

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA “ANTONIO NARRO”**

**DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**



**Estudio microbiológico de líquido ruminal de ganado Holstein  
alimentado con dietas enriquecidas con productos de la industria cervecera  
(masilla y levadura)**

Por:

**LIDIA GUADALUPE VALDEZ SEPÚLVEDA**

**T E S I S**

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

Buenavista, Saltillo, Coahuila

Marzo, 2010

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA "ANTONIO NARRO"

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Estudio microbiológico de líquido ruminal de ganado Holstein alimentado con dietas enriquecidas con productos de la industria cervecera (masilla y levadura)

Presentado por:

LIDIA GUADALUPE VALDEZ SEPÚLVEDA

**T E S I S**

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

**INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

El presente trabajo ha sido dirigido por el siguiente comité:

Director

Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez

Asesor

Dr. Juan E. Mauricio Benavides

Asesor

Dr. Jesús M. Fuentes Rodríguez

Asesor

Dr. Antonio Francisco Aguilera Carbó

Ing. José Rodolfo Peña Oranday

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

Buenavista, Saltillo, Coahuila

Marzo 2010

Universidad Autónoma Agraria  
"ANTONIO NARRO"



COORDINACION DE  
CIENCIA ANIMAL

El presente trabajo de investigación ha sido desarrollado en el marco de las actividades comprometidas del proyecto “**Aislamiento e identificación parcial e microorganismos bactrianos 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

*...Porque veo al final de mi rudo camino  
que yo fui el arquitecto de mi propio destino;  
que si extraje la miel o la hiel de las cosas  
fue porque en ellas puse hiel o mieles sabrosas:  
cuando plante rosales, coseché siempre rosas...*

*Amado Nervo*

## AGRADECIMIENTOS

A **Dios**, gracias por la vida, la salud y la familia que me has dado. Gracias por permitirme concluir una etapa más en mi vida. Pero sobre todo porque me llenas de dicha y bendiciones.

A mi universidad, mi **ALMA TERRA MATER**, por todos los conocimientos que adquirí durante estos años. Sobre todo por la oportunidad de conocer tanta diversidad cultural.

A mi asesor de tesis y una de las personas que más admiro, a la **Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez**, por su valiosa cooperación para concluir este proyecto. Gracias doctora, por su paciencia, confianza y disposición. Gracias por que sin su valiosa aportación no hubiera sido posible concluir esta investigación.

A los doctores **Antonio Francisco Aguilera Carbó**, **Juan Enrique Mauricio Benavides** y **Jesús Manuel Fuentes Rodríguez** por su apreciable tiempo y enseñanzas ofrecidas para la elaboración de este trabajo.

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

A los maestros del departamento de Tecnología de Alimentos que compartieron conmigo sus conocimientos y contribuyeron en mi formación académica. En especial a la **MC. Xóchitl Ruelas Chacón**.

A mis grandes amigos y compañeros **Tomás López Altunar** y **Rosemberg Roblero Pérez**, por escucharme y apoyarme incondicionalmente, gracias por todos estos años de sincera amistad.

## DEDICATORIAS

Con amor y cariño a mis padres:

*Sra. Laura Minerva Sepúlveda Martínez*

*Sr. Faustino Valdez Torres*

Gracias por alentarme a concluir mis sueños, soy afortunada siempre al contar con su amor, comprensión y ejemplo. En todo momento de mi vida han sido participes y colaboradores de mis metas y propósitos. Muchas gracias por darme la oportunidad de iniciar este camino profesional. El objetivo logrado es de ustedes y la fuerza que me ayudo a conseguirlo fue su apoyo.

A mis hermanas: *Laura Judith* y *Lucero Vanessa*, gracias por ser mis mejores amigas, por su compañía y apoyo.

A mi novio *Ismael Menera López*, gracias por tu apoyo moral e incondicional, por darme ánimos y hacerme sonreír, gracias por darme tu amor.

A mis abuelitos *Lili* (†), *Miro* (†), *Balde* (†) y *Lupita*, espero que estén orgullosos de mi.

Al *Pbro. Luis Rodríguez del Río*, gracias por sus valiosos consejos y su apoyo espiritual al inicio de mi carrera y a lo largo de mi vida.

# ÍNDICE GENERAL

	Página
<b>RESUMEN</b>	1
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	2
1.1 Antecedentes	2
1.2 Justificación	3
1.3 Hipótesis	4
1.4 Objetivo general	4
1.5 Objetivos específicos	4
<b>2. REVISIÓN DE LITERATURA</b>	6
2.1 Rumen	6
2.1.1 Medio ambiente ruminal	6
2.1.2 Población microbiana	7
2.1.2.1 Bacterias	7
2.1.2.2 Protozoarios	9
2.1.2.3 Hongos	10
2.1.3 Metabolismo microbiano ruminal	11
2.1.3.1 Degradación de los carbohidratos en el rumen	11
2.2 Subproductos de la industria cervecera en la alimentación de ganado	14
2.2.1 Masilla	15
2.2.2 Levadura	16
2.2.2.1 Crecimiento, fermentación y proceso de producción	17
2.2.3 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
2.2.3.1 Activa	20
2.2.3.2 Inactiva	20
2.2.3.3 Enriquecida	21
2.2.4 Efecto de la adición de masilla y levadura en la fermentación ruminal	21
2.3 Enzima Celulasa	22
2.3.1 Generalidades de enzimas	22
2.3.1.1 Especificidad de las enzimas	23
2.3.1.2 Especificidad por el sustrato	23
2.3.1.3 Influencia de pH sobre las enzimas	23
2.3.1.4 Influencia de la temperatura sobre las enzimas	23
2.3.2 Celulosa	24
2.3.2.1 Distribución y obtención	25

2.3.2.2 Utilización de la celulosa	25
2.3.2.3 Hidrólisis de la celulosa	26
2.3.2.4 Microorganismos productores de celulasas	27
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>29</b>
3.1 Acondicionamiento de ganado Holstein y obtención de líquido ruminal	29
3.2 Aislamiento de procariontes en agar nutritivo	30
3.3 Aislamiento de procariontes en agar Scheadler	31
3.4 Purificación de los microorganismos aislados	31
3.5 Identificación del metabolismo microbiano	32
3.5.1 Citrato de Simmons	33
3.5.2 Agar MacConkey	33
3.6 Producción de celulasas	33
3.6.1 Ensayo (Screening)	33
3.6.2 Curva de crecimiento en medio líquido en Tioglicolato de sodio	34
3.6.3 Curva de crecimiento en medio líquido específico para producir celulasa	34
3.6.4 Determinación de proteína extracelular por el método de Biuret	35
3.6.5 Determinación de Azúcares Reductores (Somogy-Nelson)	36
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIONES</b>	<b>39</b>
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>69</b>
<b>6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>71</b>
<b>7. ANEXOS</b>	<b>78</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Géneros y especies de bacterias según su afinidad por el tipo de sustrato en el complejo retículo-rumen	9
Cuadro 2. Géneros de protozoarios ruminales con capacidad de degradar sustratos	10
Cuadro 3. Composición química de la levadura de cerveza	16
Cuadro 4. Enzimas involucradas en la hidrólisis enzimática de la celulosa	27
Cuadro 5. Dieta de ganado lechero alimentado con masilla y levadura	30
Cuadro 6. Composición química del medio sólido específico para el screening de la degradación de celulosa	34
Cuadro 7. Composición química del medio líquido específico para producir celulasa	35
Cuadro 8. Preparación de muestras para cuantificación de proteínas totales por el método de Biuret	36
Cuadro 9. Morfología macroscópica de los microorganismos aislados en agar nutritivo	41
Cuadro 10. Morfología macro- y microscópica de los microorganismos aislados en agar Schaedler	46
Cuadro 11. Resultados de las pruebas bioquímicas para las cepas	57

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Clasificación morfológica de bacterias en el complejo retículo-rumen	7
Figura 2. Ilustraciones de protozoarios que habitan en el complejo retículo rumen	10
Figura 3. Vías del metabolismo de los carbohidratos en el rumen	13
Figura 4. Fotografía microscópica electrónica de barrido de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
Figura 5. Estructura molecular de la celulosa	24
Figura 6. Fotografía de las estructuras presentes en tejido vegetal	25
Figura 7. Fotografía de obtención de líquido ruminal mediante bomba nasogástrica	39
Figura 8. Fotografías de la morfología colonial de las 5 cajas Petri sembradas con líquido ruminal en agar nutritivo. A) Caja # 903VML, B) Caja # 763VML, C) Caja # 283VML, D) Caja # 873VML, E) Caja # 343VML	44
Figura 9. Fotografías de la morfología colonial de las 5 cajas Petri sembradas con líquido ruminal en agar Schaedler. A) Caja # 513VML, B) Caja # 953VML, C) Caja # 643VML, D) Caja # 193VML, E) Caja # 563VML	48
Figura 10. Morfología microscópica de la colonia # 1 aislada de líquido ruminal	50
Figura 11. Morfología microscópica de la colonia # 10 aislada de líquido ruminal	50
Figura 12. Morfología microscópica del microorganismo # 2 aislado de líquido ruminal	51
Figura 13. Morfología microscópica del microorganismo # 11 aislado de líquido ruminal	51

Figura 14. Morfología microscópica del microorganismo # 5 aislado de líquido ruminal	52
Figura 15. Morfología microscópica del microorganismo # 7 aislado de líquido ruminal	52
Figura 16. Morfología microscópica del microorganismo # 8 aislado de líquido ruminal	53
Figura 17. Morfología microscópica del microorganismo # 9 aislado de líquido ruminal	53
Figura 18. Morfología microscópica del microorganismo # 12 aislado de líquido ruminal	54
Figura 19. Morfología microscópica del microorganismo # 13 aislado de líquido ruminal	54
Figura 20. Morfología microscópica del microorganismo # 16 aislado de líquido ruminal	55
Figura 21. Fotografía de las cepas aisladas conservadas en tubos de cultivo con AS y TGNa.	56
Figura 22. Prueba bioquímica Agar MacConkey negativo (cepa 1)	58
Figura 23. Prueba bioquímica Citrato de Simmons positivo (cepa 5)	59
Figura 24. Prueba bioquímica Citrato de Simmons positivo (cepa 8)	59
Figura 25. Prueba bioquímica Citrato de Simmons positivo (cepa 10)	60
Figura 26. Curva de crecimiento de la cepa # 2 aislada en TGNa a 40° C	64
Figura 27. Curva de crecimiento de la cepa # 2 en medio líquido específico a 40° C	65
Figura 28. Cuantificación de proteína extracelular por el método de Biuret de la cepa # 2	67
Figura 29. Cuantificación de la actividad enzimática de la cepa # 2	68

## **RESUMEN**

En la UAAAN se realizó un estudio de la alimentación de ganado bovino Holstein de 5 vacas multíparas, adicionando subproductos de la industria cervecera (masilla y levadura) a su dieta. Se obtuvo el líquido ruminal de las vacas para su posterior caracterización macro y microscópica en agar nutritivo y agar Schaedler (medio de cultivo específico para anaerobios).

Se purificaron y mantuvieron 10 cepas puras, a las cuales se les realizaron pruebas bioquímicas para identificar el metabolismo.

Se seleccionó una cepa para el estudio enzimático. Se realizó una curva de crecimiento microbiano en medio líquido (TGNa), presentando una velocidad específica de crecimiento de 0.0253 DO/h. El microorganismo no tardó en adaptarse a los nutrientes del medio.

Se diseñó un medio específico para la producción de la enzima celulasa, empleando como única fuente de carbono carboximetil celulosa. Se realizó una curva de crecimiento en medio líquido específico, en donde la fase exponencial se observó en las primeras horas de fermentación (24 h) con una  $\mu=0.0427\text{DO/h}$ .

Se determinó el contenido de proteína extracelular por el método de Biuret, donde se apreció que la mayor concentración de proteína se obtiene a las 24 h de fermentación (65.74 g/L).

Se determinó la actividad celulasa por el método Somogy-Nelson donde se observó que a las 24 h de fermentación se obtiene la mayor actividad enzimática con valores de 858 U; donde U se define como: la cantidad de azúcares reductores liberados en mg/ml por cada mg de proteína en 1 hora, empleando celulosa como sustrato al 1%.

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

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Antecedentes

Existen diversos factores que afectan la población bacteriana ruminal, los cuales pueden ser clasificados como cuantitativos y cualitativos.

El patrón de fermentación ruminal en los rumiantes está influenciado por la interacción entre la dieta, la población de microorganismos y el animal. Los aspectos importantes en el rumen para la fermentación, son: 1) condiciones para una eficiente actividad celulolítica y 2) necesidades de la síntesis óptima de proteína microbiana.

Existen varios subproductos derivados de la fabricación de cerveza (grano húmedo, ó masilla, cascarilla y crema final y levadura) que pueden utilizarse en la alimentación de novillos de engorda y de vacas productoras de leche.

La utilización de estos aditivos alimenticios es importante en la alimentación de rumiantes, se ha reportado (Gedek *et al.*, 1993) que la adición de levadura *Saccharomyces cerevisiae* incrementa la concentración de bacterias Gram negativo en el contenido ruminal, mencionando además, que la levadura estimula el crecimiento de bacterias amilolíticas a nivel ruminal, estos resultados que fueron confirmados por Kumar *et al.*, (1994), Wiedmeier *et al.*, (1987), Harrison *et al.*, (1988), y Dawson *et al.*, (1990) quienes indican que la levadura incrementa el número de bacterias totales, bacterias viables totales, celulolíticas, amilolíticas y protozoarios.

*Saccharomyces cerevisiae* como aditivo en la nutrición animal ha sido investigada ampliamente, sin embargo, se menciona que *S. cerevisiae* es capaz de incrementar el consumo de alimento, la producción de leche, conversión alimenticia y ganancia diaria de peso, en respuesta a incrementos en la

cantidad y actividad de las bacterias anaeróbicas totales y celulolíticas que modifican la concentración de ácidos grasos volátiles, pH ruminal y nitrógeno amoniacal; sin embargo, los resultados no son consistentes.

Es por ello que el conocimiento y la comprensión de la actividad microbiana ruminal son de suma importancia ya que el cepario producido de esta investigación será un aliciente para futuras investigaciones.

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

Actualmente el sector agrícola requiere de productos de alto valor, por lo tanto la utilización de subproductos derivados de la fabricación de cerveza, son de gran utilidad para la alimentación de novillos de engorda y de vacas productoras de leche.

El estudio básico de los microorganismos en ganado bovino Holstein es de suma importancia ya que no existen reportes de biotipos mexicanos del ganado coahuilense, lo cual nos abre una ventana de oportunidades para registrar y conservar a estos microorganismos ya que pueden generar futuras investigaciones, enriqueciendo la información de fuentes genéticas y rutas metabólicas. Los resultados generados permitirán la identificación de microorganismos de rumen bovino, proporcionando una alternativa para el aprovechamiento efectivo del alimento que permita obtener nuevas fuentes de enzima naturales.

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

Los usuarios de los productos potenciales de esta investigación son: productores de bovino de carne y leche que tengan interés en el mejoramiento de las dietas industriales.

### 1.3 Hipótesis

La modificación de la dieta de ganado Holstein con residuos agroindustriales de la industria cervecera produce alteraciones en la flora bacteriana presente en líquido ruminal favoreciendo el desarrollo de microorganismos celulolíticos.

### 1.4 Objetivo General

Aislar e identificar microorganismos procariotas de líquido ruminal de ganado bovino Holstein alimentados con dieta a base de residuos agroindustriales de la industria cervecera con aplicaciones biotecnológicas.

