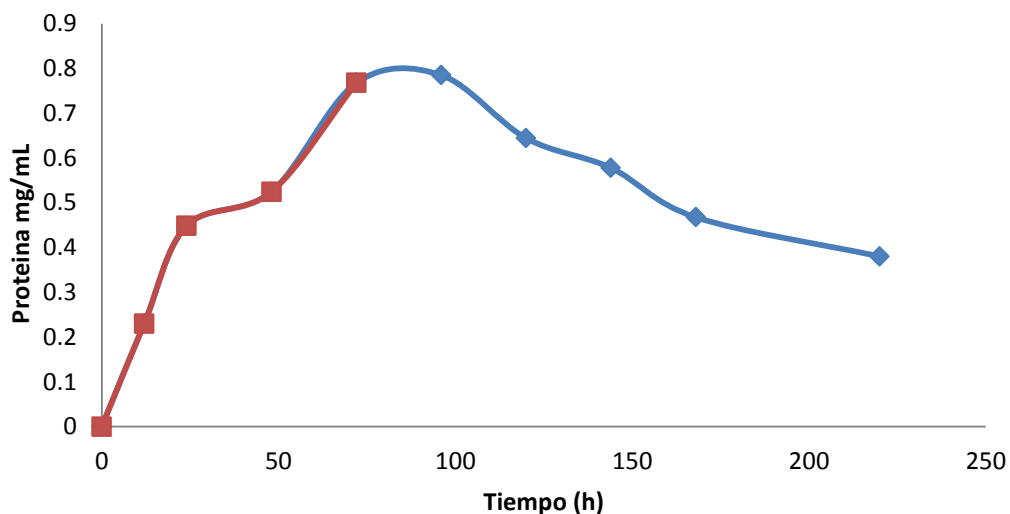


Figura 14. Cuantificación de proteína extracelular por el método de Biuret

4.7. Cinética enzimática

Las enzimas son catalizadores biológicos, es decir, proteínas que tienen la capacidad de acelerar ciertas reacciones químicas. Las proteasa tiene la capacidad de hidrolizar a las proteínas (Montes 2002).

Las aplicaciones comerciales de las enzimas se conocen en todo el mundo desde hace ya algunos años alrededor de un 65% de las enzimas proteolíticas o proteasas que se producen industrialmente están de una u otra manera relacionadas con la industria alimentaria, entre los usos más comunes se encuentra la maduración de quesos, ablandadores de carnes, producción de hidrolizados de proteína, fabricación de pan, por mencionar algunos (Mitra y col., 1996; Pandey *et al.*, 2003).

En la cinética se muestra la adaptación del microorganismo a las 24 hr y muestra su fase logarítmica de 72 a 96 hr que es cuando hay mayor producción de enzima.

