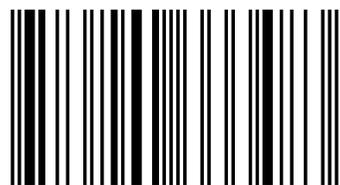


## Aditivo de Levaduras de Manzana en Vacas Holstein Altas Productoras

Esta investigación consta de tres experimentos cuyo objetivo fue la evaluación de diferentes sustratos y cepas de levaduras obtenidas de la fermentación de subproductos de manzana. El primer trabajo consistió en el desarrollo de un inóculo de levaduras, empleando aireadores para evaluar ocho tratamientos, utilizando diferentes niveles de manzana molida, melaza de caña y dos cepas de levaduras, *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces lactis*. El segundo trabajo consistió en evaluar el comportamiento fermentativo in vitro de ocho cepas de levaduras aisladas de subproductos de manzana, tomando como base los resultados del primer estudio. El tercer trabajo consistió en determinar el nivel óptimo de un aditivo elaborado a base de levaduras y adicionado a dietas para vacas altas productoras mediante la técnica de producción de gas in vitro, utilizando cuatro tratamientos.

D. Ph. Daniel Díaz Plascencia. Catedrático e Investigador en Nutrición Animal. Facultad de Zootecnia y Ecología. Universidad Autónoma de Chihuahua. Perif. Fco. R. Almada km 1. CP. 31453 Chihuahua, Chih., México.



978-620-0-33348-3

editorial académica española

Aditivo de Levaduras de Manzana en Vacas Holstein Alta:



Daniel Díaz Plascencia · Pablo Fidel Mancillas Flores ·  
Perla Lucía Ordoñez Baquera

## Aditivo de Levaduras de Manzana en Vacas Holstein Altas Productoras

Levaduras Benéficas en la Alimentación del Ganado Lechero

**Daniel Díaz Plascencia  
Pablo Fidel Mancillas Flores  
Perla Lucía Ordoñez Baquera**

**Aditivo de Levaduras de Manzana en Vacas Holstein Altas  
Productoras**

FOR AUTHOR USE ONLY

FOR AUTHOR USE ONLY

**Daniel Díaz Plascencia  
Pablo Fidel Mancillas Flores  
Perla Lucía Ordoñez Baquera**

# **Aditivo de Levaduras de Manzana en Vacas Holstein Altas Productoras**

**Levaduras Benéficas en la Alimentación del  
Ganado Lechero**

FOR AUTHOR USE ONLY

**Editorial Académica Española**

**Imprint**

Any brand names and product names mentioned in this book are subject to trademark, brand or patent protection and are trademarks or registered trademarks of their respective holders. The use of brand names, product names, common names, trade names, product descriptions etc. even without a particular marking in this work is in no way to be construed to mean that such names may be regarded as unrestricted in respect of trademark and brand protection legislation and could thus be used by anyone.

Cover image: [www.ingimage.com](http://www.ingimage.com)

Publisher:

Editorial Académica Española

is a trademark of

International Book Market Service Ltd., member of OmniScriptum Publishing Group

17 Meldrum Street, Beau Bassin 71504, Mauritius

Printed at: see last page

**ISBN: 978-620-0-33348-3**

Copyright © Daniel Díaz Plascencia, Pablo Fidel Mancillas Flores, Perla Lucía Ordoñez Baquera

Copyright © 2019 International Book Market Service Ltd., member of OmniScriptum Publishing Group

FOR AUTHOR USE ONLY

**LEVADURAS DE MANZANA Y SU EFECTO EN LA CINÉTICA DE  
FERMENTACIÓN *IN VITRO* EN DIETAS PARA VACAS HOLSTEIN ALTAS  
PRODUCTORAS**

FOR AUTHOR USE ONLY

## RESUMEN GENERAL

Esta investigación consta de tres experimentos cuyo objetivo fue la evaluación de diferentes sustratos y cepas de levaduras obtenidas de la fermentación de subproductos de manzana. El primer trabajo consistió en el desarrollo de un inóculo de levaduras, empleando aireadores para evaluar ocho tratamientos, utilizando diferentes niveles de manzana molida, melaza de caña y dos cepas de levaduras, *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces lactis*. El segundo trabajo consistió en evaluar el comportamiento fermentativo *in vitro* de ocho cepas de levaduras aisladas de subproductos de manzana, tomando como base los resultados del primer estudio. El tercer trabajo consistió en determinar el nivel óptimo de un aditivo elaborado a base de levaduras y adicionado a dietas para vacas altas productoras mediante la técnica de producción de gas *in vitro*, utilizando cuatro tratamientos. Los datos se evaluaron con el procedimiento PROC MIXED del programa SAS. Los resultados del primer estudio, demostraron que el conteo de levaduras (CL), fue mayor ( $P < 0.01$ ) en el t4, con la levadura D, con valor de  $2.8 \times 10^9 \pm 0.00$  cel/mL a la h 48 usando melaza de caña. El ácido láctico (AcL), mostró efecto en la reducción del AcL ( $P < 0.01$ ) entre tratamientos y entre levaduras. Los resultados del segundo estudio, demostraron que el CL fue mayor ( $P < 0.01$ ) en el t1, con una producción de  $1.9 \times 10^7 \pm 0.02$  t1, cel/mL. El AcL mostró efecto ( $P < 0.01$ ) en la reducción del AcL en los tratamientos t1, t2, t3 y t4 de la h12 a la h48. En la producción de gas (PG) mostró efecto en el aumento de la producción gas entre tratamientos ( $P < 0.01$ ) en la h3 y h48. En el tercer estudio el CL mostró efecto

( $P < 0.01$ ) con mayor producción en el t4, con  $1.8 \times 10^7 \pm 0.01$  cel/mL a la h48. El conteo de protozoarios (CP) incrementó en función al tiempo ( $P < 0.01$ ) entre tratamientos. El nitrógeno amoniacal ( $N-NH_3$ ) incrementó ( $P < 0.01$ ) en todos los tratamientos de la h12 a la h96. El AcL en el t4 se redujo ( $P < 0.01$ ) de la h12 a la h96. La producción total de AGV'S fue mayor ( $P < 0.01$ ) en la proporción mM/mL de acetato, propionato y butirato en el t2. Se concluye en este trabajo que el uso de la melaza de caña como sustrato, favorece el crecimiento de levaduras en un tiempo de 96 horas. La adición del aditivo de levaduras a las dietas favoreció la PG, el CL, el CP y la producción de AGV'S con una marcada reducción en el AcL.

FOR AUTHOR USE ONLY

## ABSTRACT

This research consists of three experiments aiming to evaluate different substrates and yeast strains obtained from apple products fermentation. The first experiment was carried out to develop a yeast inoculum using oxygenators. Eight treatments were evaluated consisting on different levels of ground apples, sugar cane molasses and two type of yeast (*Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis*). The second experiment aimed to evaluate the *in vitro* fermentation performance of eight strains of yeasts, isolated from apple products, based on the results of the first study. The third experiment was carried out to determine the optimal level of yeasts as an additive in diets of cows with four different treatments, being evaluated by *in vitro* gas production. Data were evaluated with PROC MIXED procedure of SAS. The results of the first study showed that yeast counts (YC) were higher ( $2.8 \times 10^9 \pm 0.00$  cell/mL at 48h,  $P < 0.01$ ) and lactic acid production was lower with yeast D (t4), compared to the yeast A, when using cane molasses as a substrate. The results of the second study showed that YC were higher ( $P < 0.01$ ) using *Kluyveromyces lactis* strain (t1), with a yield of  $1.9 \times 10^7 \pm 0.02$  cells/mL. LA showed to be different ( $P < 0.01$ ) among strains of *Saccharomyces cerevisiae* (t1, t2, t3 and t4) from 12h to 48h. Gas production (GP) showed an effect among the eight treatments ( $P < 0.01$ ) from 12h to 48h. The third study showed that YC during ruminal kinetic was affected ( $P < 0.01$ ) by the original amount of yeast added to the diet, getting the higher counts with addition of 30mL (t4,  $1.8 \times 10^7 \pm 0.01$  cells/mL at 48h). Protozoa counts (PC), Ammonia nitrogen (AN) and LA were affected ( $P < 0.01$ )

by yeast level from 12h to 96h. PC and AN increased proportionally on time to the level of yeast added to diet, while decreased as the level of yeast was higher. Total VFA production had an effect ( $P<0.01$ ) in Mm/mL proportion of acetate, propionate and butyrate, which were higher at level of 10mL ( $t_2$ ). It is concluded that the use of molasses as a substrate, promotes the growth of yeasts during 96h. The level of yeast added to diets has positive effects GP, YC, PC and VFA production, and also has a remarkable reduction of the LA.

FOR AUTHOR USE ONLY

## CONTENIDO

	Página
RESUMEN GENERAL.....	ii
ABSTRACT.....	iv
LISTA DE CUADROS.....	xi
LISTA DE GRÁFICAS.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
LISTA DE ABREVIACIONES.....	xv
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
REVISION DE LITERATURA.....	3
Producción de Manzana.....	3
La Manzanarina en la Alimentación Animal.....	4
Fermentación Sólida.....	5
Fermentación Semi-Sólida.....	8
Fermentación Líquida.....	9
Principales Características de las Levaduras.....	10
Condiciones de Crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	10
Fermentación en Estado Sólido Comparada con la Fermentación Sólida Sumergida.....	11
Optimización de Medios de Cultivo.....	12
La Manzanarina en la Alimentación Animal.....	13
Uso de Levaduras en la Nutrición Animal.....	13
Alimento Funcional.....	15

Producto Nutraceutico.....	15
Mecanismos de Acción de las Levaduras en el Rumen.....	16
LITERATURA CITADA.....	17
ESTUDIO I. DESARROLLO DE UN INOCULANTE PARA RACIONES A PARTIR DE DOS SUSTRATOS MEDIANTE FERMENTACIÓN SÓLIDA SUMERGIDA	23
RESUMEN.....	24
ABSTRACT.....	26
INTRODUCCIÓN.....	28
MATERIALES Y METODOS.....	30
Localización del Área de Trabajo.....	30
Material y Equipo Experimental.....	30
Tratamientos.....	30
Variables Medidas.....	33
Análisis Estadístico.....	37
Modelo Estadístico.....	38
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
pH.....	39
Temperatura.....	41
Azucares Solubles.....	41
Conteo de Levaduras.....	44
Nitrógeno Amoniacal.....	49
Ácido Láctico.....	52

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	58
LITERATURA CITADA.....	60
ESTUDIO II. COMPORTAMIENTO FERMENTATIVO DE OCHO CEPAS DE LEVADURAS AISLADAS DE SUBPRODUCTOS DE MANZANA MEDIANTE LA TÉCNICA DE PRODUCCION DE GAS <i>IN</i> <i>VITRO</i>	63
RESUMEN.....	64
ABSTRACT.....	65
INTRODUCCIÓN.....	66
MATERIALES Y MÉTODOS.....	68
Localización del Área de Trabajo.....	69
Material y Equipo Experimental.....	69
Material Biológico y Medios de Cultivo.....	68
Preparación de Inóculos.....	69
Tratamientos.....	70
Variables Medidas.....	70
Análisis Estadístico.....	74
Modelo Estadístico.....	74
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	75
Conteo de Levaduras.....	75
Nitrógeno Amoniacal.....	77
Ácido Láctico.....	79
Producción de Gas <i>In Vitro</i> .....	83
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	86

LITERATURA CITADA.....	87
ESTUDIO III. CÍNÉTICA DE FERMENTACIÓN <i>IN VITRO</i> DE RACIONES PARA VACAS HOLSTEIN ALTAS PRODUCTORAS ADICIONADAS CON UN INÓCULO A BASE DE LEVADURAS	92
RESUMEN.....	93
ABSTRACT.....	95
INTRODUCCIÓN.....	97
MATERIALES Y MÉTODOS.....	99
Localización del Área de Trabajo.....	99
Material y Equipo Experimental.....	99
Preparación del Inóculo.....	99
Tratamientos.....	100
Variables Medidas.....	103
Análisis Estadístico.....	105
Modelo Estadístico.....	105
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	106
pH.....	106
Conteo de Levaduras.....	108
Conteo de Protozoarios.....	110
Nitrógeno Amoniacal.....	112
Ácido Láctico.....	114
Producción de Gas <i>In Vitro</i> .....	116
Concentración de (AGV'S).....	119

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	127
LITERATURA CITADA.....	128

FOR AUTHOR USE ONLY

## LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Diseño de tratamientos con dos sustratos y diferentes combinaciones con la Levadura A.....	31
2	Diseño de tratamientos con dos sustratos y diferentes combinaciones con la Levadura D.....	32
3	Medias ( $\pm$ EE) en la comparación de los diferentes sustratos con la levadura A.....	56
4	Medias ( $\pm$ EE) en la comparación de los diferentes sustratos con la levadura D.....	57
5	Medias ( $\pm$ EE) del comportamiento fermentativo <i>in vitro</i> entre tratamientos de ocho cepas de levaduras.....	82
6	Medias ( $\pm$ EE) de producción de gas entre cepas de levaduras durante la fermentación ruminal <i>in vitro</i> (PG en mL/0.2g MS).....	85
7	Contenido y análisis calculado de la dieta para vacas Holstein altas productoras con producción esperada de 35 L de leche vaca/d utilizada en el experimento.....	101
8	Diseño de tratamientos con diferentes niveles de inóculo.....	102
9	Medias ( $\pm$ EE) del comportamiento fermentativo entre tratamientos (t) durante la fermentación <i>in vitro</i> .....	118
10	Medias ( $\pm$ EE) del comportamiento en la producción de gas entre tratamientos (t) durante la fermentación ruminal <i>in vitro</i> (PG en mL/0.2g MS).....	120
11	Medias ( $\pm$ EE) del comportamiento en la producción de AGV's entre tratamientos (t) durante la fermentación <i>in vitro</i> .	126

## LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica		Página
1	Comportamiento del pH con la levadura A y D en función al tiempo durante la fermentación sólida sumergida.....	40
2	Comportamiento de la temperatura en sus diferentes combinaciones (MA) manzana, (ME) melaza con la levadura A durante la FSS.....	42
3	Comportamiento de la temperatura en sus diferentes combinaciones (MA) manzana, (ME) melaza con la levadura D durante la FSS.....	43
4	Comportamiento de los azúcares en los diferentes sustratos (MA) manzana, (ME) melaza con la levadura A durante la FSS.....	45
5	Comportamiento de los azúcares en los diferentes sustratos (MA) manzana, (ME) melaza con la levadura D durante la FSS.....	46
6	Comportamiento en la población de levaduras por sustrato (MA) manzana, (ME) melaza en los diferentes tiempos de fermentación con la levadura A.....	47
7	Comportamiento en la población de levaduras por sustrato (MA) manzana, (ME) melaza en los diferentes tiempos de fermentación con la levadura D.....	48
8	Comportamiento en la concentración de nitrógeno amoniacal en los sustratos (MA) manzana, (ME) melaza con la levadura A durante diferentes tiempos de fermentación.....	50
9	Comportamiento en la concentración de nitrógeno amoniacal en los sustratos (MA) manzana, (ME) melaza con la levadura D durante diferentes tiempos de fermentación.....	51
10	Comportamiento en la concentración de ácido láctico en los sustratos (MA) manzana, (ME) melaza con la levadura A.....	53
11	Comportamiento en la concentración de ácido láctico en los sustratos (MA) manzana, (ME) melaza con la levadura D.....	54

12	Comportamiento ruminal de los diferentes inóculos de levaduras durante la producción de gas.....	76
13	Concentración de amoniaco en los diferentes inóculos de levaduras durante la producción de gas.....	78
14	Comportamiento del ácido láctico en los diferentes inóculos de levaduras durante laproducción de gas.....	81
15	Producción de gas acumulada entre cepas en los diferentes inóculos de levaduras durante la fermentación ruminal.....	84
16	Comportamiento del pH en los diferentes tratamientos durante la producción de gas.....	107
17	Producción de levaduras en los diferentes tratamientos durante la producción de gas.....	109
18	Producción de protozoarios en los diferentes tratamientos durante la producción de gas.....	111
19	Acumulación de nitrógeno amonical en los diferentes tratamientos durante la producción de gas.....	113
20	Concentración de ácido lactico en los diferentes tratamientos durante la producción de gas.....	115
21	Producción de gas acumulada entre tratamientos durante la fermentación ruminal.....	117
22	Comportamiento en la concentración de ácido acético en los diferentes tratamientos.....	121
23	Comportamiento en la concentración de ácido propiónico en los diferentes tratamientos.....	122
24	Comportamiento en la concentración de ácido butírico en los diferentes tratamientos.....	123

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Cuadrícula de un hematocímetro (Cámara de Neubauer).....	35

FOR AUTHOR USE ONLY

## LISTA DE ABREVIACIONES

Abreviación	Significado
AGV's	Ácidos grasos volátiles
AcL	Ácido láctico
AS	Azúcares solubles
BM	Bagazo de manzana
C	Cenizas
cel	Células
CL	Conteo de levaduras
CP	Conteo de protozoos
cm	centímetros
d	Día
EE	Extracto etéreo
FC	Fibra cruda
FEL	Fermentación en estado líquido
FES	Fermentación en estado sólido
FL	Fermentación líquida
FS	Fermentación sólida
FSS	Fermentación sólida sumergida
gbrix	Grados brix
h	Hora
Lev	Levadura
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MS	Materia seca
min	minutos
NH <sub>3</sub>	Amoniac
nm	nanómetros
N-NH <sub>3</sub>	Nitrógeno amoniacal
NNP	Nitrógeno no proteico
PC	Proteína cruda
PG	Producción de gas
pH	Potencial hidrogeno
PV	Proteína verdadera
rpm	Revoluciones por minuto
S	Sustratos
t	Tratamiento
T	Temperatura

## INTRODUCCIÓN GENERAL

Las fermentaciones en estado sólido (FES), en estado líquido (FEL) y sólida sumergida (FSS) son procesos que permiten el aprovechamiento de fuentes no convencionales de carbohidratos para la alimentación animal mediante el uso de microorganismos.

Durante la fermentación en estado sólido de algunos subproductos agroindustriales ricos en azúcares y celulósicos, la energía que se libera y la urea como fuente de nitrógeno son utilizados para el crecimiento de la microflora epífita de los subproductos (Pandey *et al.*, 2001). De esta manera, se logra duplicar la biomasa en alrededor de 5 min (Valiño *et al.*, 1992; Nigan, 2000), lo que permite un incremento en la población de bacterias y levaduras principalmente, esto aun en la fase de secado, sin la utilización de inóculo en el sistema (Elías y Lezcano, 1994).

La utilización del desecho de manzana ha recibido muy poca atención, a pesar de considerarse como una fuente de energía barata y debido a su gran contenido de humedad (70-80 %). Estos parámetros pudieran ser aprovechados por la flora microbiana nativa y potencialmente elevar su valor nutritivo mediante adiciones como el caso de nitrógeno no proteico (Becerra *et al.*, 2008). Tanto la manzana de desecho como los subproductos que aporta la industrialización de esta fruta representan una potencial fuente de alimento para los animales, con la ventaja de ser de bajo costo y de poseer nutrientes altamente fermentables por microorganismos como levaduras y bacterias (Becerra *et al.*, 2008;

Rodríguez *et al.*, 2010). Como resultado de este proceso, la producción de proteína microbiana será de gran utilidad en la nutrición animal.

El objetivo principal de este trabajo fue desarrollar un inóculo líquido a base de levaduras, obtenidas del bagazo de manzana para ser usado en raciones para vacas holstein altas productoras.

Los resultados obtenidos de estas investigaciones serán de utilidad para productores, profesionales del área e investigadores interesados en conocer la importancia de los microorganismos presentes en la manzana de desecho de forma natural en esos subproductos; este trabajo permitirá también tener una base para elegir cual subproducto, o cual combinación es la mejor opción para la obtención de un inóculo de levaduras.

FOR AUTHOR USE ONLY

## REVISION DE LITERATURA

### **Producción de Manzana**

A nivel mundial se producen aproximadamente 60 millones de toneladas de manzana al año en una superficie de 5.6 millones de hectáreas, siendo China el principal productor con más de 20 millones de toneladas, seguido de Estados Unidos de América con 5.0 millones. Estos países aportan el 45 % de la producción mundial, mientras que México aporta 0.46 millones de toneladas al año; de este total en la región Noroeste del Estado de Chihuahua, México; se produjeron alrededor de 409,778 toneladas de manzana (SAGARPA, 2007) de este total, cerca de 145,000 toneladas se comercializaron como manzana de desecho (UNIFRUT, 2007). Este desecho, no apto para consumo humano, es utilizado en su mayoría en la industria de la extracción para la elaboración de jugo; proceso del cual se obtiene un residuo o subproducto conocido como bagazo de manzana o pomasa. Gran parte de este bagazo es utilizado inadecuadamente en la alimentación animal y el resto, junto con buena parte de manzana de desecho que se queda en la huerta sin utilización alguna, dan origen a un problema de contaminación del medio ambiente por su alta velocidad de putrefacción, con la consecuente pérdida de nutrientes y dinero para el productor. Se estima una producción de pomasa de aproximadamente 32,000 toneladas (UNIFRUT, 2007) la cual no es aprovechada, o en algunos casos, se sub utiliza en la alimentación animal.