### 1.5 Objetivos Específicos

1. Acondicionar a los animales en estudio, mediante una dieta balanceada, adicionada con subproductos agroindustriales (masilla y levadura).
2. Aislar preliminarmente los microorganismos bacterianos en agar nutritivo.
3. Caracterizar macro y microscópicamente las especies bacterianas aisladas en agar nutritivo.
4. Aislar microorganismos bacterianos en medios de cultivo comerciales específicos para anaerobios.
5. Caracterizar macro y microscópicamente las especies bacterianas aisladas en medios anaerobios específicos.
6. Purificar y mantener las cepas obtenidas.
7. Identificar el metabolismo bioquímico de las cepas bacterianas obtenidas.

8. Emplear un microorganismo bacteriano para la producción de la enzima celulasa de interés industrial mediante el diseño de un medio de cultivo inductor.
9. Determinar y cuantificar la actividad celulolítica mediante técnicas espectrofotométricas.

## **1. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **2.1 Rumen**

El bovino forma parte del grupo de los animales correspondientes a la familia de los rumiantes, los que tienen entre sus características el convertir en productos de elevada calidad nutritiva materiales que no pueden ser aprovechados por el hombre para su alimentación; entre los bovinos la vaca especializada en producción de leche es muy eficiente en convertir la fibra, el nitrógeno y la energía de su dieta en leche (Pérez, 1978).

Anatómicamente el rumen es uno de los tres pre-estómagos que tienen los rumiantes, antes de llegar al estómago verdadero o abomaso (Sisson *et al.*, 1982).

#### **2.1.1 Medio ambiente ruminal**

El rumen ofrece un medio adecuado para el crecimiento bacteriano, ya que el pH varía generalmente entre 5.5 y 7.0 y la temperatura de 39 a 40° C, es muy cercana a la óptima para la mayoría de los sistemas enzimáticos. El alimento llega hasta el rumen en una forma más o menos constante y es mezclado por las contracciones de las paredes ruminales, lo que permite que los microorganismos entren en contacto con alimentos recién ingeridos o regurgitados y vueltos a masticar y humedecer. La reinsalivación de los alimentos durante la rumia, en combinación con el agua que llega al rumen, y las secreciones del mismo, proveen una humedad relativa favorable para muchos microorganismos. Además, los productos finales de las reacciones fermentativas son eliminados del medio, ya sea por absorción a través de la mucosa del retículo-rumen, o bien por el paso hacia los siguientes compartimientos, evitando de esta manera la saturación del medio y la consecuente inhibición del crecimiento bacteriano. Por lo tanto, se favorece el

crecimiento de la misma llegando a producir una cantidad de protoplasma equivalente al 10% del líquido total del rumen (Warner, 1962).

### 2.1.2 Población microbiana

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

Algunos de los géneros bacterianos más importantes por su capacidad para degradar los principales carbohidratos (glúcidos) de los alimentos son: *Bacterioides*, *Ruminococcus*, *Succinomas*, ciertos *Clostridios*, *Celobacterias* y *Butivibrio* (Hungate, 1966).

#### 1.1.2.1 Bacterias

Las bacterias son los microorganismos más abundantes en el complejo retículo-rumen, se clasifican por su forma (figura 1) o afinidad por el sustrato.



Figura 1. Clasificación morfológica de bacterias en el complejo retículo-rumen  
(Fuente: Rodríguez y Valencia, 2008).

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

- A. *Bacterias Celulolíticas*: son las que producen celulasa, que es una enzima extracelular capaz de hidrolizar los enlaces  $\beta$  de la celulosa, produciendo celobiosa. Algunas de ellas también aprovechan la celobiosa. (Bryant, 1953). Este tipo de bacterias se encuentran en concentraciones altas en el rumen de animales alimentados con forrajes que contienen mucha fibra.  
Especies celulolíticas de importancia son: *Bacteroides succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus*, *Clostridium loch headii* y *Cillobacterium cellulosolvens* (Grudsky y Arias, 1983).
- B. *Bacterias Hemicelulolíticas*: son bacterias capaces de degradar a las hemicelulosas, liberando las pentosas, hexosas y ácidos úricos, convirtiéndolos en glucosa o fructosa (Bryant, 1953).
- C. *Bacterias Amilolíticas*: estas utilizan los almidones como sustrato pues poseen una amilasa que hidroliza enlaces  $\alpha$  1-4 produciendo maltosa, que por acción de la maltasa se convierte en glucosa.
- D. *Bacterias que utilizan azúcares solubles*: éstas dependen de la actividad de las anteriores, que son las que producen glucosa, xilosas, y otros azúcares solubles a partir de las celulosas, almidones, hemicelulosas, etc., transformándolas en ácidos grasos volátiles.
- E. *Bacterias Proteolíticas*: producen enzimas hidrolíticas que rompen enlaces peptídicos, liberando péptidos y finalmente ácidos aminados.
- F. *Bacterias Lipolíticas*: poseen esterases que hidrolizan a los triglicéridos, fosfolípidos y ésteres de ácidos grasos.
- G. *Bacterias que utilizan ácidos*: actúan sobre los productos finales de la actividad de las bacterias de los grupos anteriores, utilizando

como sustrato diferentes tipos de ácidos, por lo que ayudan a su eliminación del medio.

Además hay otros tipos de bacterias (cuadro 1) capaces de producir amoníaco a partir de los ácidos aminados, por mecanismos de desaminación; las metanogénicas que producen metano a partir de hidrógeno y bióxido de carbono y otras que sintetizan vitaminas (Bryant, 1953).

Cuadro 1. Géneros y especies de bacterias según su afinidad por el tipo de sustrato en el complejo retículo-rumen

<b>Celulolíticas</b>	<b>Hemicelulolíticas</b>	<b>Amilolíticas</b>
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	<i>Ruminococcus spp.</i>	<i>Streptococcus bovis</i>
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	<i>Ruminococcus spp.</i>	<i>Succinomonas amilolytica</i>
<i>Ruminococcus albus</i>	<i>Bacteroides ruminicola</i>	<i>Bacteroides amylophilus</i>
<b>Proteolíticas</b>	<b>Metanogénicas</b>	<b>Lipolíticas</b>
<i>Prevotella spp.</i>	<i>Methanobrevibacter ruminantium</i>	<i>Anaerovibrio lipolytic</i>
<i>Selenomonas ruminantium</i>	<i>Methanobacterium formicicum</i>	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>
<i>Eubacterium spp.</i>	<i>Metanomicrobium mobile</i>	<i>Treponema bryantii</i>
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>		<i>Eubacterium spp.</i>

(Fuente: Rodríguez y Valencia, 2008).

### 2.1.2.2 Protozoarios

Como parte de la microflora ruminal están los protozoarios, que son microorganismos simples, microscópicos (15 a 250  $\mu\text{m}$  de largo y 10 a 200  $\mu\text{m}$  de ancho), predominantemente unicelulares y con núcleo diferenciado. En el complejo retículo-rumen se pueden encontrar hasta un millón de protozoarios suspendidos por mililitro de líquido ruminal, lo cual puede representar hasta un 50% de la biomasa ruminal (Rodríguez y Valencia, 2008).

La clasificación de los protozoarios ruminales también se basa en su morfología y su afinidad al sustrato que degradan (ejemplo: localización de cilios, celulolíticos, amilolíticos, proteolíticos) (cuadro 2).

Cuadro 2. Géneros de protozoarios ruminales con capacidad de degradar sustratos

<b>Celulolíticas</b>	<b>Amilolíticos</b>	<b>Proteolíticos</b>
<i>Polyplastron</i>	<i>Entodinium</i>	<i>Entodiniumn</i>
<i>Eudiplodinium</i>		<i>Eudiplodinium</i>
<i>Epidinium</i>		

(Fuente: Rodríguez y Valencia, 2008).

Los protozoarios más comunes en el rumen pertenecen a los géneros: *Isotriquia*, *Dasitriquia*, *Diplodinio* y *Entodinio* (Hungate, 1966). En rumiantes jóvenes también se encuentran protozoarios flagelados (Eadie, 1962), *Monocercomonas*, *Calimastix*, *Quilomastix*, *Tetratricomonas*, etc. como los que se presentan en la figura 2 (Hungate, 1966).



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

### 2.1.2.3 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).

### 2.1.3 Metabolismo microbiano 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).

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).

#### 2.1.3.1 Degradación de los carbohidratos en el rumen

El principal aporte de los microorganismos en el rumen son las celulasas microbianas. La celulosa es la más importante fuente de carbono y energía en la dieta del rumiante, pero el animal por sí mismo no produce las enzimas necesarias para digerir la celulosa. Como los microorganismos usan celulosa y otros carbohidratos presentes en las plantas como sus propias fuentes de energía y carbono, ellos aportan gran cantidad de productos (ácidos grasos volátiles AGV y otros), los cuales son usados por el animal como fuente de carbono y energía.

La planta (alfalfa, sorgo, salvado, forraje) contiene un 75% de un carbohidrato u otro, la cantidad y distribución dependen de la edad del vegetal, factores del medio y agronómicos y de la especie vegetal en cuestión. Los carbohidratos que se encuentran en los tejidos vegetales son, en su gran mayoría, aptos para ser fermentados en el rumen. Estos principalmente son polisacáridos -celulosa, hemicelulosa, pectinas y almidón- y cantidades menores de una gran variedad de compuestos carbohidratados y sus derivados -glucosa, sucrosa, sacarosa, propilenglicol, xilosa, celobiosa, arabinosa, galactosa, manosa, lactato, glucuronato, piruvato, succinato, citrato, etc. De estos carbohidratos, la celulosa es la más abundante. 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).

Cuando los carbohidratos de la dieta entran al rumen son hidrolizados por enzimas extracelulares de origen microbiano. En el caso de los carbohidratos fibrosos, el ataque requiere de una unión física de las bacterias a la superficie de la partícula vegetal, la acción de las enzimas bacterianas libera principalmente glucosa y oligosacáridos hacia el líquido ruminal por fuera de los cuerpos celulares microbianos. Estos productos no son aprovechados por el rumiante, en su lugar, son rápidamente metabolizados por la microbiota ruminal.

La glucosa y otros azúcares son absorbidos por los microorganismos y una vez en el citosol se incorporan a la vía de la glucólisis. Este proceso enzimático da lugar a la formación de **NADH+H** (reducido), **ATP y piruvato**. La energía potencial representada por el ATP en este momento no es directamente accesible para el hospedero, pero representa la principal fuente de energía para el mantenimiento y crecimiento de los microbios (Nava y Díaz, 2001).

El catabolismo de los polisacáridos implica la degradación extracelular hasta monosacáridos u oligosacáridos de cadena corta (figura 3), en tanto que el catabolismo intracelular supone la hidrólisis de los polisacáridos a monosacáridos y posterior catabolismo del piruvato producido por glicólisis hasta AGV, lactato, succinato, formiato, etanol, CO<sub>2</sub>, metano e hidrógeno (Grudsky y Arias, 1983).

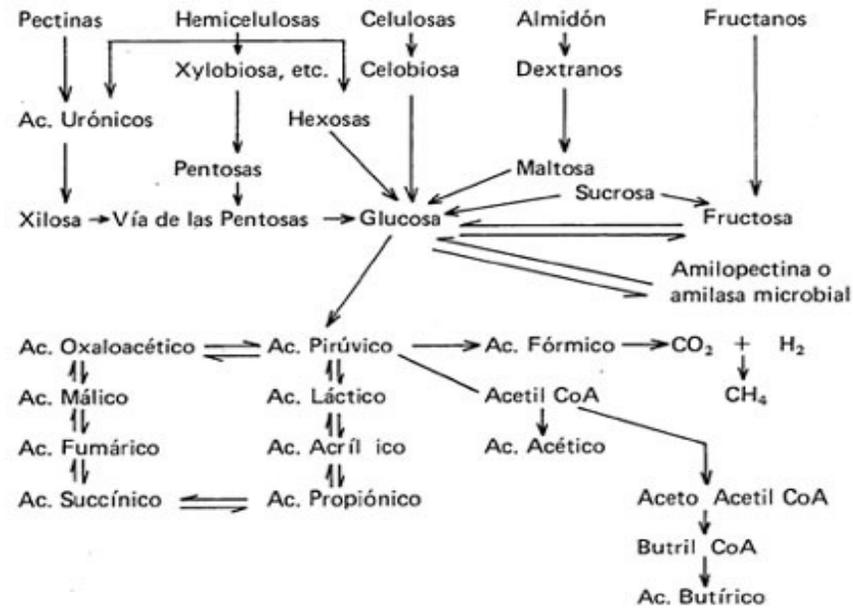


Figura 3. Vías del metabolismo de los carbohidratos en el rumen  
(Fuente: Grudsky y Arias, 1983).

La habilidad de un microorganismo ruminal para fermentar algún carbohidrato específico 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,  $\alpha$ -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).

## 2.2 Subproductos de la industria cervecera en la alimentación de ganado

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

Son varios los subproductos que pueden ser producidos en asociación con la producción de cerveza, entre los cuales están el bagazo de cerveza húmedo o seco, la levadura de cerveza seca, etc.

Los granos de cervecería son el material que queda después de que los granos han sido fermentados durante el proceso de elaboración de la misma. Estos materiales pueden ser ofrecidos en forma seca como granos cerveceros o bien en forma húmeda (masilla).

Estos materiales se consideran buena fuente de proteína no-degradable y agua, así como excelente fuente de vitaminas hidrosolubles, es por esto que se han utilizado tanto en la alimentación de rumiantes como en la alimentación de animales monogástricos gracias a su alto valor nutritivo.

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

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

### 2.2.1 Masilla

La masilla es un concentrado alimenticio rico en proteína, con una alta digestibilidad de sus proteínas y minerales. 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 (Smith, 2003).

La masilla es el subproducto de la industria cervecera resultante del proceso de prensado y filtración del mosto obtenido tras la sacarificación del grano de cereal (cebada, básicamente) malteado. Es un producto húmedo cuyo contenido en materia seca es de un 20 – 25 %. No se observan diferencias significativas en la composición química correlacionadas con el contenido de materia seca, aunque éste es variable. En el mercado recibe otros nombres como el de cebadilla de cerveza.

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

El contenido en energía metabolizable de este producto es de 2.86 Mcal/kg. La degradabilidad efectiva de la proteína es baja (50 %), siendo la

velocidad de degradación de un 7%/humedad. Se trata pues de un alimento de elevado contenido proteico, siendo esta una proteína que escapa, en buena parte, de la degradación ruminal (Calsamiglia, 2004).

### 2.2.2 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. Aún 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, además de ser una buena fuente de proteína y de aminoácidos. Aproximadamente el 45% del peso de la levadura seca consiste en proteína (cuadro 3). La calidad de la proteína de la levadura es excelente, tratándose de una proteína de origen unicelular y su calidad es equivalente a la soya, pues ambas son ricas en lisina (García, 2007).

Cuadro 3. Composición química de la levadura de cerveza

<b>Nutriente</b>	<b>%</b>
Proteínas	45
Grasa	1
Ceniza	7
Humedad	6

Fuente: Medicina Natural, 2008.

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

Las siguientes ecuaciones explican el crecimiento aerobio de las levaduras, así como la fermentación anaerobia:

**Crecimiento Aerobio:**



**Fermentación Anaerobia:**



La reproducción puede ser asexual (por germinación y fisión) y sexual (por ascosporas). No todas las levaduras tienen un ciclo de reproducción sexual, algunas especies como *Candida albicans* se reproducen sólo vegetativamente.

### 2.2.2.1 Crecimiento, fermentación y proceso de producción

La primera etapa de la producción de levadura consiste en el crecimiento o propagación del cultivo puro de células de levadura en una serie de reactores de fermentación. La levadura es recuperada del último fermentador utilizando centrífuga para concentrarla. La levadura es sometida por un tiempo de treinta minutos a una mezcla de salmuera con el fin de mejorar la deshidratación, posteriormente la levadura se somete a uno o más lavados y a otro separador centrífugo. La levadura se mezcla con salmuera antes de ser filtrada, generalmente se deja así por unos treinta minutos.