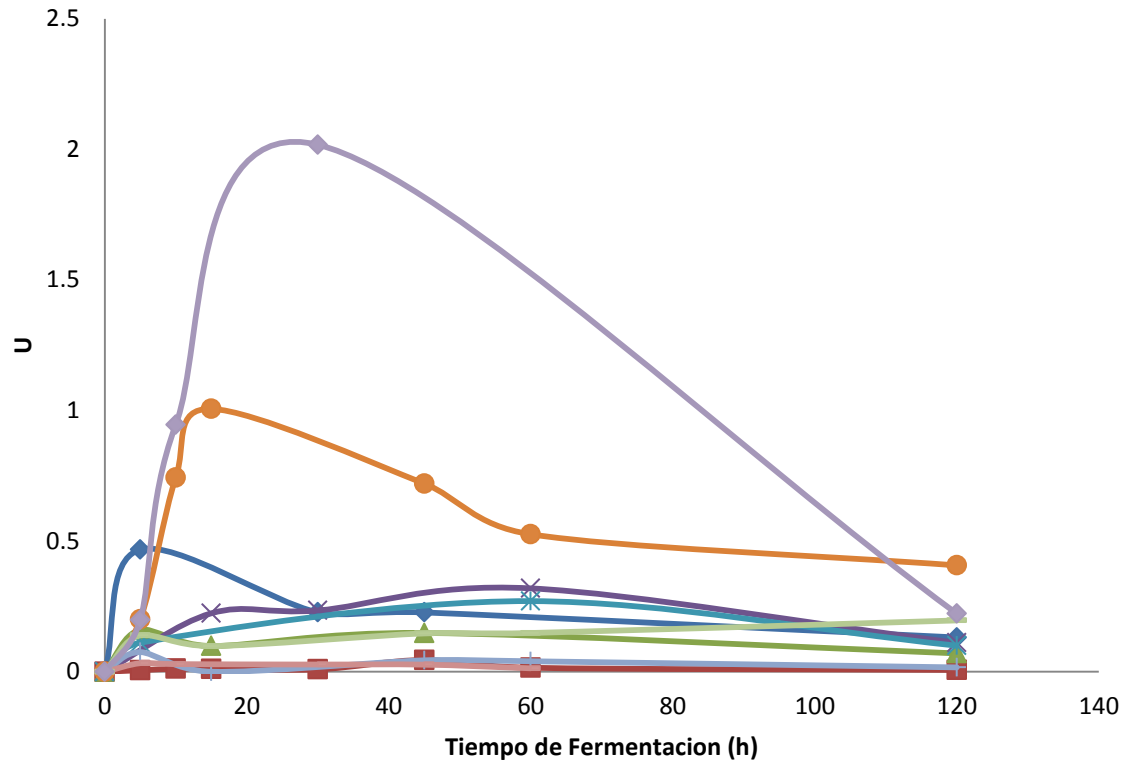


Figura 15. Actividad enzimática a diferentes tiempos de fermentación de la cepa 2 de VLM # 205.

V. CONCLUSIONES

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

Acondicionar a los animales en estudio mediante una dieta balanceada a base de subproductos agroindustriales de la industria cervecera (levadura y masilla) modifica la flora microbiana que existe en el rumen bovino, pudiendo obtener levaduras facultativas.

Se aislaron 4 cepas de levadura en las que se pudo identificar macroscópica y microscópicamente en forma de conidias.

Las 4 cepas aisladas poseen la capacidad de metabolizar lactosa con diferentes tiempos siendo la más sobresaliente la cepa marcada como VAM-205-1.

Fue posible aislar, purificar y conservar un microorganismo productor de enzimas de interés de la industria alimentaria, la cepa VAM 205-1 con actividad proteasa.

Se indujo la producción de una proteasa extracelular empleando leche descremada y deslactosada (Lala) como única fuente de carbono con una actividad máxima de 0.743U.

VI LITERATURA CITADA

1. Alquicira P. L 2003, Determinación de la especificidad de proteasas fúngicas en la hidrólisis de proteína, Tesis Maestría. Universidad Metropolitana. México. pág. 19-38.
2. Annison. E. F., y D. Lewis. M. A. 1966. El metabolismo en el rumen. Editorial Hispano Americano. México. Pp. 2-6; 10-21.
3. Bjoern, L., Lied, E. and Espe, M. 2000. Enzymatic hydrolysis of by-products from the fish-filleting industry; chemical characterization and nutritional evaluation. Journal of the Science of Food Agriculture. 80: 581 – 589.
4. Brock D.T. 2003, biología de los microorganismos, Madrid Pearson Prentice Hall, capítulo 2. Pág. 4.
5. Calsamiglia S, I. Castillejos y M. Busquet. 2005. “Estrategias Nutricionales para Modificar la Fermentación Ruminal en Vacuno”. Fedna. España. Pag.1-25.
6. Carrillo L.1997. Los Hongos De Los Alimentos Y Forrajes. Las levaduras. España. Pág. 8.
7. Castillo, A. R. y S. G. Onetti. 2002. Los subproductos agroindustriales en la alimentación de los rumiantes, Rivadavia 1439 (1033) Buenos Aires, Argentina.
8. Cheftel, J. 1989. Proteínas alimentarias. Editorial Acribia. Zaragoza España. Pp. 35-42.

9. Cheng, K. J., y J. W. Costerton, 1980. Adherent rumen bacteria: their role in the digestion of plant material, urea and epithelial cells. Digestive physiology metabolism in ruminants. Ed. Ruckebusch, y. & Thivend, p., 227-250. Lancaster: Mtp Press. Cuba.
10. Facchinello, M. G. 2006. El rumen – mutualismo y los orígenes de la célula eucariota”. Universidad Nacional del Comahue Unco-Essa, Argentina. Microbiología ambiental. pág. 1-3.
11. Fonty, G., y K.N. Joblin. 1991. Rumen anaerobic fungi: their role and interactions with other rumen microorganisms in relation to fiber digestion. Pág. 655-679 en: Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants. T. Tsuda, Y. Sasaki y R. Kawashima, Eds. Academic Press, Inc. San Diego, CA
12. Forsberg, C. W., Lovelock L.K., Krumholz I., and Buchanan-Smith Appl 1984. The effect of yeast culture inclusion in the concentrate diet on calf performance.. Environ. Microbiol. 47:101
13. García, G, M., Q Ramírez, R. y A. López C.. 1993. Biotecnología Alimentaria. 1ª edición. Limusa Noriega Editores. México. Pp. 103,577 – 578, 582 - 593.
14. García J. L. L. Roberto. Pozos. 2007. La actividad microbiana en la fermentación ruminal y el efecto de la adición de *Saccharomyces cerevisiae*. Universidad del Mar, campus Puerto Escondido. México. Pág. 55