### **Producción de Manzanarina**

Becerra (2006) y Díaz (2006) desarrollaron un proceso biotecnológico del

cual obtuvieron un producto al que llamaron “manzarina” el cual usan en la alimentación animal, que se obtiene de la fermentación en estado sólido de la manzana. En este proceso la energía de los carbohidratos disponibles y la urea como fuente de nitrógeno son utilizadas para el crecimiento de la microbiota epífita de la manzana.

El desarrollo biotecnológico de la manzarina como alimento alternativo para consumo animal, está llamada a constituir un elemento importante en el desarrollo de la producción animal en el Estado de Chihuahua, demostrando la factibilidad de aprovechar los recursos alimenticios de bajo valor nutritivo, como son los subproductos de manzana a través de la fermentación en estado sólido (Díaz, 2006). El uso de la fermentación en estado sólido de subproductos de manzana constituye una alternativa para el aprovechamiento de estos, evitando la contaminación ambiental provocada por la rápida descomposición de los mismos (Díaz-Plascencia *et al.*, 2010).

### **La Manzarina en la Alimentación Animal**

La manzarina ha sido utilizada como ingrediente en la elaboración de bloques multinutricionales los cuales fueron evaluados en la alimentación de becerros en crecimiento (Rodríguez *et al.*, 2006a). La manzarina es un suplemento proteico que se ha obtenido a mediana escala en condiciones rústicas para utilizarla y evaluarla como ingrediente en dietas para rumiantes. Se encontró que puede sustituir parte de los ingredientes en dietas de vacas lecheras, con incrementos en la producción láctea (Gutiérrez, 2007) y beneficios en la salud del animal (Gallegos, 2007). Han sido evaluadas como ingrediente en la dieta para la alimentación de borregos en engorda (Hernández, 2008) y

como parte del suplemento en alimentación de bovinos de carne (Rodríguez *et al.*, 2006b).

Rodríguez *et al.* (2006b) reportaron que becerros en engorda, alimentados con bloques multinutricionales, elaborados con un 14.6% de manzarina como ingrediente puede tener ganancias diarias de peso de 0.570 kg d<sup>-1</sup>; la dieta se baso en el uso de forraje verde picado, ensilaje y rastrojo de maíz y como concentrado proteico, mineral y energético, se utilizaron los bloques multinutricionales. El consumo de bloque fue de 1.52 Kg a<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, el costo de la materia prima para la elaboración de los bloques fue menor al utilizar la manzarina comparado con el costo de la materia prima que se requiere para elaborar bloques multinutricionales con harinolina como principal fuente de proteína.

### **Fermentación Sólida**

La fermentación sólida (FS) puede ser definida como un cultivo de microorganismos adheridos a un soporte sólido poroso y humedecido en el cual el medio líquido está extendido en una capa muy fina en contacto con una interface aérea. Las bacterias, levaduras y hongos son los microorganismos que pueden crecer en la fermentación sólida, pero la mayoría de las investigaciones se llevan a cabo con hongos filamentosos. El crecimiento en forma de micelio y su tolerancia a bajas actividades de agua y condiciones de alta osmolaridad hacen que los hongos sean la microflora natural más adecuada para la fermentación sólida (Hesseltine, 1972).

Pandey *et al.*, (2001) define como fermentación en estado sólido al crecimiento de microorganismos en un material sólido y húmedo, siendo el

material sólido la fuente energética, el sustrato también puede estar formado por un material sólido e inerte y húmedo, al cual se le adiciona una fuente energética.

En la fermentación en estado sólido, generalmente no se requiere agregar agua si el sustrato tiene un contenido alto de humedad (70 a 80%) (Pandey *et al.*, 2001) y no necesariamente se tiene que inocular con alguna especie de microorganismo, si existe la posibilidad de potencializar el crecimiento de algunas de las especies microbianas de las que se encuentran de manera natural en los sustratos; algunos de estos tienen una amplia diversidad de microorganismos, en este caso se tiene un sistema heterogéneo. El modelo de crecimiento micelial da una ventaja adicional a los hongos filamentosos sobre los microorganismos unicelulares en la colonización de la matriz sólida y en la utilización de los nutrientes del medio de cultivo. El modelo básico de crecimiento de los hongos es una combinación del crecimiento apical con la generación de nuevas hifas por ramificación. Mientras que el crecimiento apical se lleva a cabo de manera lineal, la ramificación se lleva a cabo de manera exponencial y como resultado se logra una alta velocidad de crecimiento y una gran capacidad de cubrir eficientemente la superficie de cultivo (Valiño *et al.*, 2002).

La estructura de la pared celular unida al crecimiento por las puntas y la ramificación da a los hongos una estructura sólida y firme que les permite penetrar en el interior de la matriz sólida. Las enzimas hidrolíticas son excretadas por las puntas de las hifas sin que se diluyan como en el caso de la fermentación líquida lo que hace la acción de las enzimas hidrolíticas muy

eficiente y les permite penetrar en la mayoría de los substratos sólidos, lo que aumenta la disponibilidad de los nutrientes del interior de los substratos (Raimbault, 1998).

Existe un gran interés en la utilización de *S. cerevisiae* para transformar desechos agroindustriales en productos bioquímicos de valor comercial, por medio de la fermentación sólida (FS), porque se ha encontrado que durante la FS se manifiestan características fisiológicas diferentes en los microorganismos en comparación con la Fermentación líquida (FL). Entre los productos comerciales más importantes, se encuentran algunas enzimas que son excretadas al medio y cuya producción por FL se presenta en forma muy disminuida debido a los fenómenos de represión catabólica (Ramesh y Lonsane, 1991; Solís-Pereira *et al.*, 1993). A veces, las enzimas producidas por FS tienen características modificadas, como un aumento en su termo resistencia, menores tiempos de producción y mayor actividad (Grajek y Gervais, 1987; Pandey *et al.*, 1992; Acuña-Argüelles *et al.*, 1995).

Los efectos que se derivan de la utilización de FS sobre los microorganismos son múltiples como modificaciones en el transporte de azúcares, la composición de la pared, la membrana celular y en la actividad enzimática (Grajek y Gervais, 1987; Pandey *et al.*, 1992). Mientras que las bacterias y las levaduras requieren de alta actividad de agua ( $A_w > 0.98$ ), los hongos filamentosos pueden crecer con valores de  $A_w$  tan bajos como 0.85, y por esta razón, son microorganismos muy bien adaptados para la fermentación sólida sugiere incluso que un bajo nivel de  $A_w$  favorece la germinación y el crecimiento micelial de los hongos (Raimbault, 1998).

De acuerdo con Raimbault, (1998) el soporte de la fermentación sólida debe cumplir con varios requerimientos como son: Poseer una matriz porosa que puede ser biodegradable o inerte, y requiere presentar una gran superficie de área por volumen dentro del rango de 103 o 106  $\text{cm}^2/\text{cm}^3$  que permita el crecimiento microbiano en la interface sólido-líquido. Debe absorber agua en una o varias veces su propio peso con una actividad de agua relativamente grande en la interface sólido-líquido para poder permitir una alta velocidad de los procesos bioquímicos.

### **Fermentación Semi-Sólida**

Es este tipo de fermentación, utilizada básicamente para hongos, el microorganismo se desarrolla en la superficie húmeda de un material sólido, el cual generalmente es algún grano de cereal procesado, aunque se han realizado intentos para utilizar materiales de desecho. Esto permite al hongo crecer en condiciones similares a las encontradas en la naturaleza; las esporas, los propágulos infectivos mediante los cuales el hongo sobrevive e infecta insectos, son producidas en el aire. Aunque las fermentaciones semi sólidas son relativamente fáciles de desarrollar en pequeña escala, el escalado de las mismas a las proporciones necesarias para productos comerciales es bastante difícil (Taborsky, 1992).

En el caso de los hongos entomopatógenos, los países en vías de desarrollo han aplicado métodos de fermentación en sustrato sólido, pero estos presentan muchas restricciones para la producción a nivel comercial. Por un lado, el escalado se dificulta por problemas asociados con la esterilización del

sustrato, intercambio gaseoso, control de la temperatura, mantenimiento de cultivos puros y recuperación del producto a partir del sustrato (Jackson, 1997).

Por otra parte, el tiempo de fermentación necesario para la esporulación en sustratos sólidos generalmente requiere semanas, la cantidad de personal y la infraestructura grandes espacios físicos, son factores que aumentan los costos de gran manera en este tipo de metodologías (Deshpande, 1999; Jackson *et al.*, 2004).

### **Fermentación Líquida**

Se puede definir a la fermentación líquida (FL) o sumergida como un cultivo de células microbianas dispersas en forma homogénea en un recipiente agitado que puede no ser aireado por medios mecánicos. La forma de fermentación líquida más utilizada en los laboratorios de investigación es el matraz agitado. El desarrollo de esta técnica ha sido importante porque ha permitido el cultivo de organismos aeróbicos en condiciones homogéneas con una densidad moderada de la biomasa y ha simplificado el estudio de la fisiología de los organismos. A su vez, el cultivo de suspensiones de células en fermentadores agitados ha evolucionado a gran escala, pues no es raro ver fermentadores con volúmenes superiores a 10 mil litros, en los cuales se producen todo tipo de compuestos derivados del metabolismo microbiano (Jackson, 1997).

En estos sistemas, la agitación mecánica permite aumentar la transferencia del gas a la biomasa de tres formas básicas: 1) Dispersa el gas en burbujas más pequeñas incrementando el área de interface gas-líquido. 2) Incrementa el tiempo de contacto de líquido con las burbujas de gas. 3)

Disminuye el grueso de la capa estacionaria del líquido al aumentar la turbulencia del cultivo. Además, la agitación mezcla el cultivo manteniéndolo homogéneo. Esto es particularmente importante para la dispersión de la biomasa y la transferencia de calor (Henzler y Schedel, 1991).

Gran parte del gasto energético que debe realizarse en la FL está relacionado con la necesidad de satisfacer la demanda de oxígeno en el crecimiento de los microorganismos, esto es muy claro en el caso de *Aspergillus niger*, que es un organismo aeróbico estricto y necesita una alta tasa de transferencia de oxígeno para mantener su crecimiento (Righelato, 1975; Solomon, 1975; Raimbault, 1998).

### **Principales Características de las Levaduras**

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

### **Condiciones de Crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae***

Las levaduras requieren para su óptimo crecimiento un ambiente acuoso, pH con rango de 3.5 a 5.0, posiblemente debido a que la actividad de las proteínas plasmáticas de las levaduras en los límites de su membrana se da en estos valores de pH (Rose, 1987a); en estas condiciones de pH requerido para el crecimiento de la levadura, la actividad bacteriana a nivel ruminal tendría

consecuencias detrimenales para los microorganismos y para los rumiantes; aunque las levaduras mantienen su actividad metabólica y resisten el estrés físico asociado con el secado, calentamiento y exposición al pH ácido en condiciones anaeróbicas (Dawson, 1993).

El rango de temperatura óptima para el crecimiento de las levaduras es de 28 a 30 °C, con sobrevivencia a 37 °C por medio de la formación de ascosporas (Dengis *et al.*, 1995), aunque a 39 °C que es la temperatura del ambiente ruminal, se ve afectado su crecimiento y disminución de la viabilidad de la levadura a 48 h de incubación (Mendoza y Ricalde-Velasco, 1993).

### **Fermentación en Estado Sólido Comparada con la Fermentación Sólida Sumergida**

Doelle *et al.*, (1992) consideran como ventajas los siguientes aspectos: Los medios de cultivo son simples, generalmente subproductos agrícolas que presentan un alto contenido de los nutrientes necesarios. La baja actividad del agua es de gran ayuda para evitar las contaminaciones, especialmente de bacterias y levaduras. La aireación forzada es facilitada por la porosidad del soporte, lo que permite una alta transferencia de oxígeno al microorganismo. Pueden emplearse, frecuentemente conidios como inóculo en los procesos de crecimiento de hongos, lo cual disminuye los costos y las manipulaciones en la preparación del inóculo. Los conidios de los hongos que se producen son mucho más resistentes y tienen mejor adaptabilidad a las condiciones en las que se aplican como agente de biocontrol. El proceso de recobrado es simplificado. Algunos productos son utilizados integralmente, como alimento

animal ó productos para el control biológico. Los procesos se consideran generalmente como tecnologías limpias.

Entre las principales desventajas se encuentran: Aplicación limitada para microorganismos que crecen en contenidos bajos de humedad. La extracción del calor metabólico puede ser un problema, sobre todo cuando se trabaja a gran escala y no se controla el proceso. La naturaleza sólida del sustrato trae problemas al medir los parámetros de la fermentación tales como el pH, la temperatura, el contenido de humedad y la concentración de sustrato y productos. Los procesos de transferencia de masa son limitados por la difusión. Muchos aspectos ingenieriles como el diseño de reactores y el escalado están muy poco caracterizados. El tiempo de fermentación es mayor debido a que generalmente se utilizan microorganismos que presentan bajas velocidades específicas de crecimiento (Gervais y Bazelin, 1986).

### **Optimización de Medios de Cultivo**

Los medios de cultivo con fines industriales, en la mayoría de los casos han sido diseñados mediante procedimientos empíricos de ensayo y error, no solo en la formulación del medio de cultivo, sino también en las condiciones de operación. De cualquier manera es probable que el medio de cultivo original pueda ser optimizado, modificando el porcentaje de los componentes del mismo y las materias primas utilizadas, siendo factible en muchos casos optimizar un medio de tal manera que no sea solamente más productivo, sino de menor o igual costo que el original, para lo cual se requiere del uso de varios métodos de optimización (Maddox y Richert, 1977).

Un aspecto relevante en la optimización de un medio de cultivo de interés industrial no es sólo el logro de una formulación racional del mismo, sino también la posible inclusión de materias primas de bajo costo que hagan rentable el proceso. Ello ha llevado a la búsqueda de subproductos de bajo valor comercial que puedan sustituir componentes costosos y que puedan ser utilizados como fuentes de carbono o nitrógeno (Dreyer *et al.*, 2000).

### **La Manzarina en la Alimentación Animal**

Becerra *et al.*, (2008); Villagrán *et al.*, (2009); Díaz-Plascencia *et al.* (2010), coinciden en que durante la FES del BM, el producto obtenido se ve enriquecido nutricionalmente y esto es resultado del incremento de la cantidad de levaduras con que se inoculó o de la potencialización del desarrollo poblacional de aquellas que se encuentran presentes de manera natural en el BM; esto genera que en el caso de la manzarina, se pueda asumir que además de ser un alimento rico en PV, sea un alimento con un aporte importante de levaduras, debido a la alta cantidad de levaduras que contiene, ya sea obtenida del bagazo de manzana o de manzana de desecho.

Una célula de levadura puede llegar a pesar  $7.922 \times 10^{-11} \text{g}$  (Haddad y Lindegren, 1953), tomando esto en cuenta, las levaduras pueden representar una fracción importante de la MS de la manzarina, considerando que se han obtenido conteos de hasta  $4.5 \times 10^8 \text{ cel/mL}$  (Rodríguez *et al.*, 2006b), en base seca esa cantidad puede ser hasta 10 veces mayor.

### **Uso de Levaduras en la Nutrición Animal**

En la alimentación de rumiantes, las levaduras agregadas en la dieta influyen el metabolismo microbiano ruminal (Miller-Webster *et al.*, 2002); se

ha reportado que al agregar cultivos de levaduras en dietas con una alta proporción de concentrado, se puede reducir la producción de lactato e incrementar un poco el pH en el rumen (Moya *et al.*, 2008); incluso la adición de cultivos de levaduras en la dieta de vaquillas lecheras puede incrementar la cantidad total de bacterias viables en el rumen (Lazcano y Heinrichs, 2008).

Sin embargo, aún y cuando algunas levaduras son anaerobias facultativas, debido a su hábitat natural aerobio (requieren oxígeno para el desarrollo normal de sus poblaciones), 24 h después de suspender su suplementación en la dieta, la cantidad de levaduras viables en condiciones ruminales puede ser indetectable (Kung *et al.*, 1997).

Cuando se incluyen en dietas para ganado lechero, las vacas alimentadas muestran tendencias a tener menor concentración de ácidos grasos no esterificados en la circulación sanguínea periférica, después del parto (Allbrahim *et al.*, 2008); tienden a incrementar el porcentaje de grasa en la producción de leche (Putnam *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2001), tienden a incrementar la producción de leche (Putnam *et al.*, 1997; Wohlt *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2001; Bitencourt *et al.*, 2008), pueden incrementar el consumo de materia seca (Wohlt *et al.*, 1998; Dann *et al.*, 2000) e incluso pueden disminuir la pérdida de condición corporal antes del parto (Robinson, 1997).

En no rumiantes, productos obtenidos de las levaduras, tienen un efecto benéfico en la ecología microbiana del conducto gastrointestinal; disminuyen la población de *clostridium perfringens* (Hernot *et al.*, 2008), pueden capturar bacterias patógenas en el conducto gastrointestinal, esto debido a que esas bacterias se unen a las paredes celulares de levaduras (Ganner *et al.*, 2008),

permitiendo tener un efecto de modulación en la concentración microbiana en el intestino de cerdos destetados (Weedman *et al.*, 2008).

Los cultivos vivos de levaduras permiten la estabilización de la micro flora normal del ciego cuando se ofrecen en la dieta a cerdas gestantes y lactantes (Walker *et al.*, 2008), existiendo la posibilidad de incrementar su productividad, debido a incrementos en la ganancia de peso de las camadas y reducción del número de días del destete al empadre exitoso (Kim *et al.*, 2008).

### **Alimento Funcional**

Se refiere a cualquier alimento en forma natural o procesada, que además de sus componentes nutritivos contiene componentes adicionales que favorecen a la salud, la capacidad física y el estado mental de una persona. El calificativo de funcional se relaciona con el concepto bromatológico de "propiedad funcional", la característica de un alimento, en virtud de sus componentes químicos y de los sistemas fisicoquímicos de su entorno, sin referencia a su valor nutritivo.

En Europa se define alimento funcional a "aquel que satisfactoriamente ha demostrado afectar benéficamente una o más funciones específicas en el cuerpo, más allá de los efectos nutricionales adecuados en una forma que resulta relevante para el estado de bienestar y salud o la reducción de riesgo de una enfermedad" (Roberfroid, 2000).

### **Producto Nutracéutico**

Cualquier producto que pueda tener la consideración de alimento, parte de un alimento, capaz de proporcionar beneficios saludables, incluidos la prevención y el tratamiento de enfermedades. El concepto de alimento

nutracéutico ha sido recientemente reconocido como "aquel suplemento dietético que proporciona una forma concentrada de un agente presumiblemente bioactivo de un alimento, presentado en una matriz no alimenticia y utilizado para incrementar la salud en dosis que exceden aquellas que pudieran ser obtenidas del alimento normal" (Zeisel, 1999).

### **Mecanismos de Acción de las Levaduras en el Rumen**

Aunque se han propuesto muchos mecanismos de acción que regulan la respuesta en los rumiantes al incluir levaduras (Rose, 1987b; Martin y Nisbet, 1992; Wallace y Newbold, 1992; Dawson, 1993; Newbold *et al.*, 1996), estos aún no quedan debidamente esclarecidos (Marrero, 2005).

Uno de los mecanismos propuestos es que las levaduras vivas a través de su respiración aerobia permiten eliminar el pequeño porcentaje de oxígeno (1%) que entra al rumen cuando el animal ingiere los alimentos, facilitando así el crecimiento de los microorganismos anaerobios más estrictos como bacterias Celulolíticas y hongos (Rose, 1987a; Newbold *et al.*, 1996).

Otro mecanismo de acción propuestos es que los cultivos de levaduras proveen vitaminas (específicamente tiamina), glucanos, mananoproteínas y ácidos orgánicos que estimulan el crecimiento de microorganismos que digieren la fibra y utilizan el ácido láctico (Nisbet y Martin, 1991; Chaucheyras *et al.*, 1995; Oeztuerk *et al.*, 2005).

## LITERATURA CITADA

- Acuña-Argüelles, M. Gutiérrez-Rojas, M. I Viniegra-González, G. y Favela-Torres, E. 1995. Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Appl. Microbiol and Biotechno.* 43: 808-814.
- Allbrahim, R., M. Doherty, L. O'Grady, V. Gath, P. Duffy y F. Mulligan. 2008. Influence of body condition at calving and feed supplementation with yeast culture on feed intake, peripheral blood metabolites and blood mineral concentrations in early lactating dairy cows. *J. Anim. Sci.* 86 (Suppl. 2). 54. (Abstract)
- Becerra B, A. 2006. Aprovechamiento de subproductos de manzana mediante la producción de proteína microbiana con fermentación en estado sólido para la alimentación animal. *Disertación Doctoral.* Facultad de Zootecnia. Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua. Méx.
- Becerra, A., Rodríguez, C., Jiménez, J., Ruiz, O., Elías A. y Ramírez, A. 2008. Urea y maíz en la fermentación aeróbica de bagazo de manzana para la producción de proteína. *Rev. Mex. Tecno ciencia Chihuahua.* 2:7-14.
- Bitencourt, L. L., M. N. Pereira, B. M. L. de Oliveira, J. R. M. Silva, G. S. Díaz Junior, F. López, R. C. M. de Melo y S. Seicola Junior. 2008. Response of lactating cows to the supplementation with live yeast. *J. Anim. Sci.* 86 (Suppl. 2). 264. (Abstract)
- Chaucheyras, F., Fonty, G., Bertin, G. y Gouet, P. 1995. Effects of live *Saccharomyces cerevisiae* cells on zoospore germination, growth, and cellulolytic activity of the rumen anaerobic fungus, *Neocallimastix frontalis* MCH 3. *Curr. Micro.* 31: 201.
- Dann, H. M., J. K. Drackley, G. C. McCoy, M. F. Hutjens y J. E. Garrett. 2000. Effects of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on prepartum intake and postpartum intake and milk production of Jersey cows. *J. Dairy Sci.* 83:123-127.
- Dawson, K. A. 1993. Current and future role of yeast culture in animal production: a review of research over the last six years. In *Biotechnology in the feed industry.* E. Lyons Ed. Nicholasville, Kentucky. 269-291.
- Dengis, P. D., Nelissen, L. R., Rouxhet P.G.. 1995. Mechanisms of yeast flocculation comparison of top and bottom fermenting strains. *Appl. Env. Microbiol.* 61:718-728.
- Deshpande, M. 1999. Mycopesticide Production by Fermentation. Potential and Challenges. *Critical Reviews in Microbiology.* Londres. 25: 229-243.