Posteriormente se lava en filtro rotatorio con agua helada para retirar la sal que se agregó con el fin de mejorar la deshidratación. La levadura sólida es entonces filtrada en filtros prensa, o en filtros rotatorios al vacío, para obtener una mayor concentración. La levadura filtrada se mezcla posteriormente con pequeñas cantidades de agua, emulsificantes y aceites. La levadura mezclada pasa posteriormente a extrusión, corte y embalaje; o secado en el caso de levadura seca (García, 2007).

### Fermentación

La levadura crece en una serie de fermentadores. Estos fermentadores son operados bajo condiciones aeróbicas (en presencia de oxígeno libre o exceso de aire), puesto que bajo condiciones anaeróbicas (limitación o ausencia de oxígeno) los azúcares fermentables son consumidos en la formación de etanol y dióxido de carbono, lo cual resulta en bajos rendimientos de producción de levadura. Este proceso de fermentación aeróbico es exotérmico, lo cual implica que el fermentador debe ser enfriado para mantener la temperatura bajo 30°C, mediante agua de refrigeración, consiguiendo así la temperatura óptima de crecimiento. Una porción de cepas de levadura (levadura madre) se mezcla con el mosto de la melaza en frascos esterilizados, y se deja crecer por un período de 2 a 4 días. El contenido completo del frasco se usa para inocular el primer fermentador en la etapa del cultivo puro (siembra inicial). La fermentación del cultivo puro se realiza en fermentadores batch donde la levadura crece por un período de 13 a 24 horas; es usual que se usen dos fermentadores en esta etapa.

A continuación, el cultivo puro fermentado, o levadura de siembra, es transferido a un fermentador intermedio, y posteriormente pasa a la etapa de la fermentación "stock", donde se aumenta la alimentación con una buena aireación. Esta etapa es llamada "stock", porque después que la fermentación se completa, la levadura es separada del medio de cultivo por centrifugación, produciendo la levadura "stock" para la próxima etapa. En esta nueva etapa, denominada fermentación "piten", se realiza una aireación fuerte y se incrementa la adición de melaza y nutrientes, y se produce la levadura "pitch" para la última etapa de la fermentación. Alternativamente, la levadura producida en esta etapa se puede centrifugar y almacenar por varios días antes de ser utilizada en la última etapa de fermentación (García, 2007).

La etapa final de la fermentación tiene el grado de aireación más alta, y se incrementa la alimentación de melaza y nutrientes. Esta etapa tiene una duración que varía entre 11 y 15 horas. Después que toda la melaza y los

nutrientes son adicionados, el líquido es aireado por un período adicional de 0,5 a 1 hora para permitir la total maduración de la levadura, permitiendo así una mayor estabilidad para el almacenamiento refrigerado. El volumen de crecimiento de la levadura en las etapas principales descritas anteriormente, aumenta con cada etapa (García, 2007).

### 2.2.3 *Saccharomyces cerevisiae*

*Saccharomyces cerevisiae* es una levadura que constituye el grupo de microorganismos más íntimamente asociado al progreso y bienestar de la humanidad (figura 4); su nombre deriva del vocablo *Saccharo* (azúcar), *myces* (hongo) y *cerevisiae* (cerveza) (Hernández, 1999).

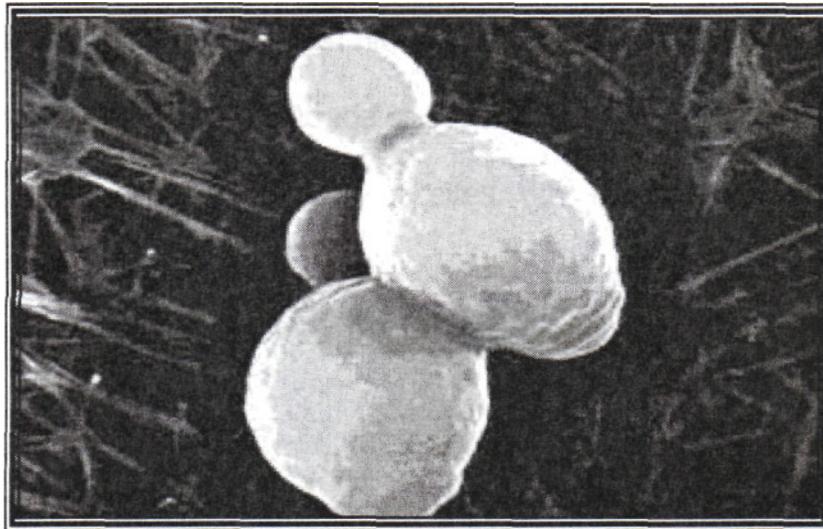


Figura 4. Fotografía microscópica electrónica de barrido de *Saccharomyces cerevisiae* (Fuente: Llamas, 2008).

La levadura *Saccharomyces cerevisiae*, puede tener 3 variantes, es decir, que sea: activa, inactiva o enriquecida.

### 2.2.3.1 Activa

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 mencionadas por García (2007) son:

- Promotor de crecimiento
- 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

### 2.2.3.2 Inactiva

Levadura Inactiva: esta levadura, tiene casi nula viabilidad, prácticamente  $1.0 \times 10^2$  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. Las principales funciones que menciona García (2007) son:

- 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 energía por animales
- Aumenta la digestibilidad de los nutrientes

### 2.2.3.2 Enriquecida

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 hay una menor posibilidad de intoxicación, siempre y cuando se aplique a las dosis recomendada. En estas levaduras podemos encontrar las enriquecidas con selenio, cromo, hierro, zinc, manganeso, cobre, molibdeno, etc. (García, 2007).

### 2.2.4 Efecto de la adición de masilla y levadura en la fermentación ruminal

Resultados de investigaciones de dietas 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), Adams *et al.*, (1981), Fallon y Harle (1987) y Mutsvangwa *et al.*, (1992) se observó incremento en la ganancia de peso y conversión alimenticia; no obstante, Drennan y Moloney (1993), no indicaron 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 Offer (1990) y Arcos *et al.*, (2000), no registraron cambios en ácidos grasos volátiles. Harrison *et al.*, (1988),

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 constante. Además se indican incrementos significativos en la cantidad y actividad de las bacterias anaeróbicas celulolíticas, (Wiedmeier *et al.*, 1987; Harrison *et al.*, 1988, Dawson *et al.* 1990), que podrían explicar el incremento sobre la digestibilidad de la dieta (Wiedmeier *et al.* 1987; Gómez-Alarcón *et al.*, 1987).

Gedek *et al.*, (1993), Plata *et al.*, (1994), Kumar *et al.*, (1994), Robinson y Garrett (1998), 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 (1995), indica que no existe respuesta al cultivo de levadura sobre la fermentación y digestibilidad ruminal debido a que no se encontró efecto sobre el pH ruminal, N-NH<sub>3</sub>, 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).

## 2.3 Enzima celulasa

### 2.3.1 Generalidades de enzimas

Las enzimas son catalizadores de origen proteico producidas por los organismos vivos. Cada reacción que se lleva a cabo en la célula es catalizada por un enzima en particular, por lo tanto, en una célula se encuentran un gran número de enzimas. 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).

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 (Rodríguez *et al.*, 1999).

### 2.3.1.1 Especificidad de las enzimas

Además de la capacidad de las enzimas para aumentar la velocidad de reacción, se encuentra su especificidad, tanto desde el punto de vista del enlace químico que va a transformar (especificidad por el sustrato), como del tipo de reacción que cataliza (especificidad de reacción) (Lara, 2006).

### 2.3.1.2 Especificidad por el sustrato

La especificidad por el sustrato no es igual de precisa para todas las enzimas. En el caso de una gran mayoría de hidrolasas, es suficiente la existencia de un determinado grupo funcional en el sustrato (Belitz, 1992).

### 2.3.1.3 Influencia de pH sobre las enzimas

Cada enzima solo es catalíticamente activa en un intervalo restringido de pH debido a sus grupos químicos ionizables; según el pH del medio, estos grupos pueden tener carga eléctrica positiva, negativa o neutra.

### 2.3.1.4 Influencia de la temperatura sobre las enzimas

En general, los aumentos de temperatura aceleran las reacciones químicas; por cada 10° C de incremento, la velocidad de reacción se duplica. Las reacciones catalizadas por enzimas siguen esta ley general. La temperatura a la cual la actividad catalítica es máxima se llama temperatura óptima.

### 2.3.2 Celulosa

Se puede considerar como la molécula orgánica más abundante en la naturaleza. Es un polímero lineal de varios miles de glucosas unidas por enlaces (1  $\beta$ →4). Tiene una estructura lineal o fibrosa, en el cual se establecen múltiples puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de distintas cadenas yuxtapuestas, haciéndolas impenetrables al agua, y originando fibras compactas que constituyen la pared celular de las células vegetales (figura 5) (Badui, 1993).

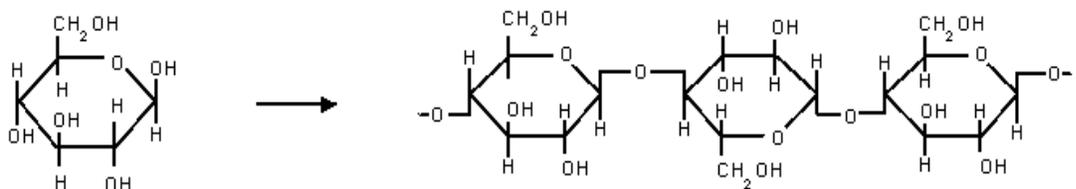


Figura 5. Estructura molecular de la celulosa

(Fuente: Lara, 2006).

La celulosa es un polisacárido estructural en las plantas ya que forma parte de los tejidos de sostén (figura 6). A pesar de que está formada por glucosas, los animales no pueden utilizar a la celulosa como fuente de energía, ya que no cuentan con la enzima necesaria para romper los enlaces  $\beta$ -1,4-glucosídicos.

Pero además la configuración  $\beta$  le permite a la celulosa formar cadenas largas y lineales, las cuales no se presentan aisladas sino unidas entre sí mediante enlaces hidrógeno intramolecular, formando una estructura supramolecular cristalina y organizada, resistente a la hidrólisis (Chou *et al.*, 1981).

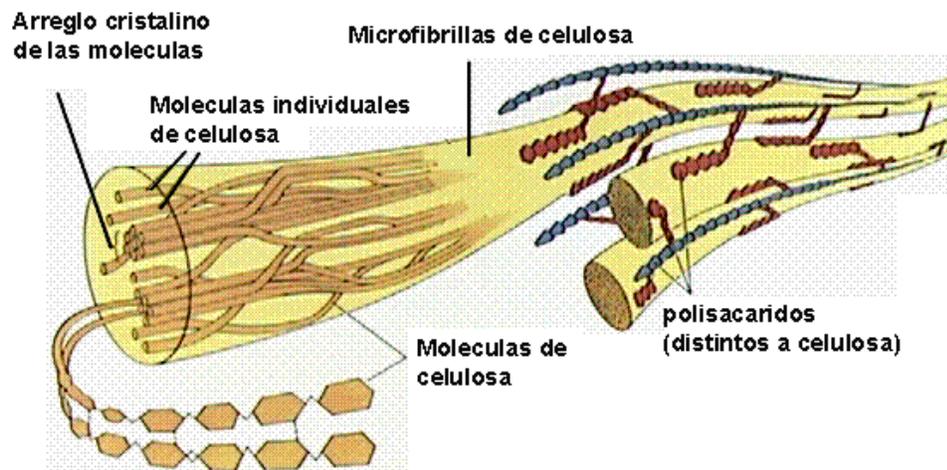


Figura 6. Fotografía de las estructuras presentes en tejido vegetal  
(Fuente: Lara, 2006).

### 2.3.2.1 Distribución y obtención

La celulosa es el componente principal de las paredes de las células vegetales, donde se encuentran asociadas a hemicelulosas, pectina y lignina. Este polisacárido no es atacado por las enzimas del aparato digestivo del organismo humano y constituye por ello, junto con el resto de los polisacáridos llamados inertes la parte no digestible de los alimentos de origen vegetal denominada fibra bruta, de gran importancia como inductora del peristaltismo intestinal (Belitz, 1992).

### 2.3.2.2 Utilización de la celulosa

La celulosa microcristalina se utiliza entre otros productos, en alimentos calóricos, salsas para ensaladas, postres y helados. La hidratabilidad y dispersabilidad de la celulosa mejora sensiblemente por la adición de pequeñas cantidades de carboximetilcelulosa (Belitz, 1992).

### 2.3.2.3 Hidrólisis de la celulosa

La hidrólisis de la celulosa puede llevarse a cabo tanto por vía química, utilizando álcalis o ácidos, como por vía enzimática, ya que no requiere condiciones tan extremas de pH y temperatura.

La transformación de la celulosa por vía enzimática implica la acción de un sistema multienzimático; el complejo celulasas, constituido básicamente por tres enzimas; **endoglucanasa**, que ataca al azar enlaces  $\beta$ -1, 4-glicosídicos de la cadena de celulosa; **exoglucosanasa**, que actúa sobre el extremo no reductor de la cadena dando lugar a unidades de celobiosa, y  **$\beta$ -glucosidasa**, que hidroliza específicamente celobiosa para dar lugar a glucosa (Lucas *et al.*, 2009).

Una vez degradadas las zonas amorfas de la celulosa, tiene lugar la tercera etapa de la hidrólisis, en donde la región cristalina comienza a ser hidrolizada, como resultado de la acción sinérgica de la endoglucosanasa y exoglucosanasa (Beldman, 1988).

Finalmente, una etapa que limita la degradación de la celulosa es la hidrólisis de la celobiosa a glucosa mediante la acción de la  $\beta$ -1, 4glucosidasa; porque las glucosanasas son inhibidas por la celobiosa (Lee, 1997).

La hidrólisis de la celulosa está catalizada por la celulasa, que es una mezcla compleja de varias enzimas con diversas actividades hidrolíticas (cuadro 4), preparada mediante fermentación en fase semisólida o sumergida, utilizando soforosa (disacárido dímero de la glucosa) como inductor (Lara, 2007).

Cuadro 4. Enzimas involucradas en la hidrólisis enzimática de la celulosa

Nombre	Sinónimos	Reacción
Celulasa	Factor Cx Endo-1,4-β-glucanasa	Endohidrólisis de enlaces 1,4-β- D glucosídicos
Celulasa 1,4-β-celobiohidrolasa	Factor C1 Exo -1,4-β-glucanasa	Exohidrólisis de enlaces 1,4-β- D glucosídicos con formación de celobiosa a partir de celulosa o glucooligosacáridos 1,4-β El ataque se produce por el extremo no reductor
1,4-β-glucosidasa	Celobiasa	Hidrólisis de restos terminales de β- D glucosa en β- glucanos

(Fuente: Lara, 2006).

#### 2.3.2.4 Microorganismos productores de celulasas

Las enzimas celulasas son producidas por una variedad de bacterias y hongos aeróbicos o anaeróbicos, mesófilos o termófilos. Sin embargo solo algunos de ellos producen la enzima celulasa extracelular, capaz de hidrolizar la celulosa (Eriksson, 1985).

De entre los microorganismos capaces de producir celulasas, los rendimientos que se obtienen utilizando hongos son superiores a los conseguidos con bacterias, por lo que la mayor parte de las investigaciones se centran en la producción de este complejo enzimático a partir de hongos (Lucas *et al.*, 2009).