15. González A, L. V. 2010. *Saccharomyces cerevisiae* Departamento De Genética Molecular, Instituto De Fisiología Celular. Universidad Nacional Autónoma De México. México.
16. Grenet, E., Breton, A., Barry, p. and Fonty, G. 1989. Rumen Anaerobic Fungi and Plant Substrate Colonization as Affected by Diet Composition. Anim. Feed sci. Tech. 26: 55-70.
17. Grudsky, P. R., Arias B. J. 1983. Aspectos generales de la microbiología del rumen. Monografías de Medicina Veterinaria, Vol. 5 (2).
18. Guadix, A, P. Genil, Utrera, S. Sevilla. 2006, Características generales de hongos, paracitos y virus. Centros Hospitalarios de Alta Resolución de Andalucía (chares). Temario Específico de Técnico Especialista de Laboratorio Volumen. España. MAD-Eduforma.
19. Hobson, P. N. and Howard, B. H. 1969, Microbial transformations. In Handbuch der Tierernährung, Verlag Paul Parey, Hamburg, vol. I. 130. Allison, M.
20. Hungate, R. E. 1966. The Rumen and its Microbes. 1ra. Edition. Academic press, New York.
21. 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
22. Laura. M. C. 2002. Medio de cultivo para los microorganismos ruminales. Archivo de zootecnia, Volumen 51. España. Pág, 401.

23. Lehninger, L. A. 1993. Principios de Bioquímica. 2ª Edición. Editorial Omega. Barcelona. España. Pp. 196 – 237.
24. Mitra, P., Chakraverty, R. y Chandra, A. 1996. Microbiología del rumen. Monografías de Medicina Veterinaria, Vol. 5 (2).
25. Montes H.C. 2002, Enzimas con aplicación industrial, Avance y Perspectiva vol. 2, pag 279.
26. Nocek, J. E. Y Tamminga, S. 1991. Enzymes by Solid State Fermentation – an Overview. *Journal of Scientific Dairy sci.* 74, 3598.
27. Orskov, E. R. 1992. Protein Nutrition in Ruminants. Academic press limited. 24-28 Oval Road. London nw17dx. Uk.
28. Otoyá M.M., 1981. Técnicas para el aislamiento, identificación y conservación de hongos patógenos del frijol. CIAT. Segunda edición. Colombia.
29. Pandey, A. 2002. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal.* 36: 1 – 4.
30. Pandey, A., Germano, S., Osaku, C.A., Rocha, N.S. y Soccol, C.R. 2003. Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp. Produced by Solid State Fermentation. *Enzyme and Microbial Technology.* 32: 246 – 251
31. Perera, M.N. y G. Aurrekoetxea. 2001. Congreso Nacional de Acuicultura. Aprovechamiento de recursos pesqueros infrautilizados

- para la obtención de alimentos mejorados de peces de acuicultura. Sukarrieta Bizkaina España. Revisado en línea: <http://aquatic.inizar.es/N3/art1302/azti1.htm>.
32. Perera, M.N. y Aurrekoetxea, G. 2001. Congreso Nacional de Acuicultura Aprovechamiento de recursos pesqueros infrautilizados para la obtención de alimentos mejorados de peces de acuicultura. Sukarrieta Bizkaina España <http://aquatic.inizar.es/N3/art1302/azti1.htm>.
33. Reyes F.E, A.C. Galván, 2010. Métodos para la cuantificación de proteínas. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales. México.
34. Rodríguez, P. M. 2003. Factores que afectan a la Fermentación Microbiana. Tesis Doctorado. Universidad de Barcelona. España. Pág. 5.
35. Stern S. Calsamiglia y M. I. Endres, 1994. “Dinámica Del Metabolismo De Los Hidratos De Carbono Y Del Nitrógeno En El Rumen”. X Curso De Especialización Fedna. España. Pág. 2-10.
36. Van Soest, P. J. 1982. Nutritional Ecology of the ruminant animal. Cornell university press, Ithaca, New York.
37. Wallace, R. J. 1991. Rumen proteolysis and its control. Pág. 131-150 en: rumen Microbial Metabolism and Ruminant Digestion. J. P. Joany, ed. Inra edition paris.