- Díaz P, D. 2006. Producción de proteína microbiana a partir de manzana de desecho adicionada con urea y pasta de soya. Tesis de Maestría. Facultad de Zootecnia. Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua. Méx.
- Díaz-Plascencia., D, C. Rodríguez. Muela, P. Mancillas-Flores, C. Angulo. F. Salvador, C. Arzola, J. A. Jiménez, S, Mena y A. Elías. 2010. Producción de proteína microbiana a partir de manzana de desecho con fermentación en estado sólido a 32 °C. Rev. Elect. Vet.10: 11-20
- Doelle H. W., Mitchell D. A. y Rolz C. E. 1992. Solid Substrate Cultivation. Elsevier Applied Sci. London, N. York. Chapter 3. 35.
- Dreyer, A; Coello, N. Y Montiel, E. 2000. Utilización de la metodología de superficie de respuesta en la optimización de un medio de cultivo para la producción de l-lisina por *Corynebacterium glutamicum*. Agro. Trop. 50:167-188.
- Elías, A. y O, Lezcano. 1994. Efecto de la inclusión de niveles de harina de maíz en la fermentación de la caña de azúcar. Rev. Cub. Cienc. Agric. 28:319.
- Gallegos A, M. A. 2007. Conteo de células somáticas en leche, actividad antioxidante del plasma y componentes celulares sanguíneos de vacas Holstein en producción alimentadas con manzanarina en la dieta. Tesis de Maestría. Facultad de Zootecnia. Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua. Méx.
- Ganner, A., L. Fink y G. Shatzmayr. 2008. Quantitative *in vitro* assay to evaluate yeast products concerning to their binding activity of enteropathogenic bacteria. J. Anim. Sci. 86 (Suppl. 2): 54. (Abstract)
- Gervais, P. y Bazelin, C. 1986. Development of a solid substrate fermentor allowing the control of the substrate water activity. Biotechnology Letters. 8: 191-196.
- Grajek, W. P., Gervais, H. 1987. Influence of water activity on the enzyme biosynthesis and enzyme activities produced by *Trichoderma Viride* TS in solid state fermentation. Enzyme and Microbiol Technol. 9: 658-662.
- Gutiérrez P. F. J. 2007. Efecto de la manzanarina sobre los componentes fisicoquímicos y producción de leche. Tesis de Maestría. Facultad de Zootecnia. Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua. Méx.
- Haddad, S. A. y C. C. Lindgren. 1953. A method for determining the weight of an individual yeast cell. Appl. Microbiol.1:153-156.

- Henzler, H. J. y Schedel, M. 1991. Suitability of the shaking flask for oxygen supply to microbial cultures. *Bioprocess Engineering*. 7: 123-131.
- Hernot, D. C., G. C. Fahey, Jr., S. Reeves y M. Scott. 2008. Microbiological and immunological effects of two yeast-based complex fermentation ingredients on adult dogs. *J. Anim. Sci.* 86 (Suppl. 2): 213. (Abstract)
- Hesseltine, C. W., *Solid State Fermentation*. *Biotechnol. and Bioeng.* 1972. 517-532.
- Hubert, J.T. 1987. Fungal Additives For Lactating Cows. Department of Animal Sci. University of Arizona, USA.
- Jackson, M. 1997. Optimizing nutritional conditions for the liquid culture production of effective fungal biological control agents. *J. Microb and Biotech.* 19: 180-187.
- Jackson, M., Payne, A y Odelson, D. 2004. Liquid culture production of blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus* using portable fermentation equipment. *J. Indus. Microb and Biotech.* 31: 149-154.
- Jones, C. y Thomas, C. 1987. Maintenance of strain specificity and bile tolerance when producing. Página en. *Biotechnology in the Feed Industry*. T.P. Lyons eds. Alltech's. Biotechnology Center. Nicholasville, Kentucky, USA.
- Kim, S. W., H. Brandherm, B. Newton, D. Cook e I. K. Yoon. 2008. Effects of dietary yeast culture supplementation to gestation and lactation diets on performance of sows and litters. *J. Anim. Sci.* 86 (Suppl. 2): 347. (Abstract)
- Kung Jr., L., E. M. Kreck, R. S. Tung, A. O. Hession, A. C. Sheperd, M. A. Cohen, H. E. Swain y J. A. Z. Leedle. 1997. Effects of a live yeast culture and enzymes on *in vitro* ruminal fermentation and milk production. *J. Dairy Sci.* 80:2045-2051.
- Lazcano, G. J. y A. J. Heinrichs. 2008. The use of cytometry to asses rumen bacteria in dairy heifers limit fed different forage to concentrate ratios with *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Anim. Sci.* 86 (Suppl. 2): 90. (Abstract)
- Maddox, I. y Richert, S. 1977. Use of response surface methodology for the optimization of microbiological media. *J. Appl. Bacteriol.* 43: 197-204.
- Marrero, Y. 2005. Las levaduras como mejoradoras de la fermentación ruminal de dietas con alto contenido de fibra. Tesis Doctoral. Instituto de Ciencia Animal. La Habana. Cuba.

- Martin, S. A. y Nisbet, D. J. 1992. Effect of direct fed microbials on rumen microbial fermentation. *J. Dairy. Sci.* 75: 1736-1744.
- Miller-Webster, T., W. H. Hoover, M. Holt y J. E. Nocek. 2002. Influence of yeast culture on ruminal microbial metabolism in continuous culture. *J. Dairy. Sci.* 85:2009-2014.
- Moya, D., S. Calsamiglia, A. Ferret, J. L. Fandiño y L. Castillejos. 2008. Effects of yeast culture on rumen microbial fermentation of heifers challenged with high-concentrate feeding. *J. Anim. Sci.* 86 (Suppl. 2): 589. (Abstract)
- Newbold, C. J., Wallace, R. J. y Mc Intosh, F. M. 1996. Mode of action of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a feed additive for ruminants. *British J. Nutrition.* 96: 249-261.
- Nigan, J. N. 2000. Cultivation of *Candida lutzeri* in sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolyzate for the production of single cell protein. *W. J. Microbiol and Biotechnol.* 16: 367-372.
- Nisbet, D. J. y Martin, S. A. 1991. The effect of *Saccharomyces cerevisiae* culture on lactate utilization by the ruminal bacterium *Selenomonas ruminantium*. *J. Anim. Sci.* 69: 4628.
- Oeztuerk, H., Schroeder, B., Beyerbach, M. y Breves, G. 2005. Influence of living and autoclaved yeasts of *Saccharomyces boulardii* on *in vitro* ruminal microbial metabolism. *J. Dairy. Sci.* 88: 25-2600.
- Pandey, A., 1992. Recent Process Developments in solid state fermentation. *Process Biochemistry.* 27: 109-117.
- Pandey, A., C.R. Soccol, J.A. Rodriguez-Leon Y P. Nigam, 2001. *Solid-State Fermentation in Biotechnology: Fundamentals and Applications*, Pandey, A., (Ed.), Asiatech Publishers, New Delhi.
- Putnam, D. E., C. G. Schwab, M. T. Socha, N. L. Whitehouse, N. A. Kierstead y B. D. Garthwaite. 1997. Effect of yeast culture in the diets of early lactation dairy cows on ruminal fermentation and passage of nitrogen fractions and amino acids to the small intestine. *J. Dairy. Sci.* 80:374-384.
- Raimbault, M. 1998. General and microbiological aspects of solid state fermentation. *Process Biochemistry in Electronic J. Biotechnol.* www.ejb.org. Consultado el 28/Mar/2009. 25.
- Ramesh, M. V. and B.K. Lonsane, 1991. Ability of a solid state fermentation technique to significantly minimise catabolite repression of amylase production by *Bacillus licheni formis* M27. *Applied Microbiol. Biotechnol.* 35: 591-593.

- Righelato, R. C. 1975. Growth kinetics of mycelial fungi. Página 97 en *Filamentous fungi Vol.1 (Industrial mycology)*. Smith, J. E., Berry, D. eds. Edward Arnold, London. U.K.
- Roberfroid, MB. 2000. Concepts and strategy of functional food science: the European perspective. *J. Clin. Nutr.* 71: 1669-1664.
- Robinson, P. H. 1997. Effect of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on adaptation of cows to diets postpartum. *J. Dairy. Sci.* 80:1119-1125.
- Rodríguez M., C., A. Meléndez N., J. F. Lucero A., H. E. Rodríguez R., C. Hernández G. y C. Arzola A. 2006a. Elaboración de Bloques Multinutricionales Fraguados con o sin Manzanarina. Página 170-173 en *Memorias de la XXXIV Reunión Anual de la Asociación Mexicana de Producción Animal y X Reunión Bienal del Grupo Norte Mexicano de Nutrición Animal*. U. A. S. Mazatlán, Sinaloa. México.
- Rodríguez M., C., J. F. Lucero A., A. Meléndez N., H. E. Rodríguez R., C. Hernández G. y O. Ruiz B. 2006b. Consumo de forraje y ganancia de peso de becerros comerciales para exportación, suplementados con bloques multinutricionales elaborados con manzanarina. Página 195-198 en *Memorias de la XXXIV Reunión Anual de la Asociación Mexicana de Producción Animal y X Reunión Bienal del Grupo Norte Mexicano Animal*. U. A. S. Mazatlán, Sinaloa. México.
- Rodríguez-Muela, C., D. Díaz, F. Salvador, O. Ruiz, C. Arzola, A. Flores, O. La O y A. Elías. 2010. Efecto del nivel de urea y pasta de soya en la concentración de proteínas durante la fermentación en estado sólido de la manzana (*Malus domestica*). *Rev. Cub. de Cien. Agríc.* 44: 23-26.
- Rose, A. H. 1987a. Yeast culture a microorganism for all species a theoretical look at its mode of action. *Proceedings. Alltech's third annual symposium. Biotechnology in the Feed Industry*. Nicholasville, Kentucky. U.S.A.
- Rose, A. H. 1987b. Responses to the chemical environment. in: A.H. Rose and J.S. Harrison. 2da ed. *The Yeast*. Academic Press. London and New York.
- SAGARPA, 2007. Sistema integral de información agroalimentaria y pesca del Estado de Chihuahua.
- Solis-Pereira, S., Favela-Torres, E., Viniestra-González, G., Gutiérrez-Rojas, M. 1993. Effects of different carbon sources on the synthesis of pectinase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39: 36-41.

- Solomon, R. 1975. Growth of *Aspergillus* in liquid fermentors. En Filamentous fungi (*Industrial mycology*) Smith, J. E., Berry, D. ed. Edward Arnold, London. Vol.1.
- Taborsky, V. 1992. Small-Scale Processing of Microbial Pesticidas. Boletín de Servicios Agrícolas No. 96. Praga, República Checa.
- UNIFRUT, Unión Agrícola Regional de Fruticultores del Estado de Chihuahua. 2007.
- Valiño, E, Elías, A, Álvarez, E. Regalado, E. Cordero, J. 1992. Dinámica de crecimiento de la microbiota de la caña de azúcar durante la obtención de la Saccharina. Rev. Cub. Cienc. Agríc. 26:297.
- Valiño, E., A. Elías, V. Torres y N. Albelo. 2002. Study of the Microbial Contenton Fresh Sugar Cane Bagasse as Substrate for Animal Feeding by Solid State Fermentation. Cub. J. Agri. Sci.. 36:359-364.
- Villagran, D.O., Rodríguez-Muela, C., Burrola, E., González, E., Ortega, G. 2009. Identificación de levaduras involucradas en la fermentación en estado sólido de bagazo de manzana. Página 2 en Memorias de la XLV Reunión Nacional de Investigación Pecuaria. Saltillo, Coah, México.
- Walker, N., M. Cintora, H. Durand y LeTreur. 2008. Influence of a live yeast on the faecal microflora of gestation and lactating sows. J. Anim. Sci. 86 (Suppl. 2): 293. (Abstract)
- Wallace, R. J. y Newbold, C. J. 1992. Probiotics for ruminants. In. Probiotics: The Scientific Basic. R. Fuller ed. London: 317-353.
- Wang, Z., M. L. Eastridge y X. Qiu. 2001. Effects of Forage Neutral Detergent Fiber and Yeast Culture on Performance of Cows During Early Lactation. 84:204-212.
- Weedman, S., M. Rostagno, J. Patterson, A. Kiess y S. Eicher. 2008. Intestinal microbial effects of yeast products on weaned and transport stressed pigs. J. Anim. Sci. 86 (Suppl. 2): 25. (Abstract)
- Wohlt, J. E., T. T. Corcione y P. K. Zajac. 1998. Effect of yeast on feed intake and performance of cows fed diets based on corn silage during early lactation. J. Dairy. Sci. 81:1345-1352.
- Zeisel S. 1999. Regulation of "nutraceuticals". Science 285: 1853-1855.

**ESTUDIO I. DESARROLLO DE UN INOCULANTE PARA RACIONES A  
PARTIR DE DOS SUSTRATOS MEDIANTE FERMENTACIÓN SÓLIDA  
SUMERGIDA**

FOR AUTHOR USE ONLY

## RESUMEN

Con el objetivo de evaluar dos sustratos para la elaboración de un inoculante para raciones a base de levaduras, fueron utilizadas dos cepas de levaduras mediante fermentación sólida sumergida (cepa A, levadura comercial del género *Saccharomyces cerevisiae* y cepa D, levadura del género *Kluyveromyces lactis*, obtenida del bagazo de manzana) bajo condiciones aeróbicas utilizando oxigenadores en un medio de cultivo líquido. Los tratamientos usados fueron: t1) 200 mL manzana molida (MA) + 1 g levadura A; t2) 132 mL manzana molida (MA) + 34 g melaza (ME) + 1 g levadura A; t3) 66 mL manzana molida (MA) + 66 g melaza (ME) + 1 g levadura A; t4) 100 g melaza (ME) + 1 g levadura A; t5) 200 mL manzana molida (MA) + 1 g levadura D; t6) 132 mL manzana molida (MA) + 34 g melaza (ME) + 1 g levadura D; t7) 66 mL manzana molida (MA) + 66 g melaza (ME) + 1 g levadura D; t8) 100 g melaza (ME) + 1 g levadura D. Todos los tratamientos contaron con la adición de 1.2% de Urea, 0.2% de sulfato de amonio, 0.5% de suplemento mineral aforando a 1,000 mL con agua destilada en matraces de vidrio con 5 repeticiones por tratamiento y diferentes tiempos de muestreo (0, 12, 24, 48 y 96 horas). Las variables evaluadas fueron: pH, temperatura, azúcares solubles, conteos de levaduras, nitrógeno amoniacal y ácido láctico. Se utilizó un diseño con arreglo factorial 2x4 en parcelas divididas. Los resultados mostraron que el pH tuvo diferente comportamiento entre sustratos y levaduras ( $P < 0.01$ ). La temperatura se incrementó ( $P < 0.01$ ) de la h 0 a la h 12 en todos los sustratos. El nitrógeno amoniacal aumentó en el t4 ( $P < 0.01$ ) entre sustratos y levaduras. El ácido láctico reportó los niveles más bajos en el t1 ( $P < 0.01$ ) entre sustrato y

levaduras. Los azúcares solubles mostraron una pérdida similar ( $P < 0.01$ ) entre sustratos y tiempo. El conteo total de levaduras fue ( $P < 0.01$ ) sobresaliendo el sustrato 4, con la levadura D, con valor de  $2.8 \times 10^9 \pm 0.00$  cel/mL a la h 48, en tanto que para la levadura A, el mayor valor fue de  $9.6 \times 10^8 \pm 0.02$  cel/mL en t4 a la h 96. Se concluye que el uso de melaza como sustrato, favorece el crecimiento de levaduras especialmente de la cepa D de origen *K. lactis*, a las 24 horas de fermentación durante la preparación de un inoculante para raciones.

FOR AUTHOR USE ONLY

## ABSTRACT

### DEVELOPMENT OF A DIET INOCULATE WITH TWO SUBSTRATES BY SUBMERGED SOLID FERMENTATION

Two strains of yeasts by solid submerged fermentation (strain A, commercial yeast of the genus *Saccharomyces cerevisiae* strain D, yeasts *Kluyveromyces lactic*, obtained from bagasse apple) under aerobic conditions using oxygen in a liquid culture medium, were used in order to evaluate an inoculant for yeast-based rations. Substrates (treatments) used were: t1) 200 mL apple ground (AB) + 1 g yeast A, t2) 132 mL ground apple (AB) + 34 g molasses (CM) + 1 g yeast A, t3) 66 mL ground apple (AB) + 66 g molasses (CM) + 1 g yeast A; t4) 100 g molasses (CM) + 1 g yeast A; t5) 200 mL apple ground (AB) + 1 g yeast D, t6) 132 mL apple ground (AB) + 34 g molasses (CM) + 1 g yeast D t7) 66 mL ground apple (AB) + 66 g molasses (CM) + 1 g yeast D, t8) 100 g molasses (CM) + 1 g yeast D. Treatments were added with 1.2% urea, 0.2% ammonium sulfate and 0.5% of mineral supplement dilute to 1,000 mL with distilled water, and placed in glass flasks by 5 replicates / treatment at different sampling times (0, 12, 24, 48 and 96 h). The variables studied were: pH, temperature, soluble sugars, yeast counts, lactic acid and ammonia nitrogen. A 2x4 factorial design in two parcels divided was performed to statistics analysis. pH had different behavior between substrates and yeasts ( $P < 0.01$ ). The temperature was increased ( $P < 0.01$ ) from 0h to 12h in all substrates. Ammonia nitrogen and lactic acid showed an effect ( $P < 0.01$ ) between substrates and yeasts. On the other hand soluble sugars showed an effect ( $P < 0.01$ ) between substrates and time. On total counting of yeasts, substrate 4 with the yeast D

was overhanging ( $P < 0.01$ ), with a value of  $2.8 \times 10^9 \pm 0.00$  cells/mL at 48h, while for yeast A, the highest value was  $9.6 \times 10^8 \pm 0.02$  cells/mL in 96h to t4. As a conclusion, the use of molasses as a substrate, promotes the growth of yeast strains during the preparation of inoculants for rations, especially *K. lactis*, strain D.

FOR AUTHOR USE ONLY

## INTRODUCCIÓN

El desarrollo de productos mediante la fermentación en estado sólido (FES), estado líquido (FEL) y sólida sumergida (FSS) ha mantenido un interés creciente en los últimos años. Esto se debe entre otros factores, al aumento en los costos de los ingredientes convencionales como esquilmos agrícolas y subproductos agroindustriales utilizados en la alimentación del ganado. Un ejemplo lo representan los cultivos de levaduras, las cuales se han empleado en una forma dinámica en las últimas décadas buscando mejorar la respuesta productiva de los animales a menor costo. Está bien documentado que los aditivos alimenticios de levaduras, compuestos fundamentalmente por *Saccharomyces cerevisiae* han permitido mejorar la salud y la productividad de los rumiantes (Miller *et al.*, 2002; Lila *et al.*, 2004).

La manzarina es el resultado del proceso de FES de los subproductos de la manzana (*Malus domestica*) y posee el beneficio comparativo de tener un mayor valor nutritivo que los productos de los que se obtiene como es el caso de bagazo de manzana o manzana de desecho en razón de un mayor contenido de proteína (Becerra *et al.*, 2008; Rodríguez *et al.*, 2010). Esta aplicación biotecnológica se desarrolló tomando como base los trabajos desarrollados por (Hang *et al.*, 1981; Elías *et al.*, 1990; Joshi y Sandhu 1996).

Es importante mencionar que el enriquecimiento nutritivo de subproductos agroindustriales a través de procesos de fermentación, también se ha probado en otro tipo de sustratos (Reid, 1985; Peñaloza *et al.*, 1985). Diversos estudios se han enfocado a evaluar el proceso de fermentación en la búsqueda de su optimización (Becerra *et al.*, 2008; Díaz-Plascencia *et al.*,

2010a; Rodríguez *et al.*, 2010). Estos autores describieron la existencia de una variabilidad en la concentración y calidad nutritiva del producto, dependiendo en su mayor parte, por los niveles de concentración de carbohidratos estructurales del sustrato utilizado.

Todo este análisis permite plantear la necesidad de desarrollar nuevos inóculos, incluso distintas a la *Saccharomyces cerevisiae*, de manera líquida que puedan ser utilizadas como aditivos para rumiantes ya que esta información es escasa (Tai Shin *et al.*, 2002; Oeztuerk *et al.*, 2005).