Otros microorganismos productores de celulasas incluyen las bacterias aeróbicas mesófilas y termófilas (*Cellulomonas sp*, *Cellvibrio sp*, *Microbispora* y *Thermomonospora sp*) y las bacterias anaeróbicas mesofílicas y termofílicas (*Acetivibrio cellulolyticus*, *Bacteroides succinogenes*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* y *Clostridium thermocellum*).

Entre estos microorganismos, los termofílicos son de interés por su capacidad para producir enzimas celulolíticas termoestables, las cuales son en general estables bajo condiciones severas, incluso en niveles de pH altamente ácidos o alcalinos así como temperaturas hasta de 90° C.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

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 Nuevo León. Este trabajo se dividió en 6 etapas, las cuales se describen a continuación.

#### **ETAPA I**

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

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

Se emplearon 5 animales múltiparos 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 (masilla y levadura) (cuadro 5).

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 3500 rpm durante 15 minutos.

Cuadro 5. Dieta de ganado lechero alimentado con masilla y levadura

<b>Ingrediente</b>	<b>Kg</b>
Sorgo rolado	28.93
Salvadillo	4
Harinolina	6.77
Semilla de algodón	13
Silo maíz	5
Heno avena	0
Alfalfa	22
<b>Masilla</b>	<b>13</b>
<b>Levadura</b>	<b>6</b>
Prem. Minerales	0.6
Bicarbonato	0.7
Cons MS	15.9
TCO	22.5

(Fuente: Montero, 2009)

## **ETAPA II**

### Aislamiento preliminar de microorganismos bacterianos en agar nutritivo

#### 3.2 Aislamiento de procariotas en agar nutritivo

El aislamiento se realizó en medio sólido para que los microorganismos cultivados se pudieran diferenciar de acuerdo a sus características macroscópicas. Se preparó el agar nutritivo (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 la 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 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.

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 I) se definieron las características microscópicas.

### **ETAPA III**

#### **Aislamiento de microorganismos bacterianos en medio de cultivo específico para anaerobios.**

##### **3.3 Aislamiento de procariontes en agar Schaedler**

Se preparó un medio comercial agar Schaedler (AS) (BECTON OF DICKINSON) de la siguiente manera: se diluyeron 41.9 g de agar, en 1000 mL de agua destilada, posteriormente se solubilizó y se esterilizó en una autoclave (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 procariontes; se revisaron cada 24 hrs.

Se registraron las características macroscópicas de las colonias y por medio de una tinción de Gram se definieron las características microscópicas.

### **ETAPA IV**

#### **Purificación y mantenimiento de las cepas**

##### **3.4 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 15-20 mL de AS.

Con el asa se tomo la colonia de manera que se formo una burbuja uniforme en el ojo del asa; esta gota fue extendida en un extremo del agar, el cual se denomino “zona de descarga”, posteriormente se hicieron 3 diluciones por la técnica de estría abierta cruzada de 3 diluciones, 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 39- 40 °C en condiciones anaerobias.

Las colonias obtenidas se purificaron y mantuvieron en tubos con AS y el medio semisólido de Tioglicolato de Sodio (TGNa) (BIOXON) inclinados 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**

#### **3.5 Identificación del metabolismo microbiano**

Se seleccionaron 10 cepas puras y se realizó la identificación bioquímica de las cepas bacterianas obtenidas.

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 sus superficie al oxígeno es aerobia y la porción inferior (fondo) está protegida del aire y es relativamente anaerobia.

Las pruebas bioquímicas realizadas fueron:

#### 3.5.1 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 (anexo II).

#### 3.5.2 Agar MacConkey:

En tubos de ensaye, se vaciaron 5 mL de Agar MacConkey (BIOXON) (50 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 (anexo II).

## **ETAPA VI**

Empleo de un microorganismo bacteriano para la producción de una enzima celulasa de interés industrial, mediante el diseño de un medio de cultivo inductor.

### 3.6 Producción de celulasas

#### 3.6.1 Ensayo (Screening)

Se eligió un cultivo puro en tubo y se realizó un screening para verificar la degradación de celulosa del microorganismo. Se preparó el medio sólido específico (cuadro 6). Se disolvió Agar Bacteriológico, NaCl, NaNO<sub>3</sub>, KCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub> en 100 mL de agua destilada, posteriormente se solubilizaron y esterilizaron. La fuente de carbono (celulosa), previamente disuelta en 50 mL de agua destilada, 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 por estriado 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 6. Composición química del medio sólido específico para el screening de la degradación de celulosa.

<b>Componente</b>	<b>Cantidad (%)</b>
Agar Bacteriológico	2%
NaCl	.5%
NaNO <sub>3</sub>	.3%
KCl	.5%
Fuente de C (celulosa) Carboximetil celulosa de sodio (GOLDEN BELL)	1%
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	.2%
MgSO <sub>4</sub>	.01%

### 3.6.2 Curva de crecimiento en medio líquido en 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 (duplicado) con 2 mL de Tioglicolato de Sodio se inocularon 10 µl de una suspensión celular bacteriana obtenida de un cultivo puro en tubo; posteriormente se incubaron a 40<sup>o</sup> C y se realizó anaerobiosis, monitoreando la cinética a tiempos de 0, 12, 24, 48, 72, 96, 120 y 144 hrs.

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

### 3.6.3 Curva de crecimiento en medio líquido específico para producir celulasa:

Se preparó el medio líquido específico para inducir al microorganismo a la producción de celulasa. En un matraz Erlenmeyer de 250 mL se agregaron 100 mL de agua destilada y se disolvieron NaCl, NaNO<sub>3</sub>, KCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub> (cuadro 7), posteriormente se solubilizaron y esterilizaron. La fuente de carbono (celulosa), previamente disuelta en 50 mL de agua destilada, fue adicionada una vez que el medio se encontraba a temperatura ambiente (cuadro 7).

Se vaciaron 4 mL de este medio en tubos de ensaye (triplicado) se inocularon 10 µl de una suspensión celular bacteriana obtenida de un cultivo puro en tubo; posteriormente se incubaron a 40° C y se realizó anaerobiosis, monitoreando la cinética a tiempos de 0, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192 y 216 hrs.

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

Cuadro 7. Composición química del medio líquido específico para producir celulasa

<b>Componente</b>	<b>Cantidad (%)</b>
NaCl	.5%
NaNO <sub>3</sub>	.3%
KCl	.5%
Fuente de C (celulosa) Carboximetil celulosa de sodio (GOLDEN BELL)	1%
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	.2%
MgSO <sub>4</sub>	.01%

#### 3.6.4 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 4500 rpm (SOLBAT) por 20 minutos. 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 0.5 g celulosa (Carboximetil Celulosa de Sodio) para posteriormente disolverlos en 50 mL de agua destilada.

### Cinética enzimática

Se agregaron 145 µL de sustrato en tubos de ensaye (duplicado) y se colocaron en baño maría (Napco Model 210A) a 40° C. Se añadieron 5 µL de extracto enzimático obtenido a los diferentes tiempos de fermentación, monitoreando a tiempos de 0, 5, 10, 15, 30, 45 y 60 minutos.

### Cuantificación de proteína Biuret

El producto obtenido de la cinética enzimática se cuantifico mediante la técnica de proteínas totales. La técnica consiste en agregar 500 µL de reactivo Biuret a cada tubo y leer la absorbancia en un espectrofotómetro a 540 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 8).

Cuadro 8. Preparación de muestras para cuantificación de proteínas totales por el método de Biuret

	<b>Blanco</b>	<b>Patrón</b>	<b>Muestra</b>
Agua destilada	150 µL	-----	-----
Sustrato	-----	-----	145 µL
Extracto enzimático	-----	-----	5 µL
Reactivo Biuret	500 µL	500 µL	500 µL
TP	-----	10 µL	-----

Para el análisis de datos se empleó la siguiente ecuación:

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

A = Absorbancia

### 3.6.5 Determinación de Azúcares Reductores (Somogy-Nelson):

La técnica de La técnica de azúcares reductores se siguió mediante el método propuesto por Somogyi 1952, Nelson 1944.

**\*Reactivo 1 (Somogyi):**

Solución A: 25 g de carbonato de sodio anhidrido ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), 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 ( $\text{NaHCO}_3$ ) y 200 g de sulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) 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 ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 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 ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 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 arsenito 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.

Las muestras obtenidas de los diferentes tiempos, fueron centrifugadas a 4500 rpm (SOLBAT) por 20 minutos. 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 0.5 g celulosa (Carboximetil Celulosa de Sodio) para posteriormente disolverlos en 50 mL de agua destilada.

Cinética enzimática

Se agregaron 145  $\mu\text{L}$  de sustrato en tubos de ensaye (duplicado) y se colocaron en baño maría (Napco Model 210A) a 40° C. Se añadieron 5  $\mu\text{L}$  de extracto enzimático obtenido a los diferentes tiempos de fermentación, monitoreando a tiempos de 0, 5, 10, 15, 30, 45 y 60 minutos.

### 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  $\mu$ L del reactivo 1 Somogy. Se incubó en baño de agua hirviendo a 90° C durante 10 minutos. Se retiró del agua hirviendo y se dejó enfriar a temperatura ambiente, posteriormente, se agregaron 250  $\mu$ L de reactivo 2 Nelson y se agitó vigorosamente. Se agregaron 4 mL de agua destilada y se agitó. Finalmente se midió la absorbancia en un espectrómetro a una longitud de onda de 660 nm.

Una unidad de actividad celulosa se define como:

**U**= Cantidad de azúcares reductores liberados en mg/ml por cada ml de proteína en 1 hora, empleando celulosa al 1%

## **4. RESULTADOS Y DISCUSIONES**

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

### **ETAPA I**

#### Acondicionamiento a los animales en estudio, mediante una dieta balanceada, adicionada con subproductos agroindustriales (masilla y levadura) y obtención de líquido ruminal

##### 1. Obtención de líquido ruminal

Para obtener el líquido ruminal, se emplearon 5 vacas Holstein primíparas y multíparas alimentadas bajo condiciones balanceadas adicionando subproductos de la industria cervecera (ver metodología, cuadro 5) por un periodo de 121 días, con el propósito de adaptar la flora microbiana presente en el rumen (figura 7); ya que una adaptación inadecuada de dietas rápidamente fermentables puede ser causa de una acidosis. El mayor riesgo existe cuando se hace un cambio brusco al introducir grandes cantidades de concentrado a animales que consumen una dieta forrajera, es decir, cuando no existe adaptación. Un periodo de transición es necesario para la adaptación de las poblaciones microbianas y de las papilas ruminales (Blanch, 2009).

La estrategia alimentaria de los rumiantes se basa en la simbiosis establecida entre los microorganismos ruminales y el animal. Mientras el rumiante aporta alimentos y las condiciones adecuadas del medio como temperatura, acidez, anaerobiosis y ambiente reductor, las bacterias utilizan parcialmente los alimentos degradando los forrajes, generando productos de la fermentación con valor nutritivo para el animal (principalmente ácidos grasos volátiles) y proteína microbiana. Cuando esta relación simbiótica se altera debido a cambios en la

ración o por la presencia de sustancias tóxicas, se produce un desequilibrio en el microambiente ruminal llevando a patologías como la acidosis o alteraciones.



Figura 7. Fotografía de obtención de líquido ruminal mediante bomba nasogástrica

## **ETAPA II**

### **Aislamiento preliminar de microorganismos bacterianos en agar nutritivo**

#### **1. Identificación macroscópica de los microorganismos**

Se prepararon placas de agar nutritivo y se registraron las características macroscópicas de los microorganismos cultivados a las 24 y 48 h de incubación a 40°C. El cuadro 9 muestra los resultados obtenidos, donde se puede apreciar que se lograron aislar 20 microorganismos; las formas predominantes de las colonias fueron las de forma circular. Lo cual coincide con lo reportado por Rodríguez *et al.*, (1996) fueron registradas seis apariencias posibles para las colonias de cepas celulolíticas: presentando una morfología microscópica cocoide con perfecta definición en sus bordes (enteros) en su morfología colonial (macroscópica).

Cuadro 9. Morfología macroscópica de los microorganismos aislados en agar nutritivo.

<b>Caja # 903 VML</b>											
Colonia	Tamaño	Color	Forma	Elevación	Superficie	Aspecto	Bordes	Luz reflejada	Luz transmitida	Consistencia	#
1	1 mm	Anaranjado	Circular	Pulvinada	Lisa	Húmeda	Enteros	Brillante	Traslúcida	Suave	3
2	-----	Blanco	Puntiforme	Umbonada	Granular	Seca	Irregular	Mate	Opaca	Dura	27
3	-----	Blanco	Irregular	Convexa	Lisa	Húmeda	Enteros	Mate	Opaca	Suave	3
4	-----	Blanco	Circular	Convexa	Lisa	Húmeda	Enteros	Mate	Opaca	Suave	17
5	-----	Blanco	Irregular	Plana	Lisa	Húmeda	Enteros	Brillante	Traslúcida	Suave	7
6	-----	Blanco	Circular	Convexa	Lisa	Húmeda	Enteros	Brillante	Traslúcida	Suave	32
7	2 mm	Amarillo canario	Circular	Convexa	Lisa	Húmeda	Enteros	Mate	Opaca	Suave	3
<b>Caja # 763 VML</b>											
8	2 mm	Anaranjado	Circular	Pulvinada	Lisa	Húmeda	Enteros	Brillante	Traslúcida	Suave	1
9	1 mm	Blanco	Circular	Convexa	Lisa	Húmeda	Enteros	Mate	Opaca	Suave	76
10	3 mm	Blanco	Circular	Convexa	Lisa	Húmeda	Enteros	Mate	Opaca	Suave	3
11	-----	Blanco	Puntiforme	Plana	Granular	Húmeda	Enteros	Mate	Opaca	Suave	9
12	-----	Anaranjado pálido	Circular	Convexa	Lisa	Húmeda	Enteros	Brillante	Traslúcida	Suave	2
<b>Caja # 283 VML</b>											
13	4mm	Blanco	Circular	Convexa	Lisa	Húmeda	Enteros	Mate	Opaca	Suave	31
14	-----	Amarillo canario	Circular	Convexa	Lisa	Húmeda	Enteros	Brillante	Traslúcida	Suave	2
15	-----	Amarillo paja	Circular	Convexa	Lisa	Húmeda	Enteros	Brillante	Traslúcida	Suave	4
16	-----	Beige	Irregular	Convexa	Rugosa	Húmeda	Enteros	Mate	Opaca	Suave	1
17	-----	Blanco	Irregular	Plana	Lisa	Húmeda	Enteros	Mate	Opaca	Suave	2
<b>Caja # 873 VML</b>											
18	-----	Blanco	Puntiforme	Plana	Granular	Seca	Irregular	Mate	Opaca	Dura	18
19	3 mm	Amarillo	Circular	Convexa	Lisa	Húmeda	Enteros	Brillante	Traslúcida	Suave	14
20	4 mm	Anaranjado pálido	Irregular	Umbonada	Rugosa	Seca	Irregular	Mate	Traslúcida	Suave	2

*Estudio microbiológico de líquido ruminal de ganado Holstein alimentado con dietas enriquecidas con productos de la industria cervecera (masilla y levadura)*

21	2 mm	Blanco	Circular	Convexa	Lisa	Húmeda	Enteros	Mate	Opaca	Suave	83
<b>Caja # 343 VML</b>											
22	-----	Anaranjado	Circular	Convexa	Lisa	Húmeda	Enteros	Brillante	Opaca	Suave	8
23	-----	Anaranjado pálido	Circular	Plana	Lisa	Húmeda	Enteros	Brillante	Opaca	Suave	4
24	-----	Blanco	Irregular	Plana	Rugosa	Seca	Irregular	Mate	Opaca	Dura	12

**VML**= Vaca alimentada con masilla y levadura

En el cuadro 9 se puede apreciar que cuatro cepas presentaron la misma morfología colonia (color azul, rojo, negro); por lo que los siguientes estudios se realizaron sobre las 20 cepas diferentes únicamente.