Por lo anteriormente escrito el objetivo del presente estudio fue evaluar dos cepas de levaduras mediante la fermentación sólida sumergida para la preparación de un inoculante bajo condiciones aeróbicas utilizando oxigenadores portátiles en un medio de cultivo líquido.

## MATERIALES Y METODOS

### Localización del Área de Trabajo

El estudio se llevó a cabo en el laboratorio de nutrición animal de la Facultad de Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua, ubicada en el km 1 del Periférico Francisco R. Almada de la ciudad de Chihuahua; latitud norte 28° 35', longitud oeste 106° 04', con una altitud de 1595 m.s.n.m.; tiene una temperatura media anual de 17 °C (Álvarez, 1992).

### Material y Equipo Experimental

El material utilizado para este experimento fue: manzana de desecho molida, melaza de caña, urea, sulfato de amonio, premezcla de minerales y vitaminas, agua destilada, levadura A y levadura D, picadora estacionaria, balanza analítica, matraces Erlenmeyer de 1,000 mL (Kimax)<sup>®</sup>, bombas oxigenadoras portátiles mangueras y conexiones de plástico, envases de plástico de 10 mL, potenciómetro de mesa (HANNA)<sup>®</sup>, microscopio, cámara de neubauer<sup>MR</sup>, refractómetro HI 96801 (HANNA)<sup>®</sup>, termómetro digital (TAYLOR)<sup>®</sup> y espectrofotómetro Coleman Junior<sup>®</sup> II modelo 6|20.

### Tratamientos

Para la realización de este estudio se prepararon cuatro combinaciones con los dos sustratos dando origen a ocho tratamientos con una levadura comercial, A; del género *Saccharomyces cerevisiae*, y una cepa de levadura de manzana, D; del género *Kluyveromyces lactis*, utilizando la FSS, (Cuadro 1 y 2). Todos los tratamientos contaron con la adición de 1.2 g de urea, 0.2 g de sulfato de amonio, 0.5 g de premezcla de vitaminas y minerales traza y se aforo a 1,000 mL con agua destilada en matraces de vidrio.

Cuadro 1. Diseño de tratamientos con dos sustratos y diferentes combinaciones con la Levadura A

Ingredientes	%	Lev. A			
		T1	T2	T3	T4
Manzana molida (g)	20	200	132	66	
Melaza de caña (g)	10		34	66	100
Lev. A (g)	0.1	1	1	1	1
Urea (g)	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2
Minerales (g)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Sulfato de amonio (g)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Agua destilada (mL)	CBP	797.1	831.1	865.1	897.1
TOTAL mL		1000	1000	1000	1000

Cuadro 2. Diseño de tratamientos con dos sustratos y diferentes combinaciones con la Levadura D

Ingredientes	%	Lev. D			
		T1	T2	T3	T4
Manzana molida (g)	20	200	132	66	
Melaza de caña (g)	10		34	66	100
Lev. D (g)	0.1	1	1	1	1
Urea (g)	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2
Minerales (g)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Sulfato de amonio (g)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Agua destilada mL	CBP	797.1	831.1	865.1	897.1
TOTAL mL		1000	1000	1000	1000

Sus combinaciones fueron evaluadas en 40 matraces Erlenmeyer de 1,000 mL, cada tratamiento constó de 5 repeticiones, a cada matraz se le adaptó un oxigenador portátil con la finalidad de suministrar el oxígeno necesario para favorecer el crecimiento de las levaduras. Durante el periodo de fermentación fueron tomadas 5 muestras por sustrato en diferentes horas (h), (0, 12, 24, 48 y 96 h).

### **Variables Medidas**

#### **pH**

Se determinó de manera directa con un potenciómetro digital de una precisión de  $\pm 0.1$  unidades, tomando como base la metodología descrita por Rodríguez *et al.* (2001a).

#### **Temperatura (T)**

Se midió directamente con la ayuda de un termómetro digital de una precisión de  $\pm 0.1$ .

#### **Azúcares Solubles (AS)**

Se tomó la lectura con la ayuda de un refractómetro digital de una precisión de  $\pm 0.2$ . Para este análisis fueron utilizadas 2 gotas de muestras para su lectura directa y se utilizaron 3 gotas de agua destilada para su calibración.

#### **Conteo de Levaduras (CL)**

Para este análisis se tomó como base, la metodología descrita por (Díaz, 2006). Se realizó en las muestras de la h 0, 12, 24, 48 y 96. Se tomaron las muestras de 30 mL de cada matraz, fueron depositadas en frascos de plástico con tapa de 50 mL; en cada muestra, se agregaron dos gotas de solución de formalina al 10% para preservarla en refrigeración hasta realizar el conteo.

El CL se realizó por microscopía; con una pipeta de volumen variable con un rango de 100 a 1000  $\mu\text{l}$  y puntas desechables se tomó 1 mL de muestra líquida y se preparó una dilución serial utilizando solución salina como diluyente; con una pipeta de volumen variable con un rango de 0.5 a 10  $\mu\text{l}$  y puntas desechables; se tomaron 10  $\mu\text{l}$  de la dilución de cada muestra, y se colocaron en un hematocímetro (cámara de Neubauer) para el conteo.

La cámara de Neubauer se lavó con agua destilada después de cada CL. La cantidad de células identificadas como levaduras, de manera individual o en gemación se contaron en las cuatro esquinas del hematocímetro (4 cuadrantes de 1  $\text{mm}^2$  cada uno; (Figura 1). Se calculó el promedio de células de levaduras (cel) por cuadrante y se calculó la cantidad de células por mililitro (cel/mL) para su análisis estadístico, los valores fueron convertidos a logaritmo base 10 (Log<sub>10</sub> cel/mL).

### **Nitrógeno Amoniacal (N-NH<sub>3</sub>)**

De las muestras líquidas obtenidas de las h 0, 12, 24, 48 y 96 se tomaron 30 mL de cada muestra, se colocaron en frascos de plástico de 50 mL y se congelaron (-5 °C) para su conservación hasta el momento de la determinación de N-NH<sub>3</sub> las muestras se descongelaron a temperatura de refrigeración, (4 °C) y la concentración de N-NH<sub>3</sub> de las muestras líquidas se determinó por colorimetría según el procedimiento de (Broderick y Kang, 1980).

La ecuación de predicción para calcular la concentración de N-NH<sub>3</sub> en las muestras líquidas, se obtuvo del análisis por triplicado de soluciones estándar con concentraciones de 0, 5, 10, 15, 20 y 25  $\mu\text{l}$  de N-NH<sub>3</sub>/mL; se utilizó H<sub>2</sub>O como blanco (estándar con concentración de 0  $\mu\text{l}$ /mL).

Área (Cuadrante) para conteo de células de mayor tamaño (e.g. levaduras)

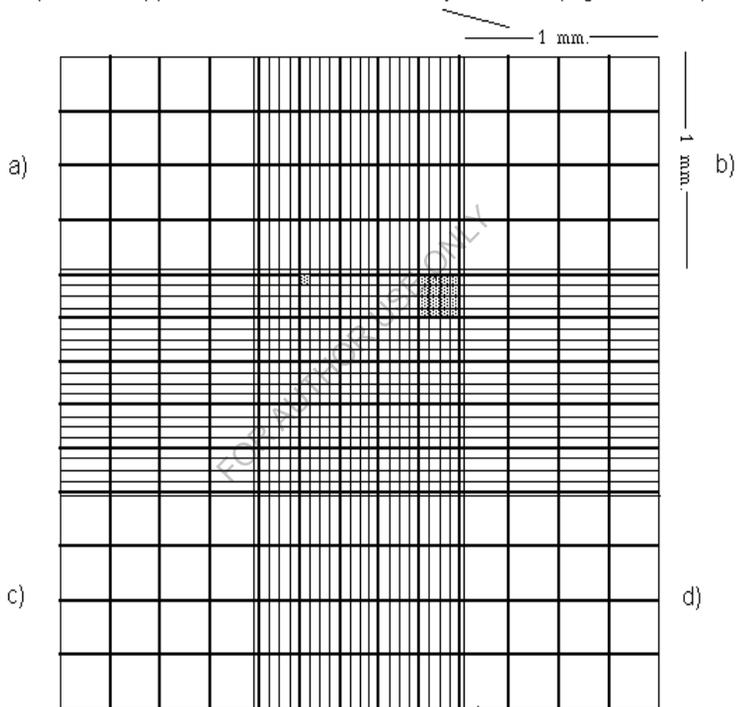


Figura 1. Cuadrícula de un hematócimo (cámara de Neubauer). a, b, c y d, fueron los cuatro cuadrantes utilizados para el conteo de levaduras, su superficie suma un total de  $4 \text{ mm}^2$ , el espacio entre un cubre objetos y la superficie de la cámara de Neubauer, utilizando los límites de cada cuadrante como guía tiene  $0.1 \text{ mm}^3$  de volumen.

El procedimiento para medir la absorbancia de las muestras líquidas diluidas, de las soluciones estándar y de los blancos (0 µl/mL), se realizó por triplicado y consistió en lo siguiente: en tubos de ensayo se agregó 920 µg de agua destilada y 80 µl de la muestra concentrada para completar 1 mL, se mezclaron en vórtice (Vortex Genie II) posteriormente se tomaron 50 µl de la muestra diluida para cada repetición y se depositaron en tubos de ensayo, a lo que se le agregaron 2.5 mL de fenol y se mezcló en un vórtice, posteriormente se agregó 2 mL de hipoclorito y se mezclaron nuevamente, para el estándar o el blanco, se agregó 50 µl de agua destilada, 2.5 mL de fenol y 2 mL de hipoclorito, las soluciones obtenidas se mezclaron en un vórtice y se incubaron por 5 min en baño de agua caliente (temperatura de 95~100 °C). Posteriormente, las muestras se dejaron enfriar por 5 minutos a temperatura ambiente para después tomar la lectura de la absorbancia del contenido de cada muestra, se midió a una longitud de onda de 630 nm; previamente el valor de la absorbancia fue ajustado a 0 utilizando los blancos como referencia. Con los resultados de la absorbancia de las muestras líquidas diluidas, la ecuación de predicción obtenida con las soluciones estándar y el porcentaje de dilución de las muestras líquidas en agua, se calculó la concentración de N-NH<sub>3</sub> en milimolar por mililitro de muestra (mM/mL).

### **Ácido Láctico (AcL)**

De las muestras líquidas obtenidas de la h 0, 12, 24, 48 y 96 se tomaron 30 mL de cada muestra, se colocaron en frascos de plástico de 50 mL y se congelaron (-5 °C) para su conservación hasta el momento de la determinación de AcL. Al momento de la determinación, las muestras se descongelaron a

temperatura de refrigeración (4 °C) y la concentración de AcL de las muestras líquidas se determinó por colorimetría según el procedimiento de Taylor (1996). Como estándar se utilizaron soluciones con una concentración de 5, 10, 15, 20 y 25 µl de AcL/mL y agua destilada como blanco (0 µl de AcL/mL). El análisis se realizó por triplicado, se agregaron 3 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado y 0.5 mL de la muestra diluida en tubos de ensayo, del estándar o del blanco, las soluciones obtenidas se mezclaron en vórtice (Vortex Genie II) y se incubaron por 10 minutos en baño de agua caliente (temperatura de 95~100 °C). Posteriormente, se agregaron 100 µl de solución de CuSO<sub>4</sub> al 4% y 200 µl de solución de 1.5% de p-fenilfenol en etanol al 95% en cada Celda; las soluciones obtenidas se mezclaron en vórtice nuevamente y se dejaron reposar por al menos 30 minutos a temperatura ambiente (no menos de 20 °C). La absorbancia del contenido de cada Celda se midió a una longitud de onda de 570 nm. Con la concentración de AcL y la ecuación de predicción obtenida con las soluciones estándar y el porcentaje de dilución de las muestras líquidas en agua, se calculó la concentración de AcL en milimolar por mililitro de muestra (mM/mL).

### **Análisis Estadístico**

El diseño para este experimento se hizo con un arreglo factorial con dos efectos principales, considerando efectos fijos los niveles sustrato y levadura; el efecto aleatorio del matraz dentro de cada tratamiento (parcela), el efecto de tiempo, el efecto de las interacciones de sustrato, levadura y tiempo, para el último el efecto de la interacción doble factor sustrato y factor levadura; los datos se evaluaron con el procedimiento (Proc Mixed) del programa SAS (2004), para un diseño al azar de 8 tratamientos con arreglo factorial 4x2.

### Modelo Estadístico

$$Y_{ijkl} = \mu + S_i + L_j + SL_{ij} + R(SLk)_{ij} + R(S^*L)_{ijk} + T_l + S^*T_{il} + LT_{jl} + SLT_{ijl} + \epsilon_{ijkl}$$

Donde:

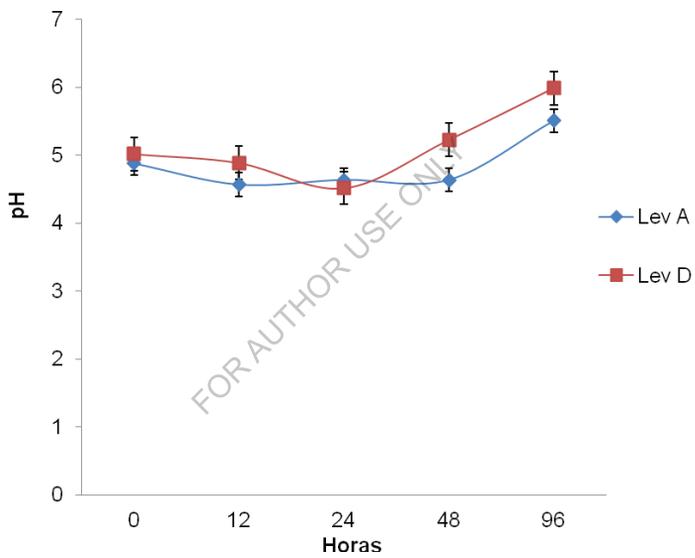
- $Y_{ijkl}$ .- es la variable de respuesta
- $\mu$ .- es la media general
- $S_i$ .- es el efecto del i-ésimo nivel de sustrato
- $L_j$ .- es el efecto del j-ésimo nivel de levadura
- $SL_{ij}$ .- es el efecto de la interacción sustrato por levadura
- $R(SLk)_{ij}$ .- Es el efecto anidado de la repetición del i-ésimo nivel de sustrato y j-ésimo nivel de levadura
- $R(S^*L)_{ijk}$ .- es el efecto anidado de la repetición dentro del i-ésimo nivel de sustrato por la interacción del j-ésimo nivel de levadura
- $T_l$ .- es el efecto del l-ésimo tiempo de fermentación sobre la variable respuesta
- $S^*T_{il}$ .- es la interacción del sustrato por tiempo
- $LT_{jl}$ .- es la interacción de levadura por tiempo
- $SLT_{ijl}$ .- es la interacción sustrato levadura y tiempo
- $\epsilon_{ijkl}$ .- es el error experimental

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### pH

Esta variable mostró efecto ( $P < 0.01$ ) por efecto de levadura por hora con la levadura A y D durante el proceso de fermentación; Según los valores estimados, de la h 0 a la h 96 de FSS, el pH con la levadura A, incrementó su valor de manera gradual en el tiempo de 4.88 a  $5.51 \pm 0.08$  y la levadura D, incrementó de 5.02 a  $5.99 \pm 0.08$ . El incremento de pH está relacionado a que los microorganismos presentes durante el tiempo de fermentación, convierten los carbohidratos de fácil fermentación a ácidos orgánicos como el AcL y acético fundamentalmente, que reducen el pH en el medio (Rodríguez *et al.*, 2001b) también está relacionado directamente con la producción de  $\text{NH}_3$  y con una menor producción de ácidos orgánicos como lo reporto (Elías *et al.*, 1990 y Morgan, 2003) con datos similares, (Gráfica 1).

En la FSS de algunos sustratos, la disminución del pH está relacionada con el incremento de la concentración de ácidos orgánicos; la producción de ácidos orgánicos la cual es resultado del consumo de carbohidratos de fácil fermentación (Calderón *et al.*, 2005). Considerando lo anterior puede observarse en el caso de las levaduras A y D pudieron haber tenido bajos niveles de ácidos orgánicos e incrementó en la producción de  $\text{NH}_3$  de la h 0 a las 24 h de fermentación, durante este periodo puede haberse dado un incremento en la concentración de aminoácidos. Los resultados son confirmados con el análisis de concentración de  $\text{NH}_3$  y AcL.



Gráfica 1. Comportamiento del pH con la levadura A y D en función al tiempo durante la fermentación sólida sumergida.

### **Temperatura (T)**

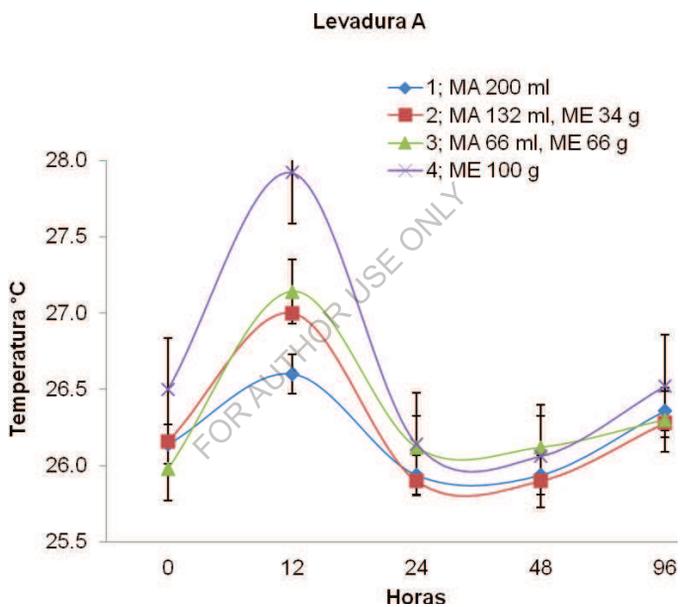
Esta variable presento un comportamiento ( $P < 0.01$ ), por efecto de la interacción sustrato por levadura y tiempo, incrementando la temperatura de la h 0 a la h 12 en todos los sustratos con las levaduras A y D posteriormente disminuyo la temperatura en los sustratos para mantenerse cerca de la temperatura de incubación, (Gráficas 2 y 3).

El calor acumulado en los sustratos fermentados es el resultado de la actividad metabólica de los microorganismos; la temperatura también puede ser afectada por la conductividad del material biológico fermentado como lo menciona (Ibarra *et al.*, 2002). En el proceso de obtención de la manzarina, la temperatura interna tiende a mantenerse constante a pesar de los cambios de temperatura ambiental; aun así, esta puede influenciar ligeramente la temperatura del sustrato (Ruiz *et al.*, 2002).

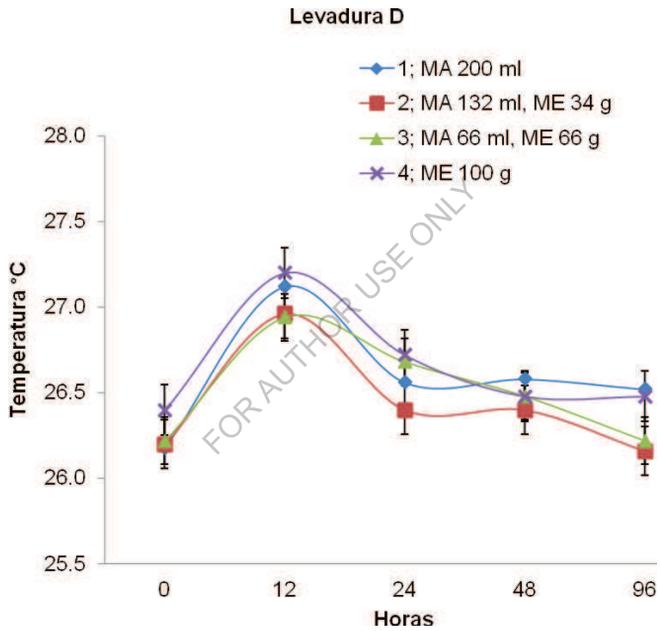
En este estudio el incremento de la temperatura podría deberse a una mejor conductividad del calor; debido a la melaza en los medios de cultivo, permitiendo deducir por su apariencia, que los sustratos tuvieron mejor conducción de calor, como sucede con polvos de uso industrial (Peña *et al.*, 2002).

### **Azucres Solubles (AS)**

Esta variable mostró un comportamiento ( $P < 0.01$ ) por efecto de la interacción sustrato por levadura y tiempo, indicando que la disminución en los azucres fue distinto entre sustratos. El comportamiento de los azucres en la fermentación fue distinto por sustratos, esto coincide con la producción de levaduras, en donde se muestra una clara apreciación de cómo los azucres



Gráfica 2. Comportamiento de la temperatura en sus diferentes combinaciones (MA) manzana, (ME) melaza con la levadura A durante la FSS.



Gráfica 3. Comportamiento de la temperatura en sus diferentes combinaciones (MA) manzana, (ME) melaza con la levadura D durante la FSS.

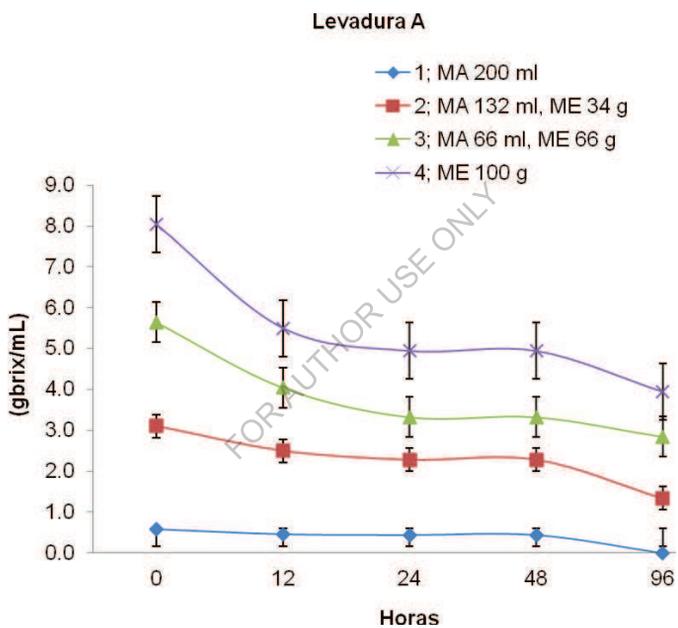
juegan un papel importante en la producción de levaduras; el sustrato melaza manzana también presentó un crecimiento de levaduras favorable pero el sustrato melaza contiene la mayor cantidad de azúcares disponibles para las levaduras, por lo que se considera un excelente sustrato para producir levaduras, (Gráficas 4 y 5).

Este mismo comportamiento está muy ligado en la misma trayectoria que siguió el ácido láctico. Es importante destacar que las tasas específicas de crecimiento y los rendimientos de las levaduras encontrados en este estudio, se encuentran dentro de los valores reportados por los investigadores (Kosaric *et al.*, 1989; Lyutskanov *et al.*, 1990; Ferrer *et al.*, 1996), quienes en sus experimentos de producción de levaduras obtuvieron datos similares a este experimento.

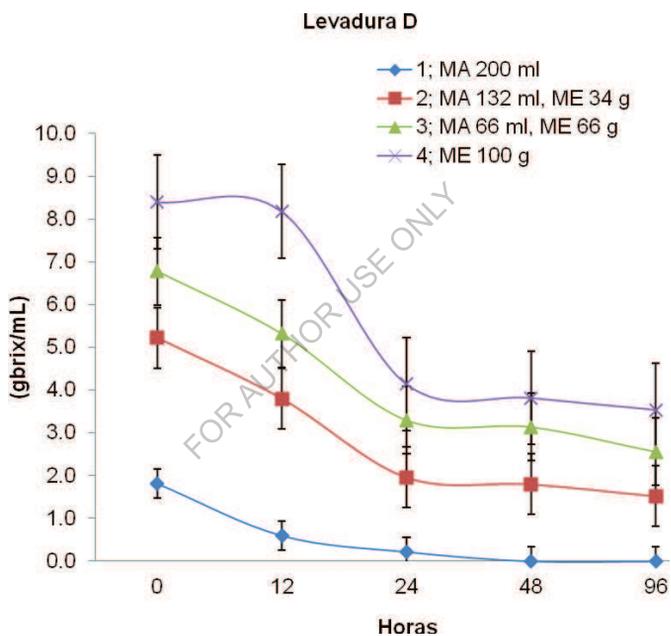
#### **Conteo de Levaduras (CL)**

Se encontró efecto ( $P < 0.01$ ) por efecto de la interacción sustrato por levadura y tiempo, esto indica que hubo diferencias en la cantidad de levaduras y su comportamiento fue en aumento en los distintos sustratos con las diferentes levaduras A y D en los valores estimados, de la h 0 a la h 96 de la FSS mostrando una mayor producción de levaduras en el sustrato melaza con ambas levaduras, (Gráficas 6 y 7).

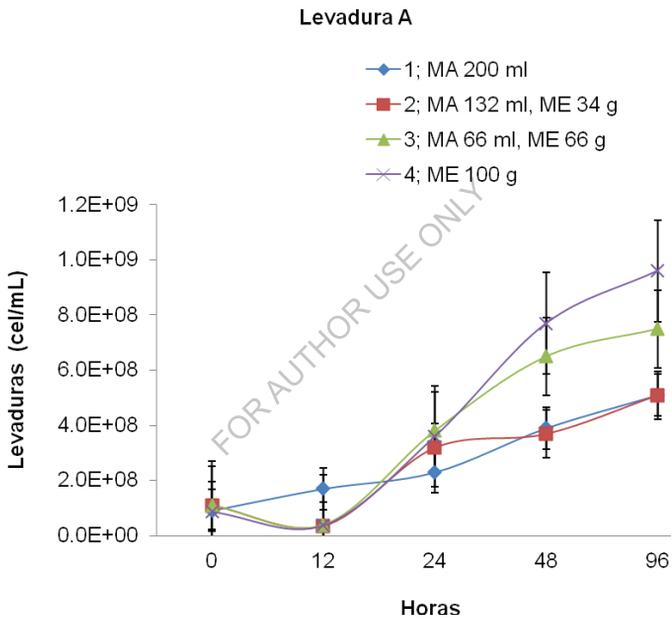
La concentración más alta de levaduras se observó en el sustrato 4 que contiene 100% melaza. La levadura A, reportó una producción de  $9.6 \times 10^8 \pm 0.02$  cel/mL y la levadura D con el mismo sustrato reportó una producción de  $2.2 \times 10^9 \pm 0.03$  cel/mL siendo esta, la última, la mejor opción para producir levaduras. En este caso las levaduras son más favorecidas en el NNP que fue



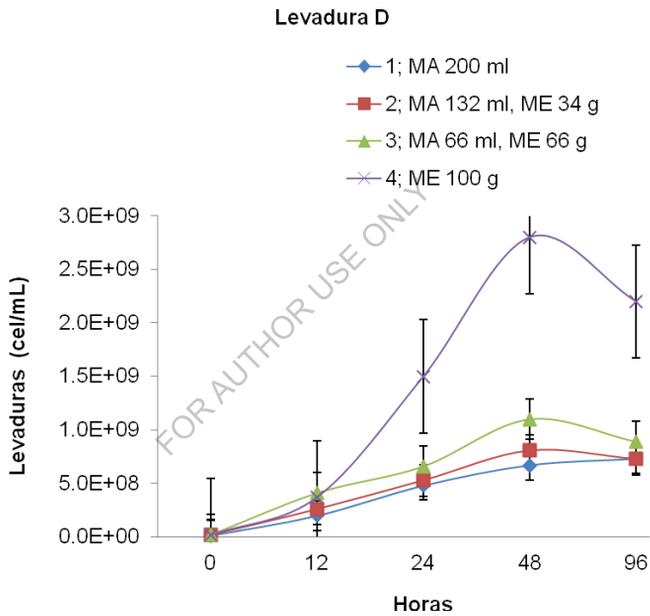
Gráfica 4. Comportamiento de los azúcares en los diferentes sustratos (MA) manzana, (ME) melaza con la levadura A durante la FSS.



Gráfica 5. Comportamiento de los azúcares en los diferentes sustratos (MA) manzana, (ME) melaza con la levadura D durante la FSS.



Gráfica 6. Comportamiento en la población de levaduras por sustrato (MA) manzana, (ME) melaza en los diferentes tiempos de fermentación con la levadura A.



Gráfica 7. Comportamiento en la población de levaduras por sustrato (MA) manzana, (ME) melaza en los diferentes tiempos de fermentación con la levadura D.

aportado por la urea y el sulfato de amonio, datos similares lo reportaron (Elías *et al.*, 1990; Becerra *et al.*, 2008; Díaz-Plascencia *et al.*, 2010b) en trabajos similares.

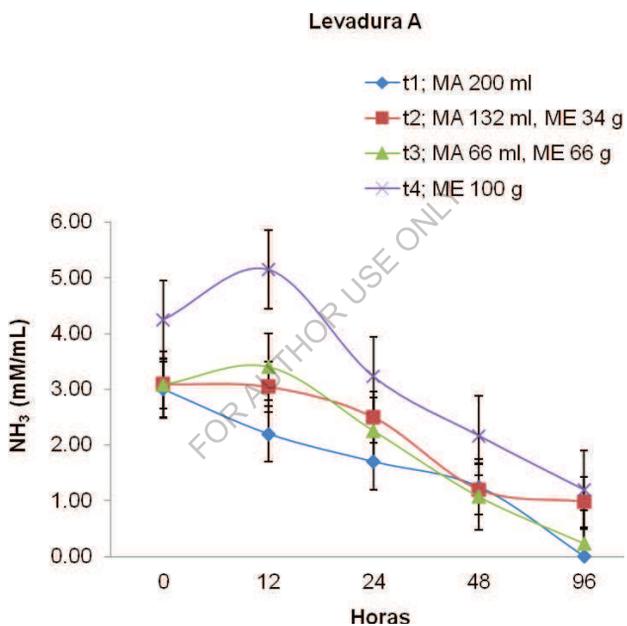
El aumento en la calidad nutritiva de algunos sustratos fermentados, se puede atribuir en gran parte al incrementó de la población de levaduras, es conocido desde hace décadas que su valor proteico es alto y debido a esto, como concentrado, las levaduras pueden ser comparables a la pasta de soya, aun y cuando su contenido de metionina es bajo (Klose y Fevold, 1945).

En otros estudios se ha demostrado que la melaza y la combinación de manzana expuesta a FSS específicamente con levaduras, mejora su calidad nutritiva (Hang *et al.*, 1981; Joshi y Sandhu, 1996) en estudios similares donde usaron la melaza y bagazo de manzana.

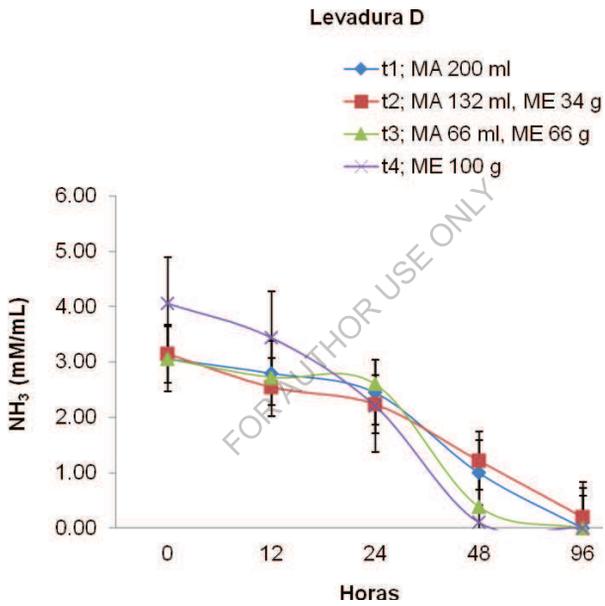
### **Nitrógeno Amoniacal (N-NH<sub>3</sub>)**

En esta variable se encontró efecto ( $P < 0.01$ ) por efecto de la interacción sustrato por levadura y tiempo entre sustratos. El sustrato 4, que contenía el 100% melaza con la levadura A, mostró un incrementó en la concentración de NH<sub>3</sub> de la h0 a la h 12 con un valor de  $4.25 \pm 0.01$  a  $5.15 \pm 0.03$  mM/mL. Los sustratos 1, 2 y 3 mostraron una reducción gradual a partir de la h12 a la h 96 con las diferentes levaduras, (Gráficas 8 y 9).

La urea añadida a los sustratos en procesos de FSS, es transformada a NH<sub>3</sub> por efecto de especies microbianas ureolíticas (Valiño *et al.*, 2002; Calderón *et al.*, 2005), si el sustrato tiene un aporte energético bajo, los microorganismos no pueden incorporarlo en la formación de aminoácidos para



Gráfica 8. Comportamiento en la concentración de nitrógeno amoniacal en los sustratos (MA) manzana, (ME) melaza con la levadura A durante diferentes tiempos de fermentación.



Gráfica 9. Comportamiento en la concentración de nitrógeno amoniacal en los sustratos (MA) manzana, (ME) melaza con la levadura D durante diferentes tiempos de fermentación.

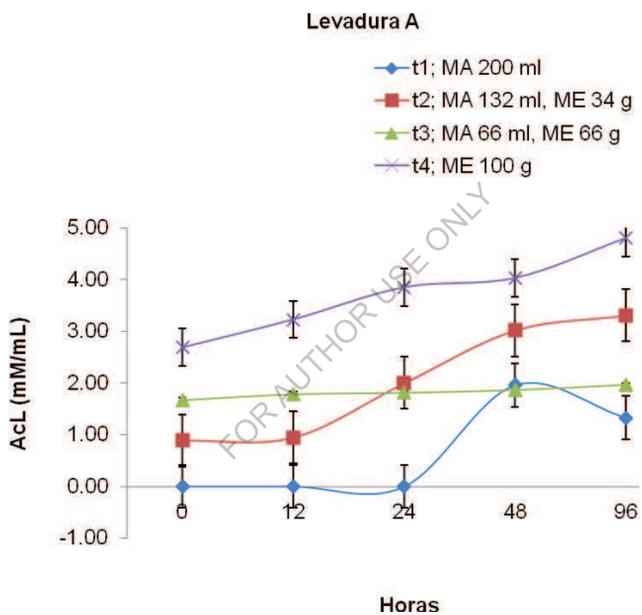
su crecimiento ó lo hacen en una proporción baja. Cuando se tiene un pH bajo, el NH<sub>3</sub> producido es retenido en el sustrato (Rodríguez *et al.*, 2001b).

El NH<sub>3</sub> también puede producirse por actividad desaminativa como lo reporta (Calderón *et al.*, 2005). El NH<sub>3</sub> puede ser utilizado por ciertos microorganismos como forma de energía como resultado de esto, la cantidad de algunos microorganismos presentes en los sustratos fermentados se puede incrementar (Valiño *et al.*, 2002).

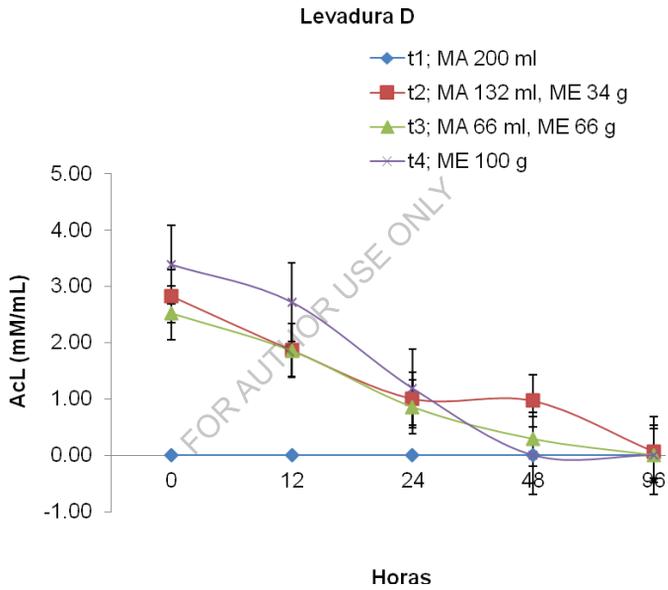
La reducción de NH<sub>3</sub> con la levadura D puede estar relacionada a que las levaduras utilizaron el NH<sub>3</sub> de manera eficiente durante el proceso de fermentación al no presentar excesos en los diferentes sustratos que pudieran alterar o detener la fermentación tal y como sucedió en el presente estudio donde se aprecia que la levadura D consumió la totalidad del amoníaco del medio líquido en la h48.

### **Ácido Láctico (AcL)**

Esta variable mostró significancia ( $P < 0.01$ ) por efecto de la interacción sustrato por levadura y tiempo entre sustratos. El sustrato 1 que contiene 100% manzana reporto los niveles más bajos de AcL con las levaduras A y D en comparación con los demás sustratos. Los sustratos 2, 3 y 4 mostraron un incremento gradual en la producción de AcL con la levadura A en función al tiempo de la h 0 a la h96 (Gráficas 10 y 11). En dichas graficas se observa claramente que la levadura D consume el AcL de los cuatro sustratos no así la levadura A, donde se observa que hubo acumulación de dicho ácido. También se observa que el sustrato melaza mostró una tendencia a producir más este compuesto.



Gráfica 10. Comportamiento en la concentración de ácido láctico en los sustratos (MA) manzana, (ME) melaza con la levadura A.



Gráfica 11. Comportamiento en la concentración de ácido láctico en los sustratos (MA) manzana, (ME) melaza con la levadura D.

El aumento de AcL en las fermentaciones inhibe el crecimiento microbiano e induce a la muerte celular de la levadura (Elías y Lezcano, 1993; Ludovico *et al.*, 2001). Es conocido que la toxicidad del AcL depende del pH en el sistema. A un pH bajo, el AcL presente se encuentra principalmente en forma no disociada y puede entrar a la célula microbiana por difusión pasiva (Geros *et al.*, 2000) en el citoplasma se disocia debido al pH más neutro y se liberan los protones, bajando el pH del citoplasma, lo cual interfiere con algunos senderos metabólicos (Schüller *et al.*, 2004).

El aumento del pH, coincide con la disminución en la concentración de AcL (Cuadro 3 y 4). Esta disminución, pudo haber estado asociada a una fermentación secundaria del AcL, formando otros ácidos orgánicos más débiles. La incorporación de oxígeno por el movimiento del sustrato, elimina las condiciones de anaerobiosis y por lo tanto impide la producción de AcL (Anrique y Viveros, 2002).

Cuadro 3. Medias ( $\pm$  EE) en la comparación de los diferentes sustratos con la levadura A

Variable	Sustratos	Lev	Horas				
			0	12	24	48	96
pH	1	A	3.8 $\pm$ 0.00 <sup>e</sup>	3.5 $\pm$ 0.01 <sup>d</sup>	3.6 $\pm$ 0.01 <sup>f</sup>	3.6 $\pm$ 0.01 <sup>d</sup>	6.0 $\pm$ 0.85 <sup>b</sup>
	2	A	4.9 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>	4.6 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	4.7 $\pm$ 0.05 <sup>d</sup>	4.7 $\pm$ 0.05 <sup>c</sup>	5.6 $\pm$ 0.16 <sup>c</sup>
	3	A	5.2 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	4.8 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	4.8 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>	4.8 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>	5.1 $\pm$ 0.12 <sup>e</sup>
	4	A	5.5 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	5.2 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	5.2 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	5.2 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	5.1 $\pm$ 0.07 <sup>e</sup>
Temperatura °C	1	A	26.1 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	26.6 $\pm$ 0.16 <sup>b</sup>	25.9 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	25.9 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	26.3 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>
	2	A	26.1 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	27.0 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	25.9 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	25.9 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	26.2 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>
	3	A	25.9 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	27.1 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	26.1 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	26.1 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	26.3 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>
	4	A	26.5 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	27.9 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	26.1 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	26.0 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	26.5 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>
Azúcares (g/brix)	1	A	0.5 $\pm$ 0.03 <sup>f</sup>	0.4 $\pm$ 0.06 <sup>f</sup>	0.4 $\pm$ 0.02 <sup>e</sup>	0.4 $\pm$ 0.02 <sup>e</sup>	0.0 $\pm$ 0.00 <sup>d</sup>
	2	A	3.1 $\pm$ 0.05 <sup>d</sup>	2.5 $\pm$ 0.07 <sup>e</sup>	2.2 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>	2.2 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>	1.3 $\pm$ 0.07 <sup>c</sup>
	3	A	5.6 $\pm$ 0.05 <sup>c</sup>	4.0 $\pm$ 0.04 <sup>c</sup>	3.3 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	3.3 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	2.8 $\pm$ 0.18 <sup>b</sup>
	4	A	8.0 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>	5.5 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	4.9 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	4.9 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	3.9 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>
Levaduras (cel/ml)	1	A	9.1 $\times$ 10 <sup>7</sup> $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	1.7 $\times$ 10 <sup>8</sup> $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	2.3 $\times$ 10 <sup>8</sup> $\pm$ 0.00 <sup>d</sup>	3.9 $\times$ 10 <sup>8</sup> $\pm$ 0.01 <sup>d</sup>	5.1 $\times$ 10 <sup>8</sup> $\pm$ 0.04 <sup>e</sup>
	2	A	1.1 $\times$ 10 <sup>8</sup> $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	3.6 $\times$ 10 <sup>7</sup> $\pm$ 0.05 <sup>c</sup>	3.2 $\times$ 10 <sup>8</sup> $\pm$ 0.04 <sup>c</sup>	3.7 $\times$ 10 <sup>8</sup> $\pm$ 0.03 <sup>d</sup>	5.1 $\times$ 10 <sup>8</sup> $\pm$ 0.01 <sup>e</sup>
	3	A	1.1 $\times$ 10 <sup>8</sup> $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	3.9 $\times$ 10 <sup>7</sup> $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	3.8 $\times$ 10 <sup>8</sup> $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	6.5 $\times$ 10 <sup>8</sup> $\pm$ 0.05 <sup>c</sup>	7.5 $\times$ 10 <sup>8</sup> $\pm$ 0.00 <sup>d</sup>
	4	A	8.6 $\times$ 10 <sup>7</sup> $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	3.7 $\times$ 10 <sup>7</sup> $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>	3.6 $\times$ 10 <sup>8</sup> $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	7.7 $\times$ 10 <sup>8</sup> $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	9.6 $\times$ 10 <sup>8</sup> $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>
HN <sub>3</sub> mM/mL	1	A	3.0 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	2.2 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>	1.7 $\pm$ 0.06 <sup>c</sup>	1.2 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	0.0 $\pm$ 0.00 <sup>c</sup>
	2	A	3.1 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	3.0 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	2.5 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	1.2 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.9 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>
	3	A	3.0 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	3.4 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	2.2 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	1.0 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	0.2 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>
	4	A	4.2 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	5.1 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	3.2 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	2.1 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	1.2 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>
ACL mM/mL	1	A	0.0 $\pm$ 0.00 <sup>d</sup>	0.0 $\pm$ 0.00 <sup>d</sup>	0.0 $\pm$ 0.00 <sup>d</sup>	1.9 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	1.3 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>
	2	A	0.8 $\pm$ 0.01 <sup>d</sup>	0.9 $\pm$ 0.05 <sup>d</sup>	2.0 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	3.0 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	3.3 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>
	3	A	1.6 $\pm$ 0.00 <sup>c</sup>	1.7 $\pm$ 0.00 <sup>c</sup>	1.8 $\pm$ 0.00 <sup>c</sup>	1.8 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	1.9 $\pm$ 0.17 <sup>b</sup>
	4	A	2.6 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	3.2 $\pm$ 0.23 <sup>a</sup>	3.8 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	4.0 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	4.8 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>

a, b, c, d, e Literales distintas como superíndice indican diferencia (P&lt;0.01) entre tratamientos