Comparando las colonias macroscópicamente (cuadro 9 y figura 8), se puede observar que la colonia 1, de la caja # 903 y la colonia 8 de la caja # 763 coinciden en todas sus características morfológicas macroscópicas; hay que considerar que aunque esto suceda, no es información suficiente para afirmar que se trate de la misma cepa, ya que varias colonias bacterianas pertenecientes a distinto género y especie pueden presentar morfologías macroscópicas similares. Lo mismo se observó para las colonias 4, 9, 13 y 21 de las cajas # 903, 703, 283 y 873 respectivamente; sin embargo, las colonias 9 y 10 de la caja # 703 son iguales en color, forma, elevación, superficie, aspecto, bordes, luz reflejada, luz transmitida, consistencia; pero son diferentes en tamaño.

En general la mayoría de las colonias sembradas en agar nutritivo son de color blanco, forma circular, aspecto húmedo, bordes enteros y consistencia suave, lo cual nos habla de una predominancia de ciertas cepas en el contenido ruminal.

Las colonias 1, 8 y 22 presentaron color anaranjado, sin embargo la número 22 difiere de las anteriores en elevación (convexa) y en luz transmitida (opaca).

Mientras que las colonias 7 y 14 son diferentes en luz reflejada y luz transmitida. Las colonias 12, 20 y 23 son iguales en el color anaranjado pálido.

La figura 8 muestra la morfología colonial de las 5 cajas Petri sembradas con líquido ruminal en agar nutritivo

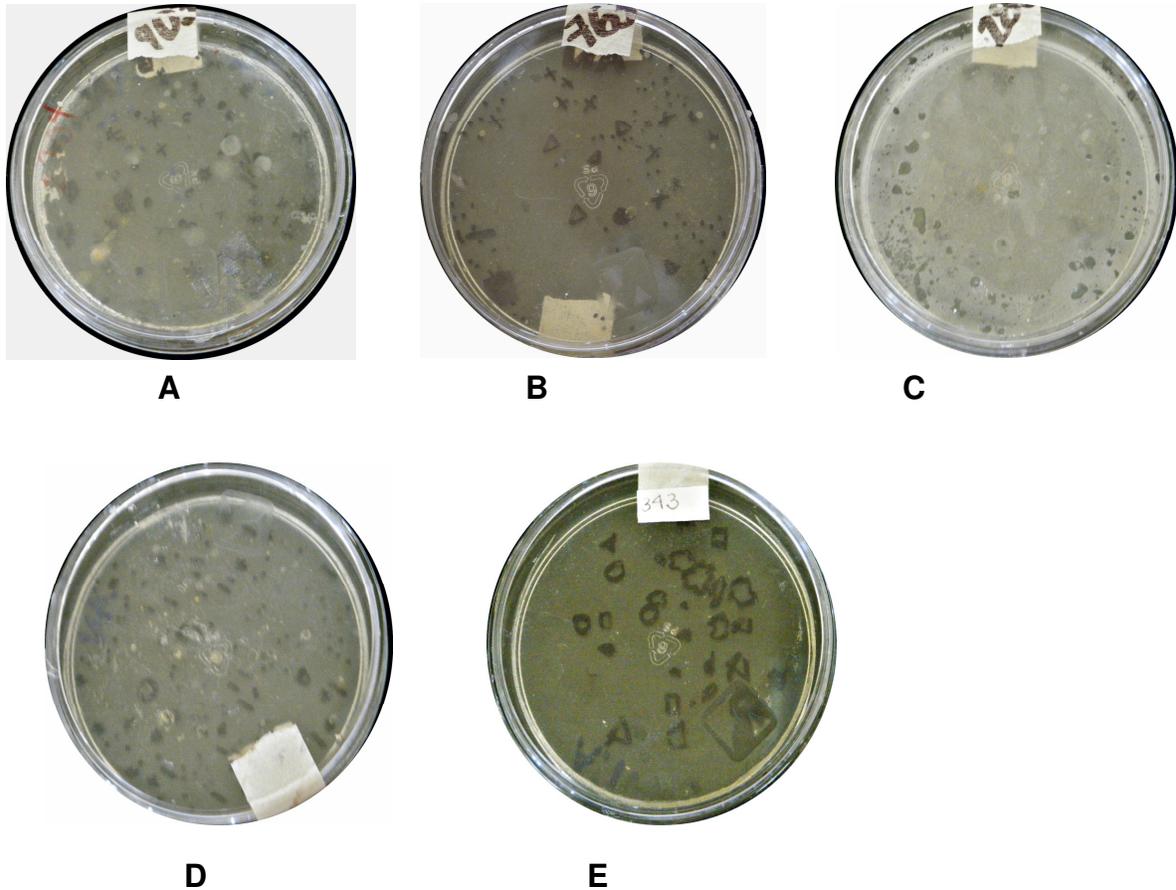


Figura 8. Fotografías de la morfología colonial de las 5 cajas Petri sembradas con líquido ruminal en agar nutritivo. A) Caja # 903VML, B) Caja # 763VML, C) Caja # 283VML, D) Caja # 873VML, E) Caja # 343VML.

### **ETAPA III**

#### Aislamiento de microorganismos bacterianos en medio de cultivo específico para anaerobios.

1. Identificación macro- y microscópica de los microorganismos cultivados.

Se registró la morfología colonial y se realizó una tinción de Gram para observar la morfología microscópica la cual se presenta en el cuadro 10.

Cuadro 10. Morfología macro- y microscópica de los microorganismos aislados en agar Schaedler.

<b>Caja # 513 VML</b>												
Colonia	Tamaño	Color	Forma	Elevación	Superficie	Aspecto	Bordes	Luz reflejada	Luz transmitida	Consistencia	#	Gram
1	-----	Beige	Irregular	Convexa	Lisa	Húmeda	Enteros	Mate	Opaca	Suave	3	Cocobacilos Gram -
2	4 mm	Blanco	Circular	Convexa	Lisa	Húmeda	Enteros	Mate	Opaca	Suave	8	Cocobacilos Gram -
3	2 mm	Anaranjado pálido	Circular	Plana	Lisa	Húmeda	Enteros	Brillante	Traslúcida	Suave	3	-----
4	6 mm	Amarillo	Circular	Convexa	Lisa	Húmeda	Enteros	Mate	Opaca	Suave	4	-----
5	-----	Blanco	Irregular	Plana	Lisa	Húmeda	Irregular	Mate	Opaca	Suave	1	Cocos Gram -
6	-----	Blanco	Irregular	Convexa	Lisa	Húmeda	Enteros	Mate	Opaca	Suave	1	Bacilos Gram -
7	5 mm	Marrón	Circular	Plana	Rugosa	Húmeda	Enteros	Mate	Opaca	Suave	1	Cocos Gram -
<b>Caja # 953 VML</b>												
8	5 mm	Rosa pálido	Circular	Pulvinada	Lisa	Húmeda	Enteros	Mate	Opaca	Suave	1 4	Bacilos Gram -
9	1 mm	Blanco	Circular	Pulvinada	Lisa	Húmeda	Enteros	Mate	Opaca	Suave	3 8	Cocos Gram +
10	-----	Beige	Irregular	Convexa	Lisa	Húmeda	Enteros	Mate	Opaca	Suave	2	Bacilos Gram -
<b>Caja # 643 VML</b>												
11	4 mm	Blanco	Circular	Convexa	Lisa	Húmeda	Enteros	Mate	Opaca	Suave	2	Cocobacilos Gram -
12	-----	Beige	Irregular	Umbonada	Rugosa	Húmeda	Irregular	Mate	Opaca	Suave	2	Bacilos Gram +
13	-----	Anaranjado pálido	Circular	Convexa	Lisa	Húmeda	Enteros	Mate	Opaca	Suave	1	Bacilos Gram -
14	-----	Blanco	Irregular	Convexa	Lisa	Húmeda	Enteros	Mate	Opaca	Suave	1	Bacilos Gram -
15	-----	Blanco	Puntiforme	Umbonada	Granular	Húmeda	Filamen	Mate	Opaca	Suave	1	-----

*Estudio microbiológico de líquido ruminal de ganado Holstein alimentado con dietas enriquecidas con productos de la industria cervecera (masilla y levadura)*

												Tosos		
<b>Caja # 193 VML</b>														
<b>16</b>	5 mm	Blanco	Circular	Plana	Lisa	Húmeda	Enteros	Mate	Opaca	Suave	17	Bacilos Gram -		
<b>17</b>	4 mm	Amarillo paja	Circular	Plana	Lisa	Húmeda	Enteros	Brillante	Traslúcida	Suave	3	-----		
<b>18</b>	2 mm	Anaranjado	Circular	Convexa	Lisa	Húmeda	Enteros	Brillante	Traslúcida	Suave	1	-----		
<b>19</b>	6 mm	Amarillo	Circular	Plana	Lisa	Húmeda	Enteros	Mate	Opaca	Suave	1	-----		
<b>20</b>	8 mm	Beige	Circular	Convexa	Lisa	Húmeda	Enteros	Brillante	Traslúcida	Suave	2	-----		
<b>Caja # 563 VML</b>														
<b>21</b>	-----	Amarillo	Irregular	Plana	Lisa	Húmeda	Irregular	Brillante	Opaca	Suave	1	-----		
<b>22</b>	-----	Anaranjado pálido	Circular	Convexa	Lisa	Húmeda	Enteros	Brillante	Opaca	Suave	3	Bacilos Gram -		
<b>24</b>	-----	Anaranjado	Circular	Convexa	Lisa	Húmeda	Enteros	Brillante	Opaca	Suave	1	-----		

**VML=** Vaca alimentada con masilla y levadura

Se consiguieron definir morfológicamente 24 colonias, de las cinco vacas a las que se les extrajo el líquido ruminal.

La figura 9 muestra la fotografía de la morfología macroscópica colonial de las bacterias aisladas de líquido ruminal de bovinos sembradas en agar Schaedler.

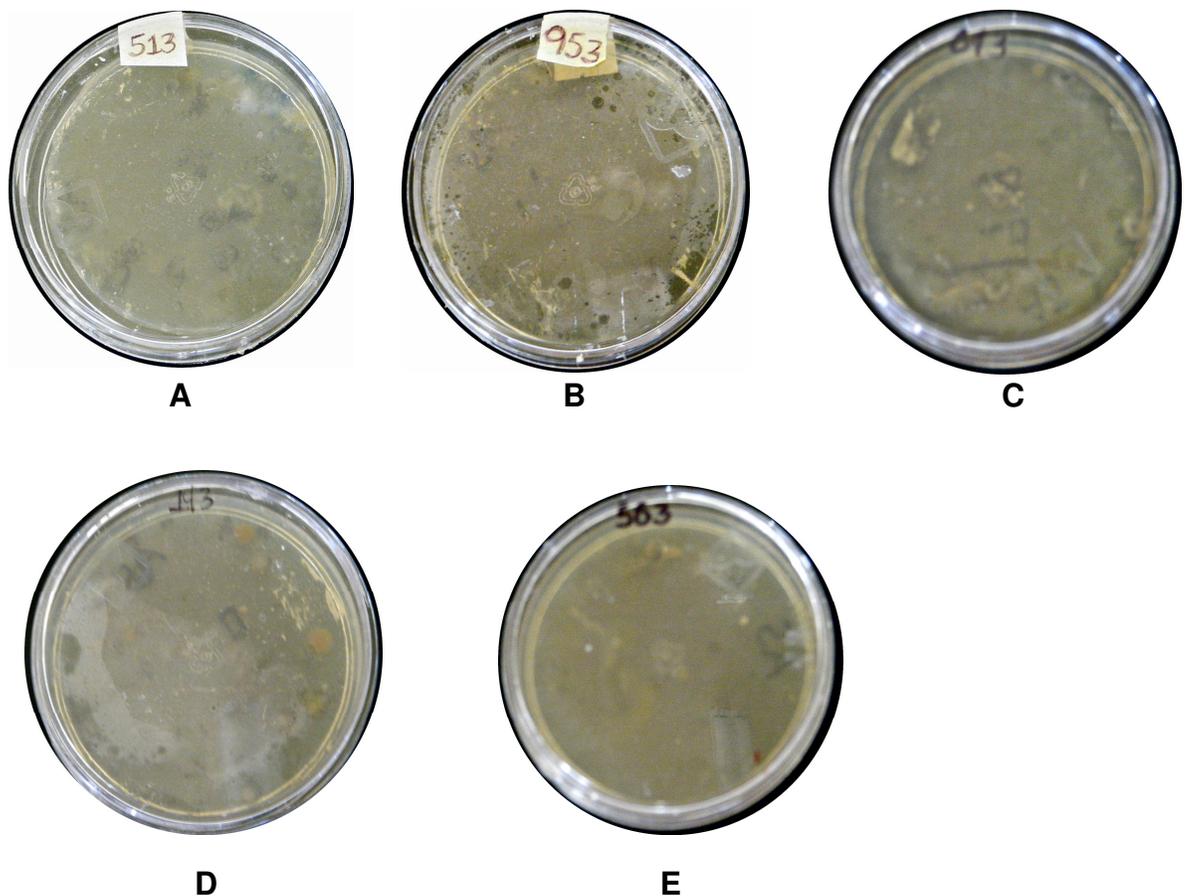


Figura 9. Fotografías de la morfología colonial de las 5 cajas Petri sembradas con líquido ruminal en agar Schaedler. A) Caja # 513VML, B) Caja # 953VML, C) Caja # 643VML, D) Caja # 193VML, E) Caja # 563VML.

El conocimiento y comprensión de la ecofisiología microbiana ruminal son imprescindibles para mejorar la utilización de los alimentos proporcionados al ganado y como consecuencia de ello incrementar la eficiencia de producción. El rumiante recién nacido queda expuesto a muchas poblaciones microbianas

diferentes durante el parto y son estas las que posteriormente contribuyen al establecimiento de la población microbiana gastrointestinal. Estas poblaciones tienen su origen en; la vagina, la saliva de la madre, bolo alimenticio, estiércol, flora ambiental, otros animales, la ubre y la leche y otras fuentes alimenticias. Las más importantes son el contacto entre animales y los alimentos disponibles (Blanch, 2009).

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

Desde el punto de vista de la fermentación, el rumen es un ente bastante independiente del animal. No obstante ambos interactúan y, tanto las bacterias como el animal se benefician mutuamente. El rumen posee una serie de características que intervienen en el crecimiento de los organismos (Calsamiglia, 2008).

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

Haciendo una comparación de la morfología macro- y microscópica, se observa que la colonia 1 de la caja # 513 y la colonia 10 de la caja # 953 coinciden en todas sus características morfológicas (cuadro 10). Al realizar la tinción de Gram de la colonia #1, se pudo notar que la cepa es un microorganismo Gram negativo. La morfología microscópica indica que se trata de un microorganismo en forma de cocobacilos pequeños (figura 10). De acuerdo a Mateo-Sánchez *et al.*, (2002) el cocobacilo es una bacteria Gram negativa, no motil, esférica de 0.8-1.0 mm. Mientras que la colonia # 10 es un microorganismo Gram negativo y la morfología microscópica muestra que tienen forma de bacilos gruesos y largos (figura 11).

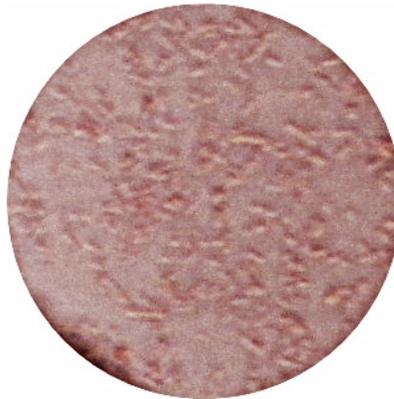


Figura 10. Morfología microscópica de la colonia # 1 aislada de líquido ruminal.



Figura 11. Morfología microscópica de la colonia # 10 aislada de líquido ruminal.

La colonia 2 y la colonia 11 presentaron características macroscópicas similares y de tinción (Gram negativas), sin embargo los microorganismos de la colonia 11 poseen mayor grosor y son ligeramente más grandes que los observados en la colonia 2, como se puede apreciar en las figuras 12 y 13.

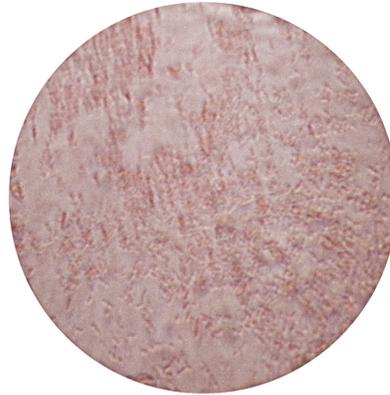


Figura 12. Morfología microscópica del microorganismo # 2 aislado de líquido ruminal.

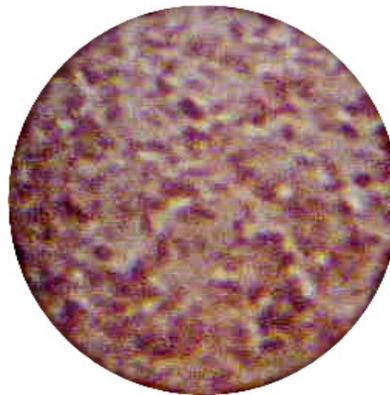


Figura 13. Morfología microscópica del microorganismo # 11 aislado de líquido ruminal.

Kumar *et al.*, (1994), Wiedmeier *et al.*, (1987), Harrison *et al.*, (1988), y Dawson *et al.*, (1990) indican que la levadura incrementa el número de bacterias totales, bacterias viables totales, celulolíticas, amilolíticas y protozoarios.

La colonia 5 presenta una morfología microscópica definida en cocobacilos pequeños y Gram negativos, como se muestra en la figura 14, las características macroscópicas de dicha colonia se mencionaron con anterioridad (cuadro 10). Una morfología microscópica similar se observó en los microorganismos de la colonia 7 (figura 22); sin embargo, la morfología macroscópica que presenta es completamente distinta.

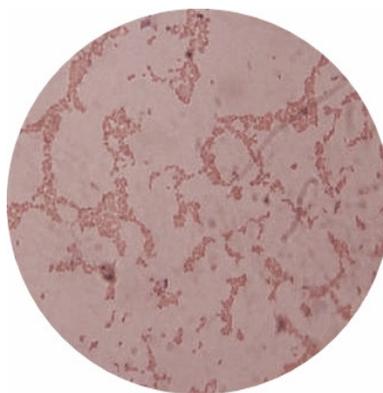


Figura 14. Morfología microscópica del microorganismo # 5 aislado de líquido ruminal.

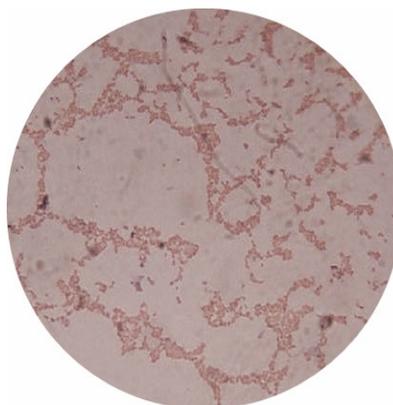


Figura 15. Morfología microscópica del microorganismo # 7 aislado de líquido ruminal

El análisis microscópico de la colonia 8 indica que se trata de microorganismos bacilares, Gram negativos, gruesos y cortos (figura 16); dicha morfología difiere completamente de la apreciada en las otras cepas aisladas.



Figura 16. Morfología microscópica del microorganismo # 8 aislado de líquido ruminal.

La colonia 9 está compuesta de microorganismos Gram positivos, los cuales presentan una coloración azul-morada (figura 17); esto se debe a que las paredes celulares son más gruesas (tienen más peptidoglicano y menos lípidos), no son permeables al disolvente empleado en la decoloración (alcohol-cetona) ya que éste deshidrata la pared celular y cierra los poros, disminuyendo de esta manera los espacios entre las moléculas, y provocando que el complejo cristal violeta-yodo quede atrapado dentro de la pared celular (Bergey, 2005).

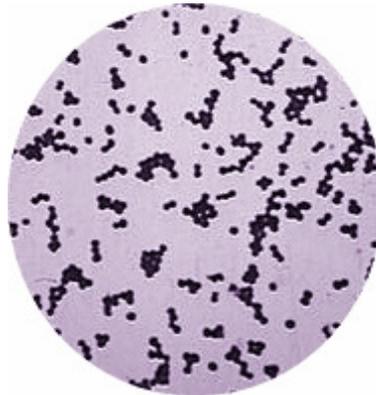


Figura 17. Morfología microscópica del microorganismo # 9 aislado de líquido ruminal

La misma coloración se presentó en los microorganismos pertenecientes a la colonia 12, con la diferencia morfológica de que estos son bacilares,

alargados y en ocasiones se observaban formas curvas o torcidas en las células (figura 18).



Figura 18. Morfología microscópica del microorganismo # 12 aislado de líquido ruminal

Las colonias 13 y 22 coinciden en todas sus características morfológicas macro y microscópicas, Gram negativos, con estructura bacilar y ligeramente gruesa (figura 19).

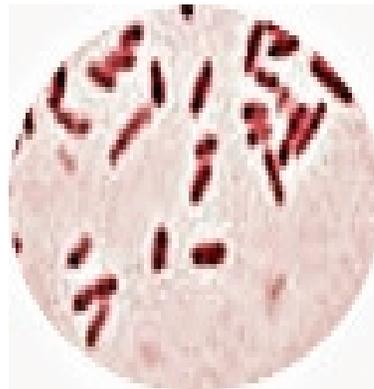


Figura 19. Morfología microscópica del microorganismo # 13 aislado de líquido ruminal.

La colonia 16 con las siguientes características morfológicas color blanco; forma circular; elevación convexa; superficie lisa; aspecto húmedo; bordes enteros; luz reflejada mate; luz transmitida opaca y consistencia suave, resulto ser Gram negativo con forma de bacilos esporulados (figura 20).

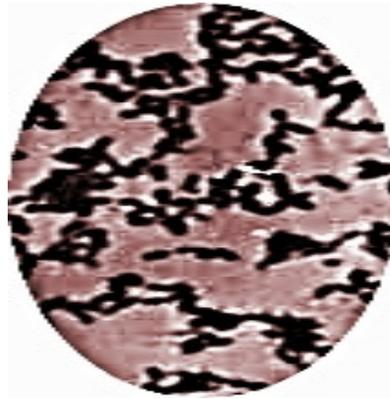


Figura 20. Morfología microscópica del microorganismo # 16 aislado de líquido ruminal.

Es importante mencionar que los aislamientos se realizaron en medios de cultivo convencionales para microorganismos anaerobios, ya que reportes en la literatura mencionan que los medios de cultivo para el aislamiento de microorganismos ruminales se dividen en 2 grupos: 1) medios con contenido ruminal clarificado enriquecidos con glucosa, celobiosa, almidón, sales minerales, cisteína y en algunos casos, extracto de levadura; y 2) medios sin contenido ruminal clarificados a los cuales se ha tenido que adicionar además de los componentes mencionados, ácidos grasos volátiles en pequeñas cantidades, hemina, y una serie de sustancias que asemejan el medio usando contenido ruminal.

En ambos tipos de medios se hace necesario la adición de sustancias químicas que son factores de crecimiento (Caldwell, 1966); sin embargo, la elaboración de medios modificados a partir de sustratos de gran valor nutricional, en cuanto a nitrógeno y carbohidratos se refiere, representan elevados costos, por lo que se debe buscar alternativas para el aislamiento de estos microorganismos mediante el diseño de medios que minimicen el empleo de sustancias químicas adicionales.

## **ETAPA IV**

### Purificación y mantenimiento de las cepas

La figura 21 muestra la fotografía de las colonias en tubo de cultivo; se empleó AS y TGNa (tioglicolato de sodio) como medios de mantenimiento y conservación de las cepas para su posterior uso.

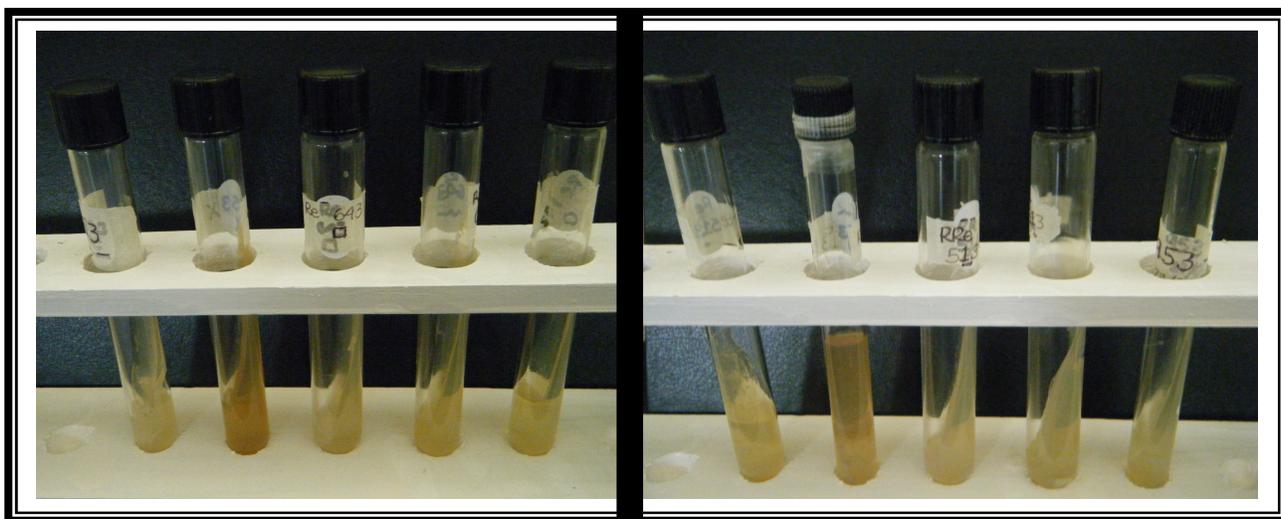


Figura 21. Fotografía de las cepas aisladas conservadas en tubos de cultivo con AS y TGNa.

Al sembrar las cepas puras en los tubos de cultivo, se observó un oscurecimiento en el color del medio en las cepas 3 y 10, esto puede ser debido a que las cepas arrojan pigmentos, o bien por el tiempo de almacenamiento de los mismos.

## **ETAPA V**

### **Identificación del metabolismo bioquímico de las cepas bacterianas obtenidas**

#### Identificación de las cepas mediante pruebas bioquímicas

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.

El cuadro 11 indica los resultados bioquímicos obtenidos al analizar los procesos y requerimientos metabólicos de los microorganismos aislados.

Cuadro 11. Resultados de las pruebas bioquímicas para las cepas.

CEPA	MacConkey		Citrato de Simmons	
	48 h	72 h	48 h	72 h
Cepa 1 caja # 513 VML	-	-	-	+
Cepa 2 caja # 513 VML	-	+	+	+
Cepa 5 caja # 513 VML	-	+	+	+
Cepa 7 caja # 513 VML	+	+	+	+
Cepa 8 caja # 953 VML	-	-	+	+
Cepa 9 caja # 953 VML	-	-	-	+
Cepa 10 caja # 953 VML	-	-	-	+
Cepa 12 caja # 643 VML	-	-	-	-
Cepa 13 caja # 643 VML	-	-	-	-
Cepa 16 caja # 193 VML	-	-	-	-

La cepa 1 es lactosa negativa (figura 22), y citrato negativo a las 48 h y positivo a las 72 h, ya que se observó un cambio de vire en el indicador azul de bromotimol. Las bacterias que metabolizan el citrato liberan iones amonio al medio (degradación del fosfato amónico) lo que provoca que este se alcalinice y el indicador vire a azul.



Figura 22. Prueba bioquímica Agar MacConkey negativo (cepa 1).

La cepa 2 es citrato positivo y lactosa positiva hasta las 72 h, ya que la hidrólisis de la lactosa produce ácidos orgánicos y las colonias que la hidrolizan adquieren un color rojo.

La cepa 5 es lactosa positiva a partir de las 72 h y citrato positivo (figura 23), lo cual significa que la cepa posiblemente sea una enterobacteria.



Figura 23. Prueba bioquímica Citrato de Simmons positivo (cepa 5).

La cepa 7 es lactosa y citrato positiva, lo cual nos indica que la cepa probablemente se trate de una enterobacteria que hidroliza lactosa.

La cepa 8 es lactosa negativo y citrato positivo (figura 24) lo cual nos indica que es una enterobacteria que no hidroliza lactosa.



Figura 24. Prueba bioquímica Citrato de Simmons positivo (cepa 8).

La cepa 9 es citrato positivo a partir de las 72 h y lactosa negativo, por lo que los resultados coinciden con la literatura, ya que el Citrato de Simmons es medio diseñado principalmente para bacterias Gram negativo (Bergey, 2005), por lo que muchas Gram positivas, como es el caso de esta cepa, tienden a dar un resultado negativo en esta prueba.

La cepa 10 es lactosa negativo y citrato positivo con crecimiento a partir de las 72 h, como se muestra en la figura 25.



Figura 25. Prueba bioquímica Citrato de Simmons positivo (cepa 10).

Las cepas 12, 13 y 16 probablemente no sean enterobacterias, ya que las tres resultaron lactosa y citrato negativo.

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

*Streptococcus bovis* es una bacteria que normalmente se encuentra en bajo número en el rumen (Mantovani, Russell, 2001), pero su número puede aumentar rápidamente si se cambia bruscamente la dieta del animal de forrajera a concentrado. Esta bacteria tiene una actividad amilasa muy elevada, crece rápidamente y puede desplazar al resto de las bacterias cuando la dieta

es rica en almidón. Además *S. bovis* produce acetato, formiato, y etanol cuando las concentraciones de carbohidratos en la dieta son bajas, pero cuando la disponibilidad de hidratos de carbono altamente fermentables es elevada, tiene una fermentación homoláctica, debido a la inhibición de la enzima piruvato formatoliasa a pH's ácidos (Slyter, 1976).

Por otra parte, las especies utilizadoras de lactato, como pueden ser *Megasphaera elsdenii*, *S. ruminantium* spp. *lactylitica*, pueden reducir el riesgo de acidosis convirtiendo parte del lactato a acetato y propionato. *M. elsdenii* es una bacteria Gram negativa que se encuentra en el rumen principalmente de animales jóvenes (Hobson, 1958) y en animales que reciben raciones altas de concentrado, en la que la producción de lactato asume principal importancia. Esta bacteria contribuye en 74±13% a la fermentación de lactato, aunque está influenciado por el tipo de dieta administrada y por el animal (Counotte, 1983). Además, su actividad no está sujeta a la represión por parte de la glucosa o maltosa, y su contribución al metabolismo del lactato incrementa como respuesta a la administración de carbohidratos solubles, los cuales reprimen la función de *Selenomonas* y otras bacterias utilizadoras de lactato (Counotte, 1981). Sin embargo, el crecimiento de *M. elsdenii* es más lento que el de *S. bovis*.