Cuadro 4. Medias ( $\pm$  EE) en la comparación de los diferentes sustratos con la levadura D

Variable	Sustratos	Horas				
		0	12	24	48	96
pH	1	4.0 $\pm$ 0.01 <sup>d</sup>	3.8 $\pm$ 0.07 <sup>c</sup>	3.4 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	4.6 $\pm$ 0.27 <sup>c</sup>	4.7 $\pm$ 0.21 <sup>f</sup>
	2	4.9 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>	4.8 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	4.6 $\pm$ 0.14 <sup>e</sup>	5.5 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	6.2 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>
	3	5.4 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	5.3 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	4.9 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	5.4 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	5.6 $\pm$ 0.17 <sup>c</sup>
	4	5.6 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	5.4 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	5.0 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	5.3 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>	5.3 $\pm$ 0.12 <sup>d</sup>
Temperatura °C	1	26.1 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	27.1 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	26.5 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	26.58 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	26.52 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>
	2	26.2 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	26.9 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	26.4 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	26.40 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	26.16 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>
	3	26.2 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	26.9 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	26.6 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	26.48 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	26.22 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>
	4	26.4 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	27.2 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	26.7 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	26.48 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	26.48 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>
Azúcares (gr/brlx)	1	1.82 $\pm$ 0.06 <sup>e</sup>	0.60 $\pm$ 0.05 <sup>f</sup>	0.2 $\pm$ 0.02 <sup>e</sup>	0.0 $\pm$ 0.00 <sup>e</sup>	0.0 $\pm$ 0.00 <sup>d</sup>
	2	5.22 $\pm$ 0.13 <sup>c</sup>	3.80 $\pm$ 0.03 <sup>d</sup>	1.9 $\pm$ 0.12 <sup>d</sup>	1.8 $\pm$ 0.04 <sup>d</sup>	1.5 $\pm$ 0.05 <sup>c</sup>
	3	6.78 $\pm$ 0.17 <sup>b</sup>	5.32 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	3.3 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>	3.1 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	2.5 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>
	4	8.40 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>	8.18 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>	4.1 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	3.8 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>	3.5 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>
Levaduras (cel/ml)	1	1.5 $\times$ 10 <sup>7</sup> $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>	2.0 $\times$ 10 <sup>8</sup> $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	4.8 $\times$ 10 <sup>8</sup> $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	6.7 $\times$ 10 <sup>8</sup> $\pm$ 0.00 <sup>c</sup>	7.3 $\times$ 10 <sup>8</sup> $\pm$ 0.03 <sup>d</sup>
	2	1.7 $\times$ 10 <sup>7</sup> $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>	2.6 $\times$ 10 <sup>8</sup> $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	5.3 $\times$ 10 <sup>8</sup> $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	8.1 $\times$ 10 <sup>8</sup> $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	7.3 $\times$ 10 <sup>8</sup> $\pm$ 0.03 <sup>d</sup>
	3	1.9 $\times$ 10 <sup>7</sup> $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>	4.1 $\times$ 10 <sup>8</sup> $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	6.6 $\times$ 10 <sup>8</sup> $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	1.1 $\times$ 10 <sup>9</sup> $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	8.9 $\times$ 10 <sup>8</sup> $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>
	4	1.7 $\times$ 10 <sup>7</sup> $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	3.7 $\times$ 10 <sup>8</sup> $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	1.5 $\times$ 10 <sup>9</sup> $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	2.8 $\times$ 10 <sup>9</sup> $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	2.2 $\times$ 10 <sup>9</sup> $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>
HN <sub>3</sub> mM/mL	1	3.0 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	2.8 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	2.4 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	1.0 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	0.0 $\pm$ 0.00 <sup>c</sup>
	2	3.1 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	2.5 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	2.2 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	1.2 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	0.2 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>
	3	3.0 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	2.7 $\pm$ 0.00 <sup>c</sup>	2.6 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	0.3 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	0.0 $\pm$ 0.00 <sup>c</sup>
	4	4.0 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	3.4 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	2.2 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	0.1 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>	0.0 $\pm$ 0.00 <sup>c</sup>
ACL mM/mL	1	0.0 $\pm$ 0.00 <sup>d</sup>	0.0 $\pm$ 0.00 <sup>d</sup>	0.0 $\pm$ 0.00 <sup>d</sup>	0.0 $\pm$ 0.00 <sup>c</sup>	0.0 $\pm$ 0.00 <sup>c</sup>
	2	2.8 $\pm$ 0.15 <sup>b</sup>	1.8 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>	1.0 $\pm$ 0.00 <sup>c</sup>	0.9 $\pm$ 0.09 <sup>c</sup>	0.0 $\pm$ 0.00 <sup>c</sup>
	3	2.5 $\pm$ 0.20 <sup>b</sup>	1.8 $\pm$ 0.00 <sup>c</sup>	0.8 $\pm$ 0.00 <sup>d</sup>	0.2 $\pm$ 0.00 <sup>c</sup>	0.0 $\pm$ 0.00 <sup>c</sup>
	4	3.3 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	2.7 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	1.1 $\pm$ 0.00 <sup>c</sup>	0.0 $\pm$ 0.00 <sup>c</sup>	0.0 $\pm$ 0.00 <sup>c</sup>

a, b, c, d, e Literales distintas como superíndice indican diferencia ( $P < 0.01$ ) entre tratamientos

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En el desarrollo de este inóculo se observó que la levadura D, *Kluyveromyces lactis* mostró la mayor cantidad de levaduras con el sustrato 100% nivel de melaza a las 48 horas de fermentación.

El pH óptimo para el desarrollo de levaduras *Kluyveromyces lactis* fue de 5.30 a 5.65 con una temperatura de 26 °C.

La levadura D mostró mejores resultados en la reducción del ácido láctico y del amoníaco.

En la elaboración de este inóculo se recomienda no utilizar ninguna fuente de minerales y vitaminas siempre y cuando el sustrato sea melaza ya que la melaza aporta minerales y vitaminas, al aportar más minerales y vitaminas puede ocasionar un efecto antagónico que pueda afectar la fermentación.

El proceso de producción de proteína unicelular por medio de la FSS es una vía biotecnológica adecuada para el aprovechamiento de desechos industriales ricos en carbohidratos, por lo que aportara grandes beneficios en la alimentación de los animales al mejorar la respuesta productiva de los animales a menor costo.

## LITERATURA CITADA

- Álvarez, A. 1992. Compendio de temperaturas máximas extremas, mínimas extremas y precipitaciones pluviales. Boletín meteorológico. Estado de Chihuahua. Gobierno del Estado. Dirección de Desarrollo Rural. Servicio Meteorológico y Geográfico. Chihuahua, Chih. Méx.
- Anrique, G., R. y M. P. Viveros. 2002. Efecto del ensilado sobre la composición química y degradabilidad ruminal de la pomasa de manzana. Arch. Med. Vet. 34:189-197.
- Becerra, A., Rodríguez, C., Jiménez, J., Ruiz, O., Elías A y Ramírez, A. 2008. Urea y maíz en la fermentación aeróbica de bagazo de manzana para la producción de proteína. Tecno Ciencia Chihuahua 2:7-14.
- Broderick, G. A., and J. H. Kang. 1980. Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and *in vitro* media. J. Dairy. Sci. 63:64-75.
- Calderón, A., J. O., A. Elías I. y M. Valdivie N. 2005. Dinámica de la fermentación en estado sólido de las camas de cascarilla de café en Inicio de ponedoras inoculadas con vitafert. Rev. Elect. Vet. 5:1-7.
- Díaz P., D. 2006. Producción de proteína microbiana a partir de manzana de desecho adicionada con urea y pasta de soya. Tesis de Maestría. Facultad de Zootecnia. Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua. Méx.
- Díaz-Plascencia, D., C. Rodríguez. Muela, P. Mancillas-Flores, C. Angulo. F. Salvador, C. Arzola, J. A. Jiménez, S. Mena y A. Elías. 2010a. Producción de proteína microbiana a partir de manzana de desecho con fermentación en estado sólido a 32 °C. Rev. Elect. Vet.10: 1-9.
- Díaz-Plascencia, D., C. Rodríguez. Muela, P. Mancillas-Flores, C. Angulo. F. Salvador, O. Ruiz, H. O. Rubio, S. Mena y A. Elías. 2010b. Desarrollo de un inóculo con diferentes sustratos mediante fermentación sólida sumergida. Rev. Elect. Vet.10:1-10
- Elías, A. y Lezcano, O. 1993. Efecto de la fuente de N y algunos factores de crecimiento en la población de levaduras que se establecen en la producción de Saccharina. Rev. Cub. Cienc. Agríc. 28:319-325.
- Elías, A., O. Lezcano, P. Lezcano, J. Cordero y L. Quintana. 1990. Reseña descriptiva sobre el desarrollo de una tecnología de enriquecimiento proteico de la caña de azúcar mediante fermentación en estado sólido (*Saccharina*). Rev. Cub. Cienc. Agríc. 24:3-12.

- Experimental Biosciences. 2010. Microscopy and related methods. Introductory Laboratory Courses in Biochemistry and Cell Biology. <http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/methods/microscopy/cellcounting.html>. Consultado Mar. 01, 2011.
- Ferrer, J.R., G. Páez, Z. Mármol, E. Ramones, H. García y C. Forster. 1996. Acid hydrolysis of shrimp-shell wastes and the production of single cell protein from hydrolysate. *Biores. Technol.* 57: 55-60.
- Geros, H., Cassio, F. y Leao, C. 2000. Utilization and transport of acetic acid in *Dekkera anomala* and their implications on the survival of the yeast in acidic environments. *J. Food. Prot.* 63: 96-101.
- Hang, Y. D., C. Y. Lee, E. E. Woodams y H. J. Cooley. 1981. Production of alcohol from apple pomace. *Appl. Environm. Microbiol.* 42:1128-1129.
- Ibarra, A., Y. García, E. Valiño, J. Dustet, N. Albelo y T. Carrasco. 2002. Influence of aeration on the bioconversion of sugarcane bagasse by *Trichoderma viride* M5-2 in a static bioreactor of solid fermentation. *Cub. J. Agri. Sci.* 36:152-158.
- Joshi, V. K. y D. K. Sandhu. 1996. Preparation and evaluation of an animal feed byproduct produced by solid-state fermentation of apple pomace. *Bioresour Technol.* 56:251-255.
- Klose, A. A. y H. L. Fevold. 1945. Nutritional value of yeast protein to the rat and the chick. *J. Nutrition.* 29:421-430.
- Kosaric, N., M. Bottner y R. Blaszyk. 1989. Growth of *Saccharomyces cerevisiae* in stillage from alcohol fermentation of Jerusalem Artichokes. *Proc. Biochem.* 25: 92-96.
- Lila, Z.A., Mohammed, N., Yasui, T., Kurokawa, Y., Kanda, S y Itabashi, H. 2004. Effects of a twin strain of *Saccharomyces cerevisiae* live cells on mixed ruminal microorganism fermentation *in vitro*. *J. Anim. Sci.* 82:1847-1854.
- Ludovico, P., João, S.M., Silva, M.T., Leão, C. y Côrte-Real. 2001. *Saccharomyces cerevisiae* commits to programmed Cell death process in response to acetic acid. *Microbiol. Rev.* 147: 2409-2415.
- Lyutskanov, N., L. Koleva, L. Stateva, P. Venkov y A. Hadjiolov. 1990. Protein extracts for nutritional purposes from fragile strains of *Saccharomyces cerevisiae*: Reduction of the nucleic acid content and applicability of the protein extracts. *J. Basic. Microbiol.* 30: 523-528.

- Miller-Webster, T., W. H. Hoover, M. Holt y J. E. Nocek. 2002. Influence of yeast culture on ruminal microbial metabolism in continuous culture. *J. Dairy. Sci.* 85:2009-2014.
- Morgan, F. 2003. La pulpa de café enriquecida. Un aporte al desarrollo sostenible en la zona montañosa de Guantánamo. Tesis Doctoral. Instituto de Ciencia Animal. La Habana, Cuba.
- Oeztuerk, H., Schroeder, B., Beyerbach, M. y Breves, G. 2005. Influence of living and autoclaved yeasts of *Saccharomyces boulardii* on *in vitro* ruminal microbial metabolism. *J. Dairy. Sci.* 88: 25-2600.
- Peña R., G., A. Calderón, R. A. Muñoz H., A. Florido, O. Flores M. y C. Falcony G. 2002. Influencia del tamaño de grano en la conductividad térmica a altas temperaturas en polvos aislantes de MgO. *Superficies y vacío.* 14:44-48.
- Peñalosa, W., M. R. Molina, R. Gómez-Brenes y R. Bressani. 1985. Solid state fermentation: an alternative to improve the nutritive value of coffee pulp. *Appl. Environm. Microbiol.* 49:388-393.
- Reid, I. D. 1985. Biological delignification of aspen wood by solid-state fermentation with the white-rot fungus *merulius tremellosus*. *Appl. Environm. Microbiol.* 50:133-139.
- Rodríguez, Z., A. Elías, R. Bocourt y O. Núñez. 2001a. Efectos de los niveles de nitrógeno ureico en la síntesis proteica durante la fermentación de mezclas de caña (*Saccharum officinarum*) y boniato (*Ipomea batata Lam.*). *Rev. Cub. Cien. Agrí.* 35:29-36.
- Rodríguez, Z., R. Bocourt, A. Elías y M. Madera. 2001b. Dinámica de fermentación de mezclas de caña (*Saccharum officinarum*) y boniato (*Ipomea batata*). *Rev. Cub. Cien. Agrí.* 35:147-151.
- Rodríguez-Muela, C., D. Díaz, F. Salvador, O. Ruiz, C. Arzola, A. Flores, O. La O y A. Elías. 2010. Efecto del nivel de urea y pasta de soya en la concentración de proteínas durante la fermentación en estado sólido de la manzana (*Malus domestica*). *Rev. Cub. Cien. Agríc.* 44: 23-26.
- Ruíz, C. J., M. Ruíz, G. Ruíz y V. Torres. 2002. Effect of Inclusion of ammonium Sulfate on the elaboration of rustic saccharina. *J. Cub. Sci. Agrí.* 36:147-152.
- SAS. 2004. SAS/STAT® 9.1 User's Guide. SAS Institute Inc. Estados Unidos de Norteamérica.

- Schüller, C., Mamnun, Y.M., Mollapour, M., Krapf, G., Shuster, M., Bauer, B.E., Piper, P.W. y Kuchler, K. 2004. Global phenotypic analysis and transcriptional profiling defines the weak acid stress response regulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *MBC Online*. 15:706-720.
- Tai Shin, H., Beom Lim, Y., Ho Koh, J., Yun Kim, J., Young Baig, S y Heung Lee, J. 2002. Growth of *Issatchenkia orientalis* in aerobic batch and fed-batch cultures. *J. Microbio.* 40: 82-85.
- Taylor, K. A. C. C. 1996. A simple colorimetric assay for muramic acid and lactic acid. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 56: 49-58.
- Valiño, E., A. Elias, V. Torres y N. Albelo. 2002. Study of the microbial contenton fresh sugar cane bagasse as substrate for animal feeding by solid state fermentation. *J. Cub. Sci. Agri.* 36:359-364.

FOR AUTHOR USE ONLY

**ESTUDIO II. COMPORTAMIENTO FERMENTATIVO DE OCHO CEPAS DE  
LEVADURAS AISLADAS DE SUBPRODUCTOS DE MANZANA MEDIANTE  
LA TÉCNICA DE PRODUCCIÓN DE GAS *IN VITRO***

FOR AUTHOR USE ONLY

## RESUMEN

Con el objetivo de evaluar el comportamiento fermentativo *in vitro* de ocho cepas de levaduras aisladas a partir de subproductos de manzana, fueron desarrollados ocho inóculos de levaduras con las siguientes cepas 2, 9, 11 y 13 de *Kluyveromyces lactis* (KI); 3 y 8 de *Issatchenkia orientalis* (Io); 4 y 6 de *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), para ser evaluados mediante la técnica de producción de gas *in vitro*. Los ocho tratamientos consistieron de 0.2 g muestra de alimento + 10 mL líquido ruminal + 20 mL saliva artificial y 1 mL de inóculo de las diferentes cepas. Los diferentes inóculos fueron evaluados en 120 frascos de vidrio de 50 mL, con 3 repeticiones por tratamiento y diferentes tiempos de muestreo 12, 24 y 48 h para las variables nitrógeno amoniacal (NH<sub>3</sub>), ácido láctico (AcL) y conteo de levaduras (CL) 3, 6, 12, 24 y 48h para la producción de gas (PG). Los datos se evaluaron con el procedimiento (Proc Mixed del SAS 9.0) para un diseño al azar de ocho tratamientos en parcelas divididas en el tiempo. Los resultados mostraron efecto (P<0.01) de cepa y tiempo de fermentación en las variables NH<sub>3</sub>, AL y CL. Los valores más bajos de NH<sub>3</sub> fueron observados con la cepa KI-2 y los más altos con las cepas Io-3, Io-8 y Sc-6, con valores de 22.5, 24.8, 24.8 y 24.1 mM/mL, respectivamente. En el CL se encontró efecto (P<0.01) con un mejor desempeño de las cepas KI-2, KI-9, KI-11, KI-13 y Sc-6 con conteos celulares de 1.9, 1.3, 1.2, 1.1 y 1.0 x 10<sup>7</sup> cel/mL, respectivamente a las 48h. Por lo tanto, se concluye que la levadura *K lactis* mostró ser la cepa más efectiva para la fermentación ruminal con mejor comportamiento en cuanto a mayor conteo de células y reducción de ácido láctico.

## ABSTRACT

### IN VITRO RUMINAL FERMENTATION OF DAIRY COW DIETS WITH EIGHT YEAST STRAINS ISOLATED FROM APPLE BYPRODUCTS

In order to evaluate the performance of yeast for *in vitro* fermentation by the technique of *in vitro* gas production. Eight strains of yeasts (*Kluyveromyces lactis*, KI, strains 2, 9, 11 and 13; *Issatchenkia orientalis*, Io, strains 3 and 8, and 4; and *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), strain 6) were isolated from apple products and incubated (1mL) with 0.2 g of food sample, 10 mL of rumen fluid and 20mL of artificial saliva. The inoculates were evaluated in 120 glass bottles (50 mL, 3 replicates / treatment) at different sampling times (12, 24 and 48h) comparing ammonia nitrogen (AN), lactic acid (LA), yeast counts (YC) (at 3, 6, 12, 24 and 48h) and gas production (GP). Data were analysed with the procedure PROC MIXED of SAS into a random design of eight treatments in a split plot in time. The results showed effect ( $P < 0.01$ ) of strain and fermentation time for AN, LA and YC. The lowest values were observed for AN KI-2 strain while strains Io-3, Io-8 and SC-6 had the highest values (22.5, 24.8, 24.8 and 24.1 mM/mL, respectively). In the YC was found an effect ( $P < 0.01$ ), where strains KI-2, KI-9, KI-11, KI-13 and SC-6 had cell counts of 1.9, 1.3, 1.2, 1.1 and  $1.0 \times 10^7$  cells/mL, respectively at 48h. Therefore as a conclusion, *K. lactis* yeast strain was shown to be more effective for ruminal fermentation with the highest performance in terms of increased cell counts and reduction of lactic acid.

## INTRODUCCIÓN

El desempeño productivo de los rumiantes está en función del valor nutricional de la dieta que consumen. Muchos sustratos pueden ser utilizados para ser fermentados, entre estos, los subproductos de manzana (Joshi y Sandhu, 1996) los cuales pueden ser usados como alimento para producción animal.

La búsqueda de alternativas de alimentos económicamente viables para los animales que mejoren su productividad y que no compitan con la alimentación humana y que además constituyan fuentes naturales y seguras para la salud humana y la de los propios animales son algunas de las primicias para los nutriólogos (Calsamiglia *et al.*, 2005).

Una de las alternativas actualmente utilizadas es el uso de los aditivos alimenticios de levaduras, compuestos fundamentalmente por *Saccharomyces cerevisiae*, que han permitido mejorar la salud y la productividad de los rumiantes (Miller-Webster *et al.*, 2002; Lila *et al.*, 2004).