Existen varios trabajos y revisiones acerca de los efectos de la inclusión de levaduras vivas en las raciones de rumiantes y se han descrito varios mecanismos de acción (Newbold, 1996). Por un lado, resulta de un incremento en el número total de microorganismos, el cual se explica por un aporte de nutrientes (principalmente malato, además de aminoácidos, vitamina B, etc.) por parte de las levaduras, y al consumo del oxígeno para su respiración. Este medio más rico en nutrientes y a la vez más anaeróbico, propicia el aumento de bacterias celulolíticas como *Fibrobacter succinogenes* y *Ruminococcus albus*, el de bacterias utilizadoras de ácido láctico (Nisbet, 1991) y el de hongos celulolíticos como *Neocallimastix frontalis* (Chaucheryas, 1995). Además, las levaduras disminuyen la concentración de lactato: por un lado parecen estimular

la utilización de lactato por parte de *S. ruminantium* y el de *M. elsdenii* (Chaucheyras, 1996) resultando en un aumento de propionato (Lila, 2004), y por otra parte, disminuyen la producción de lactato por parte de *S. bovis*, ya que las levaduras compiten con esta bacteria por la glucosa (Chaucheyras, 1996).

El mecanismo de acción de los cultivos de levaduras no se basa en los efectos de la levadura como organismo vivo, y es debido a su alto contenido de nutrientes ( $\beta$ -glucanos, nucleótidos, ácidos orgánicos, aminoácidos y/o vitaminas). Por consiguiente se ha mostrado que estimulan el crecimiento de bacterias celulolíticas y de bacterias utilizadoras de ácido láctico, con el consiguiente descenso de lactato en el medio (Nisbet, 1991).

## **ETAPA VI**

### Empleo de un microorganismo bacteriano para la producción de una enzima celulasa de interés industrial, mediante el diseño de un medio de cultivo inductor.

Las bacterias enfrentan constantes condiciones que limitan o impiden su crecimiento. La habilidad para colonizar un ambiente requiere de la capacidad del microorganismo para alternar periodos de rápida división celular y de crecimiento nulo. La curva normal de crecimiento bacteriano presenta 4 fases principales: a) fase de latencia o adaptación (lag), 2) fase de desarrollo logarítmica o exponencial (log), 3) fase de transición o estacionaria, y 4) fase declinación o muerte celular (Pérez-Del Ángel, 2009).

Con la finalidad de observar el comportamiento cinético de crecimiento de los microorganismos estudiados, se procedió a determinar las curvas de crecimiento empleando el medio adecuado y siguiendo el procedimiento descrito en la metodología. Únicamente se seleccionó una cepa para el estudio enzimático donde el criterio de selección fue: crecimiento homogéneo, menor

tiempo de crecimiento, no productora de gas ni de pigmentos. La cepa seleccionada fue la # 2.

1. Determinación de la curva de crecimiento microbiano en medio líquido (TGNa)

En la figura 26 se muestra el crecimiento típico de la cepa aislada en tioglicolato de sodio, observándose que antes de las 24 horas el microorganismo empieza con su fase exponencial lo cual representa un crecimiento adecuado, 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 0.0253 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 26) podemos observar que el microorganismo no tardó en adaptarse a los nutrientes del medio, por lo que no se observa una fase de adaptación, y el crecimiento exponencial se da de inmediato (en las primeras 12 h de fermentación). Posteriormente se observa una disminución en la turbidez, lo que indica un deterioro ambiental ocasionado por el agotamiento de nutrientes o la acumulación de desechos tóxicos que conllevan a la disminución del número de células viables, característica distintiva de la fase de muerte celular. La muerte de una población microbiana, como su crecimiento durante la fase exponencial, es usualmente logarítmica

(esto es, una proporción constante de células muere cada hora). Este patrón se mantiene incluso cuando el número total de células permanece constante debido a que las células simplemente fallan en lisarse después de morir (Bergey, 2005).

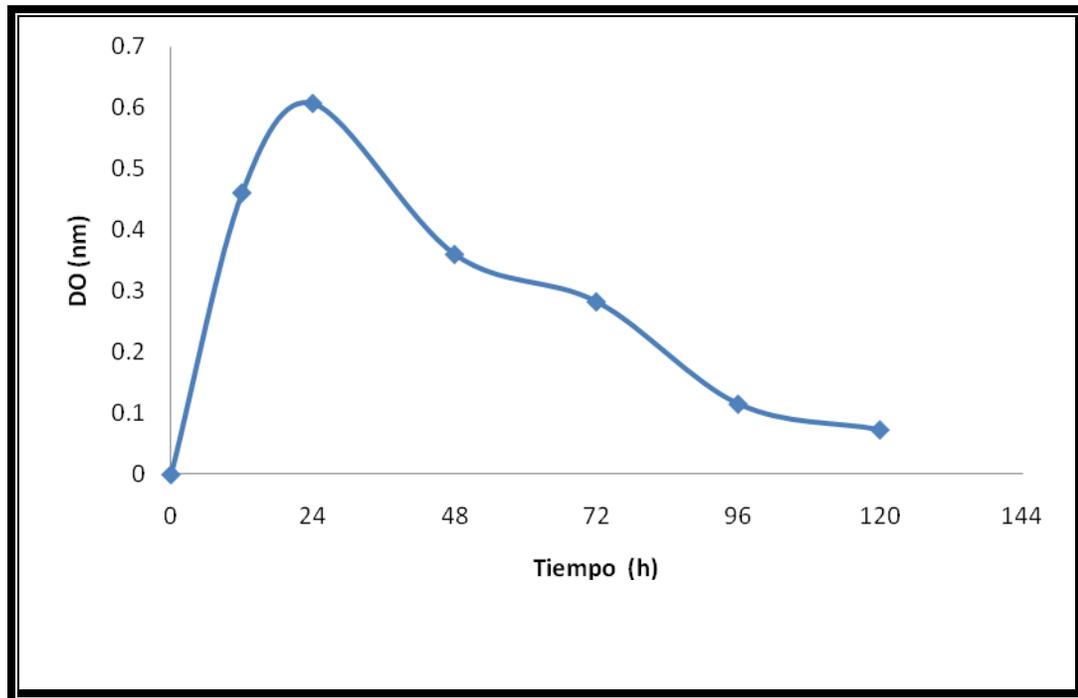


Figura 26. Curva de crecimiento de la cepa # 2 aislada en TGNa a 40 ° C

2. Curva de crecimiento en medio líquido específico para la producción de una celulasa.

Se diseñó un medio específico para la producción de la enzima celulasa, empleando como única fuente de carbono carboximetil celulosa. En la figura 27 se muestra el crecimiento de la cepa aislada en el medio líquido específico; en la cual se puede observar que alcanza su fase exponencial en las primeras horas de fermentación (24 h) con un  $\mu = 0.0427 \text{ DO/h}$ ; su fase estacionaria que

comienza a apreciarse después de las 24 h y finalmente se observa un descenso gradual durante el resto del estudio cinético.

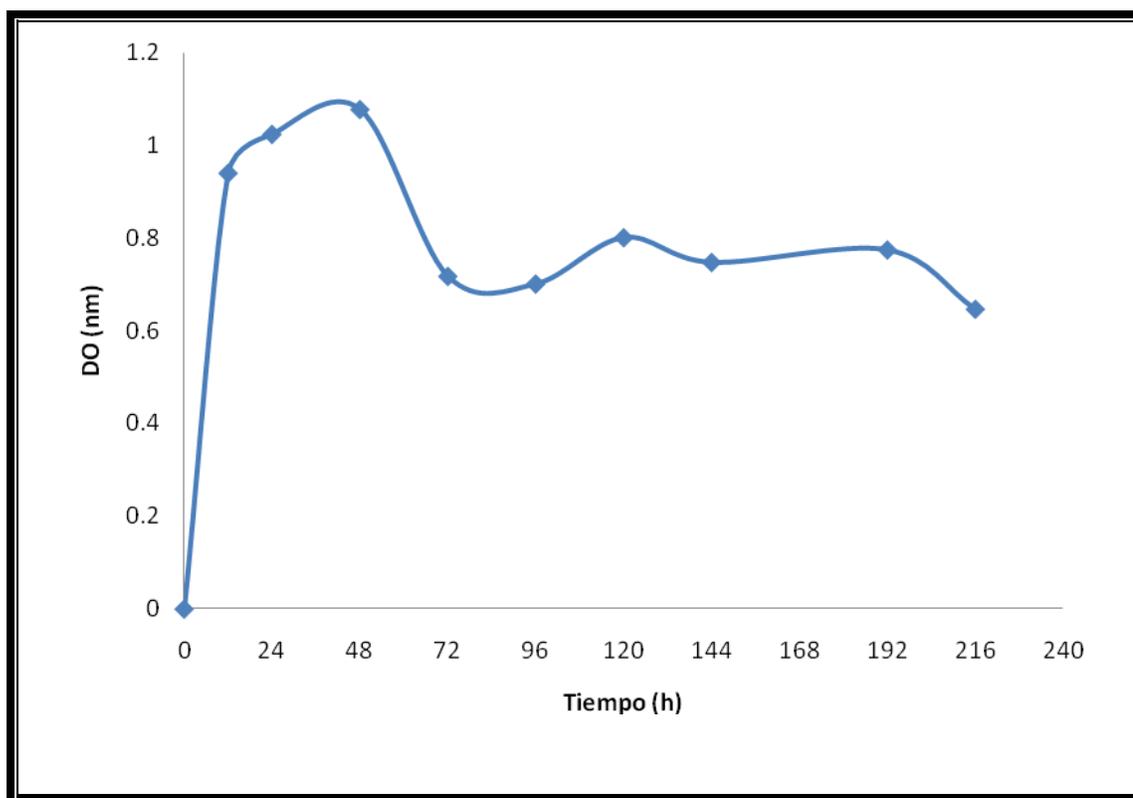


Figura 27. Curva de crecimiento de la cepa # 2 en medio líquido específico a 40° C

### 3. Determinación de proteína extracelular por el método de Biuret

Las bacterias son responsables de hidrolizar o degradar las macromoléculas que componen los sustratos presentes en los alimentos, como celulosa, hemicelulosa, almidón, grasas y aceites, y pectina (Carías y Valencia, 2008).

El principal aporte de los microorganismos en el rumen son las celulasas microbianas. La celulosa es la más importante fuente de carbono y energía en

la dieta del rumiante, pero el animal por sí mismo no produce las enzimas necesarias para digerir la celulosa. Como los microorganismos usan celulosa y otros carbohidratos presentes en las plantas como sus propias fuentes de energía y carbono, ellos aportan gran cantidad de productos ácidos grasos volátiles (AGV), los cuales son usados por el animal como fuente de carbono y energía (Grudsky y Arias 1983); por lo tanto, al microorganismo en estudio se le determinó proteína extracelular ya que cuando un haz de luz choca con una partícula en suspensión parte de la luz se dispersa, parte se refleja y parte se absorbe. Esta dispersión puede ser medida por turbidimetría ya que proporcionará un resultado en base a la concentración de proteína concreta, ya que se compara la cantidad de la luz dispersada, o la tasa de aumento de la dispersión, con los valores de estándares proteicos conocidos (Gorina, 1980).

La figura 28 muestra el comportamiento de la máxima producción de la enzima celulasa (extracto enzimático), donde se puede apreciar que la mayor concentración de proteína extracelular se obtiene a las 24 h de fermentación (65.74 g/L) transcurridos 15 minutos de reacción, sin embargo, la cantidad de proteína disminuye considerablemente después de 30 minutos de reacción. A las 72 h de fermentación se obtienen concentraciones de proteína extracelular de 60.61 g/L y se mantienen valores similares hasta los 45 minutos de reacción. A las 96 h de fermentación se observa que a los 45 min de reacción se incrementa nuevamente la concentración de proteína, la cual puede ser debido a que los microorganismos en condiciones de estrés (medios de cultivo específicos) producen proteasas que son liberadas al medio de cultivo provocando diferentes grados de proteólisis (Aguilar, 2002). Además es necesario conocer los mecanismos de acción enzimática de hidrólisis sobre el sustrato.

Reportes en la literatura mencionan que la microflora ruminal no se adapta rápidamente a la utilización de celulosa, por lo que la producción de la enzima se ve limitada (Weimer *et al.*, 1990).

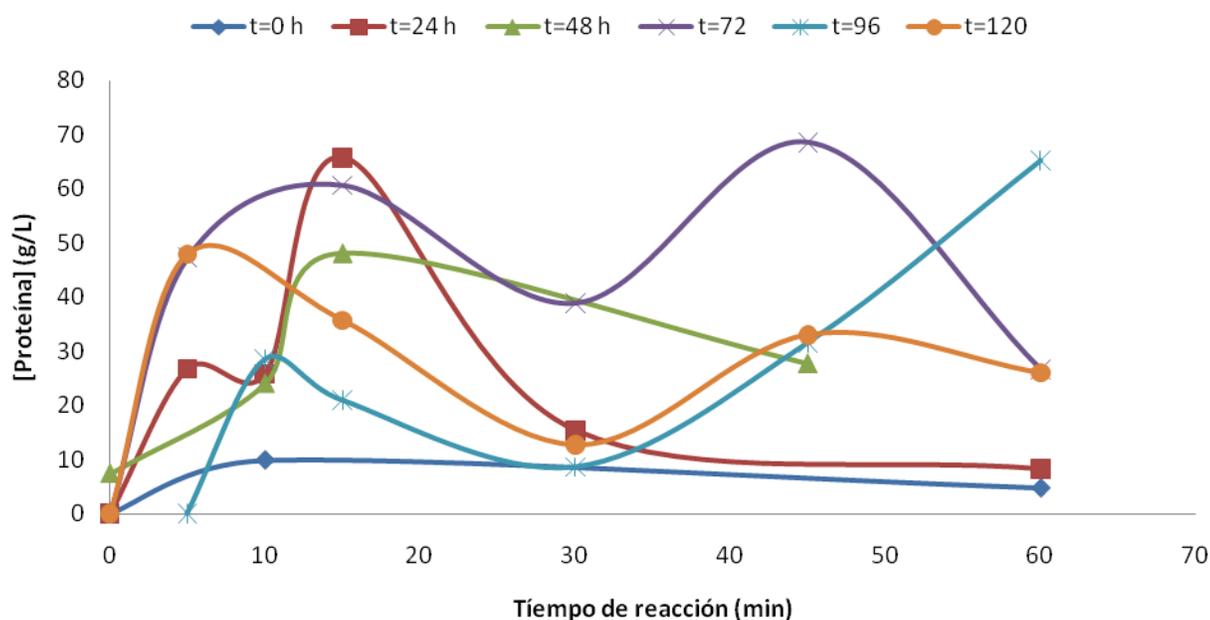


Figura 28. Cuantificación de proteína extracelular por el método de Biuret de la cepa # 2

#### 4. Determinación de actividad celulasa por Somogy-Nelson

La figura 29 muestra los resultados obtenidos de actividad celulasa, donde se observa que a las 24 h de fermentación se obtiene la mayor actividad enzimática con valores de 858 U; sin embargo, durante los tiempos posteriores los valores de actividad son muy bajos (0.10 U) comparados con el tiempo de 24 con velocidades iniciales ( $V_0$ ) de 35.4 y 0.16 mg/mL respectivamente; esto puede ser debido a que el microorganismo presentó su máximo crecimiento a este mismo tiempo, lo que indica que el metabolismo se encuentra a su máxima expresión produciendo todas las enzimas necesarias para poder aprovechar el sustrato o fuente de carbono disponible. La transformación de la celulosa por vía enzimática implica la acción de un sistema multienzimático; el complejo celulasas, constituido básicamente por tres enzimas; **endoglucanasa**, que ataca al azar enlaces  $\beta$ -1, 4-glicosídicos de la cadena de celulosa;

**exoglucosanasa**, que actúa sobre el extremo no reductor de la cadena dando lugar a unidades de celobiosa, y  **$\beta$ -glucosidasa**, que hidroliza específicamente celobiosa para dar lugar a glucosa (Lucas *et al.*, 2009). Una vez degradadas las zonas amorfas de la celulosa, tiene lugar la tercera etapa de la hidrólisis, en donde la región cristalina comienza a ser hidrolizada, como resultado de la acción sinergista de la endoglucosanasa y exoglucosanasa (Beldman, 1988).

Reportes en la literatura mencionan que los microorganismos ruminales capaces de producir celulasas son: *Bacteroides succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus*, *Clostridium lochheadii* y *Cillobacterium cellulosolvens* (Grudsky y Arias, 1983).

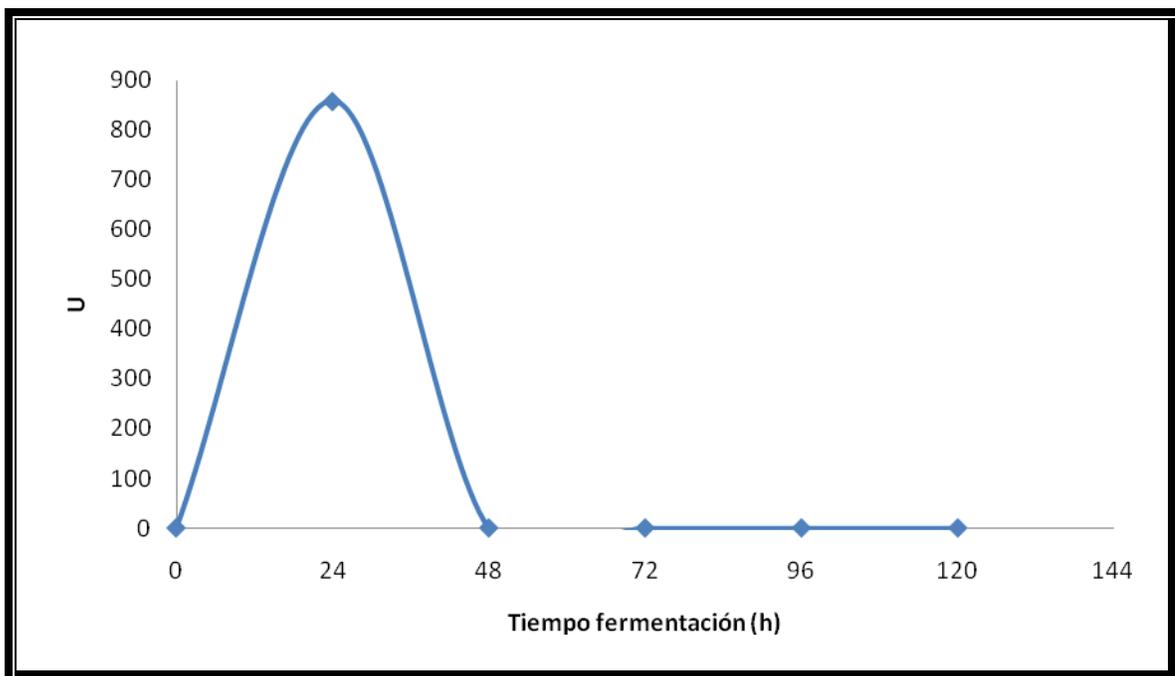


Figura 29. Cuantificación de la actividad enzimática de la cepa # 2.

## **5. CONCLUSIONES**

Los subproductos de la industria cervecera (masilla y levadura) representan una alternativa económica al adicionarlos a la dieta de ganado lechero ya que se reducen costos y aumentan los beneficios para el animal.

Se aislaron 20 microorganismos en agar nutritivo y se caracterizaron macroscópicamente, predominando las colonias de forma circular con bordes regulares.

Se lograron aislar 24 microorganismos en agar Schaedler (medio específico para anaerobios); se caracterizaron macroscópicamente, y predominaron las colonias con forma circular, superficie lisa y consistencia suave.

La adición de levadura *Saccharomyces cerevisiae* incrementa la concentración de bacterias Gram negativas en el contenido ruminal.

El metabolismo microbiano de las cepas aisladas fue reportado como citrato positivo, a excepción de las cepas 12, 13 y 16; y lactato negativos a excepción de las cepas 2, 5 y 7.

Se demostró que el microorganismo elegido produce la enzima celulasa, mediante el diseño de un medio de cultivo inductor empleando como única fuente de carbono la carboximetil celulosa.

La curva de crecimiento en medio líquido específico mostró una fase exponencial a las 24 horas con una velocidad específica de crecimiento de  $\mu=0.0427\text{DO/h.}$ , mientras que en medio líquido convencional el crecimiento se alcanzó a las 24 horas de fermentación con una velocidad específica de  $0.0253\text{ DO/h.}$

Se determinó y cuantificó la actividad celulolítica alcanzando valores de  $858\text{ U}$  a las 24 h de fermentación con una velocidad inicial de  $35\text{ mg/L.}$

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. 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.
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-Garcia, J.L., Castrejón F. A., Mendoza, G. D., Pérez-Gavavilán, E.P. 2000. Effect of two comercial yeast cultures with *Saccharmyces cerevisiae* on ruminal fermentation and digestion in sheep fed sugar cane tops. *Livestock production science, Holanda.* 63:153-157.
4. Badui, Salvador. *Química de los Alimentos.* México, D.F: Pearson, 1993.
5. Bárzana, E. y López, A. La tecnología enzimática. México: Ed. Limusa. Capítulo 4 en García Garibay M., R. Quintero Ramírez y A. López Munguía. *Biotecnología Alimentaria*, 1992.
6. Beldman G., Voragen A. G. J., Rombouts F. M, Pilnik W. 1988. Synergism in cellulose hydrolysis by endoglucanases and exoglucanases purified from *Trichoderma viride*. *Biotechnology and Bioengineering. Journal* 31: 173-178
7. Belitz H. D., Grosch W. *Química de los Alimentos.* Zaragoza España: Acribia, 1992.
8. Blanch, M., Calsamaglia, S. and Castello, A. 2009. Quantification of *Streptococcus bovis* and *Megaspharea elsdenii* in ruminal fluid of dairy cows and beef heifers by real time PCR technique. *Journal of Dairy Science* 90 (Suppl I): 339
9. Blanch, M. 2009. Estudio de la acidosis ruminal y nuevas estrategias de prevención. Tesis doctorado.

10. Bryant, M. P. and L. A. Burkey. 1953. Numbers and some predominant groups of bacteria in the rumen of cows fed different ration. J. Dairy Sci. 36: 218-224.
11. Caldwell, D. and M. P. Bryant. 1966. Medium without rumen fluid for non selective enumeration and isolation of rumen bacteria. Appl. Microbiol., 14: 794-801
12. Calsamiglia S., Bach, A. y Ferret, A. 2004. Bagazo de cerveza. Fundación española para el desarrollo de la nutrición animal. 28 pp.
13. Calsamiglia S., Cardozo, P. W., Ferret, A. and Banch A. 2008. Changes in rumen microbial fermentation are due to combined effect of type of diet and pH. Journal of Animal Science. 86: 702-711.
14. Chademana, I., Offer, N. W. 1990. The effect of dietary inclusion of yeast culture on digestion on digestion in the sheep. Anim. Prod. 50:483-489.
15. Chaucheyras, F., Fonty, G., Bertin, G. and Gouet, P. 1995. Effects of live *S. cerevisiae* cells on zoospore germination, growth and cellulolytic activity of the rumen anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis* MCH3. Current. Microbiol. 31: 201-205.
16. Chaucheyras, et al., 1996. Effects of a strain of *S. cerevisiae* (Lerucell SCI), a microbial additive of ruminants, on lactate metabolism *in vitro*. Canadian Journal of Microbiology. 42: 927:933.
17. Chou TYC, Chang MM, Tsao GT. 1981. Structure, pre-treatment and hydrolysis of cellulose. Advances in Biochemical Engineering 20: 16-42
18. Counotte, G. H. M., Lankhorst, A. and Prins, R. A. 1983. Role of DL-lactic acid as an intermediate in rumen metabolism of dairy cows. Journal of Animal Science. 56: 1222-35.
19. 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.

20. Dawson, K. A., Newman, K. E., Boling, J. A. 1990. Effects of microbial supplements containing yeast and lactobacilli on roughage-fed ruminal microbial activities. *J. Anim. Sci.* 68:3392-3398.
21. 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.
22. Eadie, J. M. 1962. The development of rumen microbial populations in lambs and calves under various conditions of management *J. Gen. Microbiol.* 29: 563-578.
23. Eriksson K. E., Wood T. M. 1985. Biodegradation of cellulose: biosynthesis and biodegradation of wood components. Higuchi T (ed). Academic Press, New York. 469-503
24. Fallow, R. J., Harle, F. 1987. The effect of yeast culture inclusion in the concentrate diet on calf performance. *J. Dairy Sci.* 70:2051-2062.
25. Flachachachowsky, G., Tiroke, K., Matthey, M. 1993. Influence of yeast (*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.
26. García R. S., 2007. Artículo Técnico “Las Levaduras para la Alimentación de los porcinos (*Saccharomyces cerevisiae*)” Engormix, México.
27. 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.
28. 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.
29. Greive, D. G. 1979. Feed intake and growth of cattle fed liquid brewer's yeast. *Can. J. Anim. Sci.* 59:89.
30. Grudsky P. Roberto., Arias B. José Luis. 1983. Aspectos generales de la microbiología del rumen. Monografías de Medicina Veterinaria, Vol. 5 (2).

31. Harris, B., Lobo, R. 1988. Feeding yeast culture to lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 70(suppl. 1):276.
32. Harrison, G.A., Hemken, R.W., Dawson, 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.
33. Harrison, G. A.; Hemken, R. W.; Dawson, K. A.; Harmon, R. J., Barker, K. B. 1988. Influence of addition of yeast culture supplement to diets of lactating cows on ruminal fermentation and microbial populations. J. Dairy Sci. 71:2967-2975.
34. Hernández, D. R. 1999. Efecto de un cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* en consume, 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. 74.
35. Hobson, P. N., Mann, S. O. and Oxford A. E. 1958. Some studies of the occurrence and properties of a large Gram negative coccus from the rumen. Journal of General Microbiol. 19: 462-472
36. 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.
37. Hungate, R. E. 1966. The rumen and its microbes. 1ra. Edition. Academic Press, New York.
38. 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.
39. Lara, Lorena. 2007. Hidrólisis enzimática de piñas de sotol para incrementar la concentración de azúcar. Tesis de licenciatura. UAAAN. Coahuila, México.
40. Lee, J., 1997. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. Journal of Biotechnology. 56: 1-24

41. Lila, Z. A., Mohammed, N., Yasui, T., Kurokawa, Y., Kanada, S., and Itabashi, H. 2004. Effects of a twin strain of *S. cerevisiae* live cells on mixed ruminal microorganism fermentation *in vitro*. Journal of Animal Science. 82:1847-1854.
42. 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.
43. Lucas, A.; Cañizares P.; Valverde, J. 2008. Hidrólisis enzimática de celobiosa. Universidad de Castilla. Departamento de Ingeniería Química.
44. Mantovani, C. Russell, 2001. Nisi resistance of *Streptococcus bovis*. Applied and Environmental Microbiology. 67: 808-813
45. Medicina Natural, 2008. Levadura de cerveza. 16 de Febrero de 2010 <[http://ar.geocities.com/florales\\_natural/remedios-levadura-cerveza.htm](http://ar.geocities.com/florales_natural/remedios-levadura-cerveza.htm)>
46. Mir, Z., Mir, P. S. 1994. Effect of the addition of live Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) on growth and Carcass Quality of Steer Fed High-Forage or High-Grain Diets and on Feed Digestibility and In situ Degradability. J. Anim. Sci. 72:537-545.
47. Montero, Gerardo. 2009. Respuesta productiva de vacas lactantes alimentadas con dietas adicionadas con subproductos de cervecería. Tesis de maestría. UAAAN. Coahuila, México.
48. Mutsvangwa, T., Edwards, I. E., Topps, 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.
49. Nava Cuéllar, Cuauhtémoc y Díaz Cruz, Antonio. 2001. "Introducción a la Digestión Ruminal". Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM.
50. Newbold, C. J., Wallace, R. J. and McIntosh, M. 1996. Mode of action of the yeast *S. cerevisiae* as a feed additive for ruminants. British Journal of Nutrition. 76: 249-261.

51. Nisbet, D. J. and Martin, S. A. 1991. Effect of a *S. cerevisiae* culture on lactate utilization by the ruminal *Selenomonas ruminatum*. Journal of Animal Science. 69:4628-4633.
52. Pérez Gavilán, E. J. P., Viniegra, G. G., Roso, C. 1978. Evaluación bromatológica de suplementos protéicos para ganado bovino. 1. Evaluación de la solubilidad de los compuestos nitrogenados. Veterinaria. México. 7:8.
53. 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.
54. Robinson, P. H., Garrett, J. E. 1998. Effect of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on adaptation of cows to postpartum diets and on lactational performance. J. Anim. Sci. 77:988-999.
55. Rodríguez, A. y Valencia E. 2008. Microbiología Ruminal. Ruminantia. Vol: 3, No 1.
56. Rodríguez S. G., Prado B. L., Huerta S., Saucedo C. G. 1999. Avances en purificación y aplicación de enzimas en biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana. México, D. F.
57. Slyter, L. L. 1976. Influence of acidosis on rumen function. Journal of Animal Science. 43:910-929.
58. Smith, T. 2003. Wet brewers grains in total mixed rations. Agriculture Technician Institute. St. John's, N. L.
59. Teh, T. H., Sahahlu, T., Escobar, E. N., Cushawhawhaw, J. L. 1987. Effect of live yeast and sodium bicarbonate on lactating goat. J. Dairy Sci. 70. Suppl. 1:200. (Abstr.).
60. Warner, A. G. I. 1962. Some factors influencing the rumen microbial population J. Gen. Microbial 28: 129-146.
61. 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.

62. 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.
63. 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 5<sup>th</sup> Annual symposium on Biotechnology in the Feed Industry. Nicholasville, K. Y.

## **7. ANEXOS**

### **Anexo I**

#### **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 ( $I_2/K$ ) 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 II**

### **Fundamentos pruebas bioquímicas**

- **Citrato de Simmons**

La utilización de citrato como única fuente de carbono es una prueba útil en la identificación de enterobacterias. Esta se detecta en un medio de cultivo con citrato como única fuente de carbono mediante el crecimiento y la alcalinización del medio. Este aumento de pH se visualiza con el indicador azul de bromotimol que vira al alcalino a pH de 7.6

El medio contiene citrato sódico, fosfato de amonio y azul de bromotimol como indicador; este se tornará azul cuando el medio se alcaliniza. Las bacterias que metabolizan el citrato liberan iones amonio al medio (degradación del fosfato amónico) lo que provoca que este se alcalinice y el indicador vire a azul.

- **Agar Mac Conkey**

Es un medio diferencial que permite distinguir entre enterobacterias que hidrolizan lactosa y las que no lo hacen. La hidrólisis de la lactosa produce ácidos orgánicos y las colonias que la hidrolizan adquieren un color rojo.

La hidrólisis de la lactosa produce ácidos orgánicos y las colonias que la hidrolizan adquieren un color rojo.

Las colonias lactosas negativas permanecen incoloras aunque el medio tira a amarillo por la subida de pH que origina la utilización de las proteínas (peptona) del medio.