La técnica de producción de gas *in vitro* (PG) es una técnica que no es nueva pero que ha sido perfeccionada, permitiendo obtener la cinética de fermentación del forraje cuando éste es incubado dentro de frascos. Mediante esta técnica se puede predecir que el volumen de producción de gas corresponde a cierta cantidad degradada de materia seca (Theodorou *et al.*, 1994; Posada y Noguera, 2005; Villegas-Castañeda *et al.*, 2010). Una de las ventajas de este procedimiento es que el curso de la fermentación y el papel de los componentes solubles del sustrato puede ser cuantificado (Pell *et al.*, 1997). Un problema inherente a los métodos *in situ* e *in vitro* que se han tratado de

solucionar a través de la técnica de PG es el estudio de las fases tempranas de la fermentación, ya que los procedimientos gravimétricos no son lo suficientemente sensibles para medir los pequeños cambios que ocurren en el peso del sustrato durante las primeras horas de fermentación (Rosero, 2002).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el comportamiento de ocho diferentes cepas de levaduras autóctonas, obtenidas de la fermentación de subproductos de manzana de la variedad *Golden Delicious* mediante la técnica producción de gas *in vitro*.

FOR AUTHOR USE ONLY

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Localización del Área de Trabajo**

El estudio se llevó a cabo en el laboratorio de nutrición animal de la Facultad de Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua, ubicada en el km 1 del Periférico Francisco R. Almada de la ciudad de Chihuahua; latitud norte 28° 35', longitud oeste 106° 04', con una altitud de 1595 m.s.n.m.; tiene una temperatura media anual de 17 °C (Álvarez, 1992).

### **Material y Equipo Experimental**

El material utilizado para este experimento fue: ocho cepas de levaduras obtenidas de la fermentación del bagazo de manzana, melaza de caña, urea, sulfato de amonio, premezcla de minerales y vitaminas, agua destilada, balanza analítica, matraces Erlenmeyer de 1,000 mL (Kimax)<sup>®</sup>, bombas oxigenadoras portátiles, mangueras y conexiones de plástico, envases de plástico de 10 mL, frascos de vidrio de 50 mL, malla de nylon<sup>®</sup>, potenciómetro de mesa (HANNA)<sup>®</sup>, microscopio, cámara de Neubauer<sup>MR</sup>, refractómetro HI 96801(HANNA)<sup>®</sup>, termómetro digital (TAYLOR)<sup>®</sup>, espectrofotómetro Coleman Junior<sup>®</sup> II modelo 6|20, Incubadora Shaker I2400, CO<sub>2</sub> y tres vacas holstein en producción fistuladas con promedio de 600 kg de peso vivo.

### **Material Biológico y Medios de Cultivo**

Las ocho cepas de levaduras que se utilizaron para este trabajo fueron obtenidas a partir de la fermentación en estado sólido de bagazo de manzana (BM), las cuales fueron identificadas a través de la extracción y amplificación del ADN<sub>r</sub> 18S mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), en el laboratorio de transgénesis animal de la Facultad de

Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua. Para la identificación se realizó un cultivo de levaduras por dilución seriada y se aislaron 16 colonias a las cuales se les extrajo ADN para amplificar una región del ADNr 18S (752 pb). El producto de PCR obtenido se sometió a secuenciación y el análisis de las secuencias se realizó con el programa Blast de la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

El análisis de las secuencias mostró que las levaduras correspondientes a las 16 colonias aisladas fueron: *Saccharomyces cerevisiae*; *Issatchenkia orientalis* y *Kluyveromyces lactis* (Villagrán *et al.*, 2009). Las cepas utilizadas para este trabajo fueron *K. lactis*, cepas 2, 9, 11 y 13; *I. orientalis*, cepas 3 y 8; *S. cerevisiae*, cepas 4 y 6, todas obtenidas a partir de la fermentación en estado sólido del BM.

Las cepas se mantuvieron viables mediante resiembras periódicas en cuñas y en cajas petri. El medio que se utilizó fue Extracto de Malta a razón de 33.6 g/L y el tiempo de incubación fue de 48 horas a una temperatura de 30 °C. Posteriormente, se conservaron en refrigeración a una temperatura de 4 °C.

### **Preparación de Inóculos**

Se utilizaron ocho cepas de levaduras para la elaboración de ocho inóculos, todos contaron con la adición de 100 g de melaza, 1 g de levadura obtenidas de las diferentes cepas, 1.2 g de urea, 0.2 g de sulfato de amonio y 0.5 g de premezcla de vitaminas y minerales traza aforándose a 1,000 mL con agua destilada y utilizando oxigenadores para cada matraz, el tiempo de fermentación para cada inóculo fue de 96 h a una temperatura ambiente promedio de 20 °C. Una vez terminado el tiempo de fermentación para cada

uno de los inóculos, se procedió a realizar los conteos de levaduras, a lo que posteriormente se realizaron diluciones de cada uno hasta ajustarlos a en  $1.8 \times 10^9$  células viables/mL.

### **Tratamientos**

Con las ocho cepas se prepararon ocho tratamientos: t1) 0.2 g de muestra + 10 mL líquido ruminal + 20 mL saliva artificial y 1 mL inóculo cepa 2; t2) 0.2 g de muestra + 10 mL líquido ruminal + 20 mL saliva artificial y 1 mL inóculo cepa 9; t3) 0.2 g de muestra + 10 mL líquido ruminal + 20 mL saliva artificial y 1 mL inóculo cepa 11; t4) 0.2 g de muestra + 10 mL líquido ruminal + 20 mL saliva artificial y 1 mL inóculo cepa 13; t5) 0.2 g muestra + 10 mL líquido ruminal + 20 mL saliva artificial y 1 mL inóculo cepa 3; t6) 0.2 g de muestra + 10 mL líquido ruminal + 20 mL saliva artificial y 1 mL inóculo cepa 8; t7) 0.2 g de muestra + 10 mL líquido ruminal + 20 mL saliva artificial y 1 mL inóculo cepa 4 y; t8) 0.2 g de muestra + 10 mL líquido ruminal + 20 mL saliva artificial y 1 mL inóculo cepa 6.

Sus combinaciones fueron evaluadas en 120 frascos de vidrio de 50 mL, con 3 repeticiones por tratamiento (t) y diferentes horas (h) de muestreo 12, 24 y 48 h para las variables; conteos de levaduras (CL), nitrógeno amoniacal ( $\text{NH}_3$ ) y ácido láctico (AcL); y 3, 6, 12, 24 y 48 h para la PG.

### **Variables Medidas**

#### **Conteo de Levaduras (CL)**

Para este análisis se tomó como base, la metodología descrita por (Díaz, 2006). Se realizó en las mismas condiciones que se describen en la primer parte de este trabajo.

### **Nitrógeno Amoniacal (N-NH<sub>3</sub>)**

De las muestras líquidas obtenidas de la h 12, 24 y 48 se determinó por colorimetría según el procedimiento de (Broderick y Kang, 1980) siguiendo los mismos procedimientos que se describen en la primer parte de este trabajo.

### **Ácido Láctico (Acl)**

De las muestras líquidas obtenidas de la h 12, 24 y 48 se determinó por colorimetría según el procedimiento de (Taylor, 1996) siguiendo los mismos procedimientos que se describen en la primer parte de este trabajo.

### **Producción de Gas *In Vitro* (PG)**

El procedimiento de PG *in vitro* fue hecho de acuerdo a la técnica de Menke y Steingass (1988) con algunas modificaciones hechas por (Muro, 2007). Este método es usado para determinar la cantidad de gas producido para forrajes en un periodo de incubación de 96 h. La cantidad de gas liberado está estrechamente relacionado con la degradabilidad del alimento.

La preparación de la muestra involucró el molido del sustrato en una malla de 1mm (Menke *et al.*, 1979). Se secaron las muestras a 105 °C por 8 horas. El medio ruminal *in vitro* estuvo formado por búferes de bicarbonato y fosfato, un agente reductor, una fuente de nitrógeno, varios minerales y resazurina. El CO<sub>2</sub> fue usado durante la preparación del medio para asegurar un ambiente anaerobio en el tiempo de inoculación. La solución A (micro mineral) está constituida por 13.2 g CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 10.0 g MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 1.0 g CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 8.0 g FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O en 100 mL con agua destilada; la solución B (solución búfer) consta de 39.0 g NaHCO<sub>3</sub> ó 35.0 g NaHCO<sub>3</sub> + 4.0 g de (NH<sub>4</sub>) HCO<sub>3</sub> en 1 litro con agua destilada; la solución C (macro mineral) está constituida por 5.7 g

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 6.2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.6 g  $\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  en 1 litro con agua destilada; solución resazurina (100 mg de resazurina) hecha en 100 mL con agua destilada; y la solución reductora que consta de 4 mL 1N NaOH, 625 mg  $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ , agregado a 95 mL de agua destilada.

La incubación se llevó a cabo en frascos de vidrio de 50 mL; dentro de estos se colocó 0.2 g de muestra, 10 mL de líquido ruminal y 20 mL de saliva artificial y 1 mL de levadura de los diferentes inoculos por tratamiento.

Para la recolección del líquido de ruminal se utilizaron tres vacas Holstein en producción con un peso promedio de 600 kg, fistuladas en el saco dorsal del rumen y provistas con una cánula simple (Bar Diamond, Inc). Las mismas se encontraban estabuladas en cubículos individuales y consumían una dieta integral formada por grano de maíz, semilla de algodón, salvado de trigo, grasa animal, grasa de sobre paso, gluten de maíz, harinolina, pasta de soya, melaza de caña, minerales traza, bicarbonato de calcio, sal común, urea, ensilaje como forraje y alfalfa más agua a voluntad.

La composición química de la dieta consumida por las vacas fistuladas en (base seca) fue la siguiente: MS, 61.13; PC, 17.80; FC, 21.87; Ceniza, 11.13, EE, 4.45 y ELN, 44.75 de acuerdo al método de la AOAC, (2000).

El fluido ruminal se colectó 15 minutos antes de iniciar la prueba con la ayuda de una bomba de vacío. La toma del fluido ruminal colectado de las vacas fue realizada en la mañana inmediatamente antes de la alimentación, considerando que los microorganismos son menos activos pero más consistentes en su composición y actividad (Menke y Steingass, 1988; Blümmel y Orskov, 1993). Las muestras se trasladaron al laboratorio en un

termo con capacidad para 1000 mL herméticamente cerrado previamente atemperado y posteriormente se filtró a través de muselina. El procedimiento se realizó bajo atmósfera de CO<sub>2</sub> con el propósito de garantizar las condiciones de anaerobiosis. Los frascos con muestra, líquido ruminal y saliva artificial se sellaron y se incubaron a 39 °C con agitación constante (68 rpm), protegiéndolos de la luz; el periodo de evaluación duró 48 h. La presión interna de los frascos (ejercida por la PG) se midió con un transductor de presión a las 3, 6, 12, 24 y 48 h de incubación. Los valores de presión se convirtieron a volumen de producción de gas (PG en mL) según Theodorou *et al.*, (1994) la PG neta/h de cada muestra, se obtuvo de la diferencia de la PG observada menos el promedio de PG del blanco. Los datos se expresaron en mililitros de PG por cada 0.2 g de materia seca (mL PG/0.2 g MS).

#### **Parámetros de Fermentación Ruminal *In Vitro* (A, B, C)**

Las soluciones A, B, C y resazurina se agregaron dentro de un matraz con agua destilada, el cual se introdujo en un incubador rotatorio (Incubador Shaker I2400) a 39 °C, posteriormente se le agregó la solución reductora y se burbujeó CO<sub>2</sub> a toda la mezcla hasta que el color de tornó de azul a rosa y finalmente claro (transparente). El fluido ruminal previamente colectado fue filtrado a través de una media de nylon y mezclado junto con la saliva artificial, la relación final saliva artificial: fluido ruminal fue de 2:1. Es de mencionar que los parámetros A, B y C solo se utilizaron para la preparación de las muestras, pero no se utilizaron en la interpretación de los resultados debido a que solo se busco ver el efecto de degradación ruminal *in vitro* en el tiempo de este experimento.

### **Análisis Estadístico**

Se realizó con un modelo mixto, utilizando como efectos fijos el tiempo y tipo de cepa (inóculo). Como efecto aleatorio, se utilizó la repetición anidada dentro de cada tratamiento; los datos se evaluaron con el procedimiento (Proc Mixed ) del programa SAS, (2004) para un diseño al azar de ocho tratamientos en parcelas divididas en el tiempo.

### **Modelo Estadístico**

$$Y_{iju} = \mu + C_i + R(C_{ij}) + T_k + C^*T_{ik} + \epsilon_{ijk}$$

Donde:

- $Y_{ijk}$ .- es la variable de respuesta
- $\mu$ .- es la media general
- $C_i$ .- es el efecto del i-ésimo nivel de cepa
- $R(C_{ij})$ .- es el efecto de la repetición del i-ésimo nivel de cepa
- $T_k$ .- es el efecto del j-ésimo tiempo de fermentación sobre la variable de respuesta
- $C^*T_{ik}$ .- es el efecto de la interacción del i-ésimo nivel de cepa por tiempo
- $\epsilon_{ijk}$ .- es el error experimental

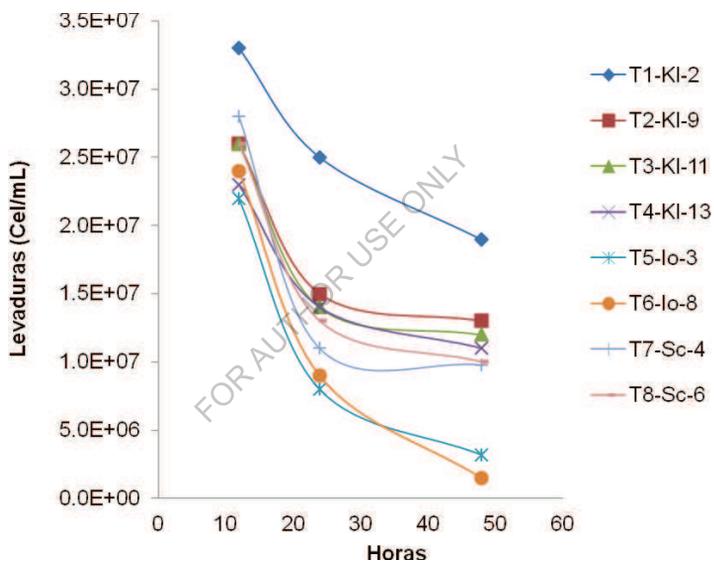
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Conteo de Levaduras (CL)

Se encontró efecto ( $P < 0.01$ ) por la interacción tiempo por inóculo, esto indica que hubo diferencias en la cantidad de levaduras con un incremento en los distintos tratamientos en función al tiempo. La concentración más alta de levaduras que se encontró en la producción de gas (PG) se observó en el t1, con la cepa KI-2 que sobresalió en todos los tiempos de muestreo, el t5 con la cepa lo-3 y el t6 con la cepa lo-8 desaparecieron rápidamente del ambiente ruminal como aparece en la (Gráfica 12).

Las levaduras de los diferentes inóculos sometidas a la PG disminuyeron gradualmente a medida que transcurrió el tiempo de fermentación lo cual coincide con resultados similares obtenidos por (Ingledey y Jones, 1982; Arambel y Rung-Syin, 1987; Castillo, 2009) cuando estudiaron el crecimiento de la *S. cerevisiae* en ambiente ruminal. Estos autores señalan que las levaduras son incapaces de mantener una población productiva dentro del ambiente ruminal, ya que este contiene factores inhibitorios para su crecimiento como la temperatura.

Los inóculos t1, t2, t3 y t4 con la levadura *K. lactis* y t8, con la levadura *S. cerevisiae* mostraron tener una mayor población de levaduras en el rumen con respecto a los demás inóculos hasta la h48, esto debido al aprovechamiento del ácido láctico como una fuente de energía para seguir viables y seguir desarrollándose, lo que concuerda con otros trabajos realizados por Rodríguez, (2009) y Díaz-Plascencia *et al.*, (2010a).



Gráfica 12. Comportamiento ruminal de los diferentes inóculos de levaduras durante la producción de gas.

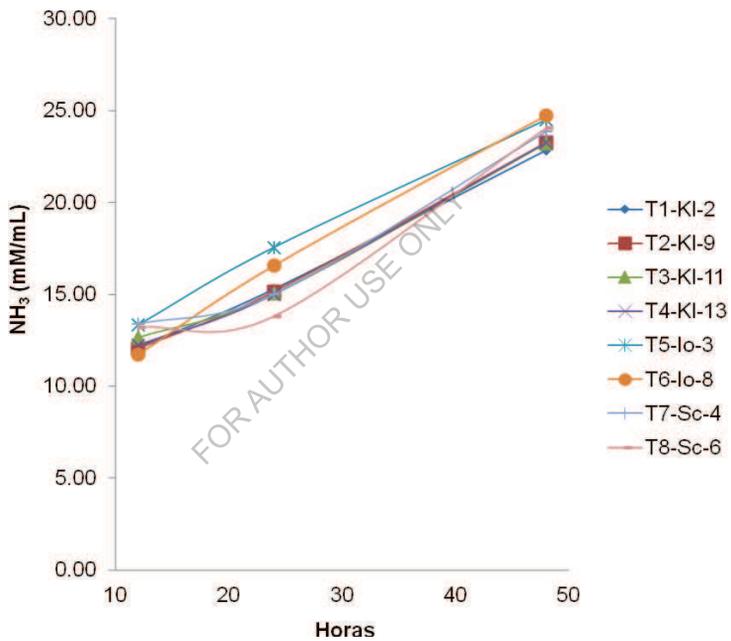
Los inóculos t5, t6 y t7 proporcionaron una concentración de levaduras aceptables, pero de inmediato las mismas entran en fase de degradación, lo que corrobora lo planteado por Williams *et al.*, (1990).

Sin embargo es de mencionar que el proceso de fermentación anaeróbica en el rumen por parte de los microorganismos convierte a los sustratos principalmente en carbohidratos y proteínas, en proteína microbiana y otros productos finales de la fermentación como lo son los ácidos grasos volátiles, bióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), péptidos y aminoácidos entre otros (Henderickx y Martin, 1963; Mc Donald *et al.*, 2002 y Dehority, 2003).

### **Nitrógeno Amoniacal (N-NH<sub>3</sub>)**

Se encontró efecto ( $P < 0.01$ ) por la interacción tiempo por inóculo, indicando diferente comportamiento entre las cepas a través del tiempo de fermentación, este incrementó de tratamiento lo cual fue más marcado en los tratamientos t5, t7 y t8 con valores de 13.32±0.28 a 24.52±0.00 mM/mL en t5, 13.37±0.02 a 23.85±0.10 mM/mL en t7, 13.21±0.14 a 24.05±0.07 mM/mL en t8; (Gráfica 13).

El nitrógeno amoniacal (N-NH<sub>3</sub>) constituye la fuente principal de nitrógeno para los microorganismos ruminales, el cual puede suplir entre el 40 y el 100% de las necesidades de nitrógeno para la síntesis de proteína microbiana (Dewhurst *et al.*, 2000). Este efecto es dado por la urea añadida a los sustratos en los procesos de fermentación, ya que es transformada a NH<sub>3</sub> por efecto de especies microbianas ureolíticas así lo han reportado diversos autores en diferentes trabajos en la producción de manjarina y sacharina



Gráfica 13. Concentración de amoníaco en los diferentes inóculos de levaduras durante la producción de gas.

principalmente, mostrando efectos similares a este (Valiño *et al.*, 2002; Calderón *et al.*, 2005; Rodríguez, 2009; Díaz-Plascencia *et al.*, 2010b).

Si el sustrato tiene un aporte energético bajo, los microorganismos no pueden incorporarlo en la formación de aminoácidos para su crecimiento o lo hacen en una proporción baja. Cuando se tiene un pH bajo el NH<sub>3</sub> producido es retenido en el sustrato, Díaz-Plascencia *et al.*, (2010a). El NH<sub>3</sub> también puede producirse por actividad desaminativa y de esta manera el NH<sub>3</sub> puede ser utilizado por ciertos microorganismos que no hidrolizan la urea agregada al medio de fermentación y como resultado, la cantidad de algunos microorganismos presentes en los sustratos fermentados se puede incrementar e incluso pueden desaparecer, haciendo que se incrementen o bajen los niveles de NH<sub>3</sub>; como resultado de esto, se modifica el medio de fermentación y provoca cambios en el pH, en la velocidad de tránsito ruminal y en la población microbiana predominante, que a su vez pueden alterar la actividad proteolítica (Cardozo *et al.*, 2000; Cardozo *et al.*, 2002)

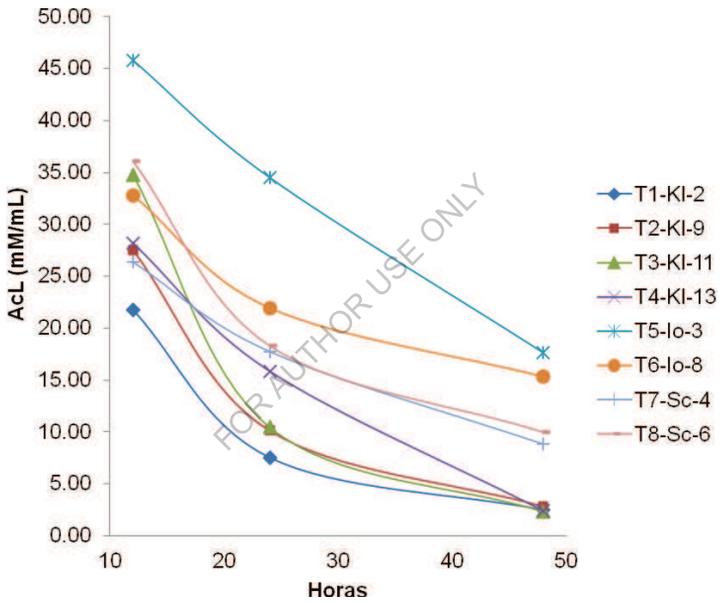
### **Ácido Láctico (AcL)**

En el análisis de los datos de esta variable se observó un efecto (P<0.01) en las horas de fermentación sobre la concentración de AcL, en todos los tratamientos. Los valores estimados de las medias de los tratamientos t1, t2, t3 y t4 con el inóculo de la levadura *K. lactis*, presentaron más pérdida de AcL en comparación a los otros inóculos de la h 12 a la h 48 con valores de 21.75±0.31 a 2.47±0.01 mM/mL en t1, 27.54±0.30 a 2.82±0.34 mM/mL en t2, 34.77±0.22 a 2.37±0.31 mM/mL en t3, 28.14±0.20 a 2.39±0.07 mM/mL en t4.

El comportamiento para esta variable por parte de las cepas de los tres géneros diferentes, se aprecia que a las 48 horas, las cuatro cepas de *K. lactis* tuvieron menos AcL, luego las dos cepas del género *S. cerevisiae* y las que más concentración mostraron de AcL fueron las dos cepas de *I. orientalis*, (Gráfica 14).

El incremento de AcL en algunas fermentaciones inhibe el crecimiento microbiano e induce a la muerte celular de la levadura o de los microorganismos presentes, así lo manifiestan varios estudios (Elías y Lezcano, 1993; Madrid *et al.*, 1999 y Ludovico *et al.*, 2001). Es conocido que la toxicidad del AcL depende del pH en el sistema. A un pH bajo, el AcL presente se encuentra principalmente en forma no disociada y puede entrar a la célula microbiana por difusión pasiva (Geros *et al.*, 2000); en el citoplasma se disocia debido al pH más neutro y se liberan los protones, bajando el pH del citoplasma, lo cual interfiere con algunos senderos metabólicos (Schüller *et al.*, 2004), así como en el transporte de nutrientes e iones, cambiando la estructura de la membrana, en los ácidos grasos, la composición de los fosfolípidos y la síntesis de proteína (Madrid *et al.*, 1999; Ramos *et al.*, 2006).

El ácido láctico es producido por el catabolismo de los carbohidratos y es el mejor indicador de la correcta fermentación de los forrajes en condiciones anaerobias, sin embargo la levadura *K. lactis*, tiene un efecto muy marcado en la utilización del AcL al utilizarlo como fuente de energía para seguir sobreviviendo por periodos prolongados, (Cuadro 5).



Gráfica 14. Comportamiento del ácido láctico en los diferentes inóculos de levaduras durante la producción de gas.

Cuadro 5. Medias ( $\pm$  EE) del comportamiento fermentativo *in vitro* entre tratamientos de ocho cepas de levaduras

Variable	Tratamientos	Cepa	Horas		
			12	24	48
NH <sub>3</sub> (mM/mL)	1	KI-2	12.1 $\pm$ 0.75 <sup>a</sup>	15.3 $\pm$ 0.33 <sup>b</sup>	22.8 $\pm$ 0.35 <sup>b</sup>
	2	KI-9	12.0 $\pm$ 1.15 <sup>a</sup>	15.1 $\pm$ 0.48 <sup>b</sup>	23.2 $\pm$ 0.33 <sup>b</sup>
	3	KI-11	12.6 $\pm$ 0.76 <sup>a</sup>	15.0 $\pm$ 0.32 <sup>b</sup>	23.2 $\pm$ 0.31 <sup>b</sup>
	4	KI-13	12.2 $\pm$ 0.59 <sup>a</sup>	15.0 $\pm$ 0.86 <sup>b</sup>	23.2 $\pm$ 0.21 <sup>b</sup>
	5	Io-3	13.3 $\pm$ 0.28 <sup>a</sup>	17.5 $\pm$ 1.67 <sup>a</sup>	24.5 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>
	6	Io-8	11.7 $\pm$ 0.72 <sup>a</sup>	16.5 $\pm$ 1.65 <sup>a</sup>	24.7 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>
	7	Sc-4	13.3 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	15.0 $\pm$ 0.40 <sup>b</sup>	23.8 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>
	8	Sc-6	13.2 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>	13.8 $\pm$ 0.23 <sup>c</sup>	24.0 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>
AcL (mM/mL)	1	KI-2	21.7 $\pm$ 0.31 <sup>d</sup>	7.5 $\pm$ 0.10 <sup>e</sup>	2.4 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>
	2	KI-9	27.5 $\pm$ 0.30 <sup>c</sup>	10.1 $\pm$ 0.04 <sup>d</sup>	2.8 $\pm$ 0.34 <sup>c</sup>
	3	KI-11	34.7 $\pm$ 0.22 <sup>b</sup>	10.4 $\pm$ 0.18 <sup>d</sup>	2.3 $\pm$ 0.31 <sup>c</sup>
	4	KI-13	28.1 $\pm$ 0.20 <sup>c</sup>	15.8 $\pm$ 0.35 <sup>c</sup>	2.3 $\pm$ 0.07 <sup>c</sup>
	5	Io-3	45.7 $\pm$ 0.39 <sup>a</sup>	34.4 $\pm$ 0.28 <sup>a</sup>	17.6 $\pm$ 0.31 <sup>a</sup>
	6	Io-8	32.8 $\pm$ 0.34 <sup>b</sup>	21.9 $\pm$ 0.51 <sup>b</sup>	15.3 $\pm$ 0.43 <sup>a</sup>
	7	Sc-4	26.3 $\pm$ 0.30 <sup>c</sup>	17.7 $\pm$ 0.47 <sup>c</sup>	8.8 $\pm$ 0.32 <sup>b</sup>
	8	Sc-6	36.1 $\pm$ 0.36 <sup>b</sup>	18.2 $\pm$ 0.18 <sup>c</sup>	9.9 $\pm$ 0.39 <sup>b</sup>
Levaduras (cel/mL)	1	KI-2	3.3 $\times$ 10 <sup>7</sup> $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	2.5 $\times$ 10 <sup>7</sup> $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	1.9 $\times$ 10 <sup>7</sup> $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>
	2	KI-9	2.6 $\times$ 10 <sup>7</sup> $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	1.5 $\times$ 10 <sup>7</sup> $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	1.3 $\times$ 10 <sup>7</sup> $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>
	3	KI-11	2.6 $\times$ 10 <sup>7</sup> $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	1.4 $\times$ 10 <sup>7</sup> $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	1.2 $\times$ 10 <sup>7</sup> $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>
	4	KI-13	2.3 $\times$ 10 <sup>7</sup> $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>	1.4 $\times$ 10 <sup>7</sup> $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	1.1 $\times$ 10 <sup>7</sup> $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>
	5	Io-3	2.2 $\times$ 10 <sup>7</sup> $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>	8.0 $\times$ 10 <sup>6</sup> $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>	3.2 $\times$ 10 <sup>6</sup> $\pm$ 0.26 <sup>d</sup>
	6	Io-8	2.4 $\times$ 10 <sup>7</sup> $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	9.0 $\times$ 10 <sup>6</sup> $\pm$ 0.00 <sup>c</sup>	1.5 $\times$ 10 <sup>6</sup> $\pm$ 0.05 <sup>e</sup>
	7	Sc-4	2.8 $\times$ 10 <sup>7</sup> $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	1.1 $\times$ 10 <sup>7</sup> $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	9.8 $\times$ 10 <sup>6</sup> $\pm$ 0.00 <sup>c</sup>
	8	Sc-6	2.6 $\times$ 10 <sup>7</sup> $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	1.3 $\times$ 10 <sup>7</sup> $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	1.0 $\times$ 10 <sup>7</sup> $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>

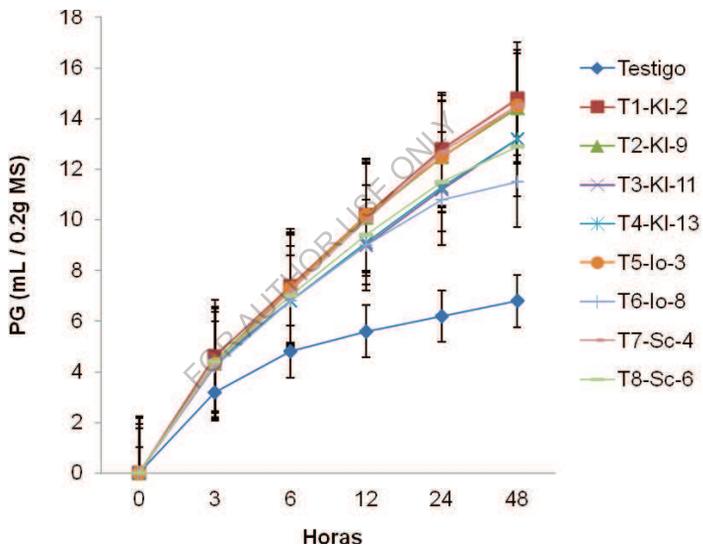
a, b, c, d, e Literales distintas como superíndice indican diferencia ( $P < 0.01$ ) entre tratamientos

### **Producción de Gas (PG)**

Se observó efecto ( $P < 0.01$ ) sobre la PG en todos los tratamientos. En los inóculos donde se incluyeron las diferentes cepas de levaduras, se puede observar el máximo incremento de la PG acumulada en la h 3 y en la h 48 con valores de  $4.63 \pm 0.06$  a  $2.00 \pm 0.05$  PG en mL/0.2g MS en t1,  $4.36 \pm 0.08$  a  $2.00 \pm 0.03$  PG en mL/0.2g MS en t2,  $4.36 \pm 0.12$  a  $2.03 \pm 0.03$  PG en mL/0.2g MS en t3 y  $4.26 \pm 0.012$  a  $1.93 \pm 0.08$  PG en mL/0.2g MS en t4, todas del género *K. lactis* (Gráfica 15 y Cuadro 6).

La velocidad y grado de fermentación de los carbohidratos en el rumen varía según el tipo y estructura de los mismos (Ivan *et al.*, 2005) y según la población microbiana predominante (Dehority, 2003). El incremento en la producción de gas que se obtuvo con estas cepas que podría ser el resultado del incremento de la producción de ácido propiónico debido a que el dióxido de carbono es producido cuando el ácido propiónico es formado por alguna bacteria ruminal por la ruta metabólica succinato propionato (Wolin y Miller, 1988). Tang *et al.*, (2008), también encontraron un efecto positivo en la adición de un cultivo de levaduras en la producción de gas de pajas de diferentes cereales.

Resultados similares coinciden por varios autores cuando utilizaron la técnica PG para evaluar el comportamiento de las levaduras frente a diferentes sustratos (Lila *et al.*, 2004; Marrero, 2005; Castillo, 2009).



Gráfica 15. Producción de gas acumulada entre cepas en los diferentes inóculos de levaduras durante la fermentación ruminal.

Cuadro 6. Medias ( $\pm$  EE) de producción de gas entre cepas de levaduras durante la fermentación ruminal *in vitro* (PG en mL/0.2g MS)

Tratamientos	Cepa	Horas				
		3	6	12	24	48
T	testigo	3.16 $\pm$ 0.03 <sup>e</sup>	1.63 $\pm$ 0.12 <sup>h</sup>	0.83 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	0.60 $\pm$ 0.00 <sup>f</sup>	0.60 $\pm$ 0.00 <sup>g</sup>
1	KI-2	4.63 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	2.80 $\pm$ 0.00 <sup>c</sup>	2.80 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	2.60 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	2.00 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>
2	KI-9	4.36 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	2.86 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	2.83 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	2.36 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>	2.03 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>
3	KI-11	4.36 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>	2.40 $\pm$ 0.00 <sup>g</sup>	2.23 $\pm$ 0.03 <sup>e</sup>	2.23 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>	2.03 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>
4	KI-13	4.26 $\pm$ 0.12 <sup>e</sup>	2.46 $\pm$ 0.03 <sup>f</sup>	2.33 $\pm$ 0.08 <sup>d</sup>	2.20 $\pm$ 0.05 <sup>c</sup>	1.93 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>
5	lo-3	4.26 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>	2.96 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	2.93 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	2.33 $\pm$ 0.27 <sup>b</sup>	1.03 $\pm$ 0.08 <sup>e</sup>
6	lo-8	4.16 $\pm$ 0.12 <sup>d</sup>	2.60 $\pm$ 0.11 <sup>d</sup>	2.16 $\pm$ 0.06 <sup>f</sup>	1.80 $\pm$ 0.00 <sup>e</sup>	0.66 $\pm$ 0.14 <sup>f</sup>
7	Sc-4	4.33 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	2.86 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	2.83 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	2.66 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	1.80 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>
8	Sc-6	4.36 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	2.56 $\pm$ 0.03 <sup>e</sup>	2.46 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>	2.10 $\pm$ 0.10 <sup>d</sup>	1.43 $\pm$ 0.06 <sup>d</sup>

a, b, c, d, e, f, g, h Literales distintas como superíndice indican diferencia ( $P < 0.01$ ) entre tratamientos

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

De las ocho cepas de levaduras utilizadas en este experimento, la *K. lactis*, mostró ser la más viable en la producción de gas y la que resistió más a la degradación ruminal, mostrando tener un mejor desempeño en la producción de levaduras y en la participación por reducir el ácido láctico.

Las levaduras *S. cerevisiae* y *I. orientalis*, mostraron tener un papel importante durante la fermentación, siendo estas las que dan las condiciones primarias a la levadura *K. lactis*, para los procesos de fermentación posteriores.

Las levaduras son incorporadas a las dietas con el propósito de mejorar la salud y sobre todo el desempeño de los animales y mejorar sus características zootécnicas, por lo que es recomendable seguir probando este inóculo de levaduras obtenidas a partir del bagazo de manzana, con la finalidad de seguir mejorándolo.

## LITERATURA CITADA

- Álvarez, A. 1992. Compendio de temperaturas máximas extremas, mínimas extremas y precipitaciones pluviales. Boletín meteorológico. Estado de Chihuahua. Gobierno del Estado. Dirección de Desarrollo Rural. Servicio Meteorológico y Geográfico. Chihuahua, Chih. Méx.
- AOAC. 2000. Official Method of analysis. 16th Ed. Ass. Off. Agric. Chem. Washington, D.C.
- Arambel, M. J. Rung-Syin, T. 1987. Evaluation of *Saccharomyces cerevisiae* growth in the rumen ecosystem. Memories. 19th Biennial conference on rumen function. 17-19.
- Blümmel, M. and Orskov, E.R. 1993. Comparison of *in vitro* gas production and nylon bag degradability of roughages in predicting food intake in cattle. Anim. Feed Sci. Techno. 40: 109-119.
- Broderick, G. A., and J. H. Kang. 1980. Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and *in vitro* media. J. Dairy. Sci. 63:64-75.
- Calderón A., J. O., A. Elías I. y M. Valdivie N. 2005. Dinámica de la fermentación en estado sólido de las camas de cascarilla de café en Inicio de ponedoras inoculadas con Vitafer. Rev. Elect. Vet. 5:1-7.
- Cardozo, P., Calsamiglia, S. y Ferret, A. 2000. Effects of pH on microbial fermentation and nutrient flow in a dual flow continuous culture system. J. Dairy. Sci. 83 (Suppl. 1): 265. (Abstract)
- Cardozo, P., Calsamiglia, S. y Ferret, A. 2002. Effects of pH on nutrient digestion and microbial fermentation in a dual flow continuous culture system fed a high concentrate diet. J. Dairy. Sci. 85 (Suppl. 1):182. (Abstract)
- Calsamiglia, S., Castillejos, L., Busquet, M. 2005. Estrategias nutricionales para modificar la fermentación ruminal en vacuno lechero. XXI Curso de Especialización FEDNA. Madrid. España. 161-185.
- Castillo C., Y. 2009. Fermentación *in vitro* para obtener la levadura *Candida Norvegenesis* en mezclas de alfalfa con bagazo de manzana fermentado y sus efectos sobre la actividad microbiana ruminal. Disertación Doctoral. Facultad de Zootecnia y Ecología. Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua. Méx.
- Dehority, B.A. 2003. Rumen Microbiology. Nottingham University Press. 19-43.

- Dewhurst, R.J., Davues, D.R. y Merry, R.J. 2000. Microbial protein supply from the rumen. *Anim. Feed. Sci. Techno.* 85: 1-21.
- Díaz P., D. 2006. Producción de proteína microbiana a partir de manzana de desecho adicionada con urea y pasta de soya. Tesis de Maestría. Facultad de Zootecnia. Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua. Méx.
- Díaz-Plascencia D., C. Rodríguez. Muela, P. Mancillas-Flores, C. Angulo. F. Salvador, O. Ruiz, H. O. Rubio, S, Mena y A. Elías. 2010a. Desarrollo de un inóculo con diferentes sustratos mediante fermentación sólida sumergida. *Rev. Elect. Vet.*10:1-10.
- Díaz-Plascencia D., C. Rodríguez. Muela, P. Mancillas-Flores, C. Angulo. F. Salvador, C. Arzola, J. A. Jiménez, S, Mena y A. Elías. 2010b. Producción de proteína microbiana a partir de manzana de desecho con fermentación en estado sólido a 32 °C. *Rev. Elect. Vet.*10:1-9.
- Elías, A. y Lezcano, O. 1993. Efecto de la fuente de N y algunos factores de crecimiento en la población de levaduras que se establecen en la producción de Saccharina. *Rev. Cub. Cienc. Agríc.* 28:319-322.
- Geros, H., Cassio, F. y Leao, C. 2000. Utilization and transport of acetic acid in *Dekkera anomala* and their implications on the survival of the yeast in acidic environments. *J. Food. Prot.* 63: 96-101.
- Henderickx, H. y Martin, J. 1963. *In vitro* study of the nitrogen metabolism in the rumen. *Compt. Rend. Rech. Inst. Rech. Sci. Indust. Agric.* 31:7-12.
- Ingledeu, W.M. y Jones, G. A. 1982. The fate of live brewer's yeast slurry in bovine rumen fluid. *J. Inst. Brew.* 88:18-20.
- Ivan, S. K., Grant, R.J., Weakley, D. and Beck, J. 2005. Comparison of a corn silage hybrid with high cell wall content and digestibility with a hybrid of lower cell-wall content on performance of Holstein cows. *J. Dairy. Sci.* 88:244-254.
- Joshi, V. K. y D. K. Sandhu. 1996. Preparation and evaluation of an animal feed byproduct produced by solid-state fermentation of apple pomace. *Bioresour Technol.* 56:251-255.
- Lila, Z.A., Mohammed, N., Yasui, T., Kurokawa, Y., Kanda, S y Itabashi, H. 2004. Effects of a twin strain of *Saccharomyces cerevisiae* live cells on mixed ruminal microorganism fermentation *in vitro*. *J. Anim. Sci.* 82:1847-1854.

- Ludovico, P., João, S.M., Silva, M.T., Leão, C. y Côrte-Real. 2001. *Saccharomyces cerevisiae* commits to programmed cell death process in response to acetic acid. Microbiol. Rev. 147: 2409–2415.
- Madrid, J., A. Martínez-Teruel, F. Hernández y M. D. Megías. 1999. A comparative study on the determination of lactic acid in silage juice by colorimetric, high-performance liquid chromatography and enzymatic methods. J. Sci. Food. Agri. 79:1722-1726.
- Marrero, Y. 2005. Las levaduras como mejoradoras de la fermentación ruminal de dietas con alto contenido de fibra. Tesis Doctoral. Instituto de Ciencia animal. La Habana, Cuba.
- McDonald, P., R. A. Edwards, J. F. D Greenhalgh, y C. A. Morgan. 2002. Animal Nutrition. 6th edition. Pearson Education. U.S.A.
- Menke, K. H., Raab, L., Salewski, A., Steingass, H., Fritz, D. and Schneider, W. 1979. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. J. Agric. Sci. 93: 217-222.
- Menke, K. H. and Steingass, H. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. Anim. Research. Development. 28: 7-55.
- Miller-Webster, T., W. H. Hoover, M. Holt y J. E. Nocek. 2002. Influence of yeast culture on ruminal microbial metabolism in continuous culture. J. Dairy. Sci. 85:2009-2014.
- Muro, R., A. 2007. Cinética de degradación ruminal de tres fuentes de forraje mediante la técnica de digestibilidad *in vitro* por producción de gas. Disertación Doctoral. Facultad de Zootecnia y Ecología Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua. Méx.
- Pell, A., N. Doane P H and Schofield P. 1997. *In vitro* digestibility and gas production. Página 109-132 em memórias del Simpósio sobre Tópicos Especiais em Zootecnia, Lavras.
- Posada S. L., y R. R. Noguera. 2005. Técnica *in vitro* de producción de gases: una herramienta para la evaluación de alimentos para ruminantes. Liv. Res. Rural. Development. 17:36-38.
- Ramos, J.A., Elías, A. y Herrera, F. 2006. Processes for production of energy protein feed for animals. Effect of four energy sources on solid state fermentation of sugarcane. Cub. J. Agri. Sci. 40: 47-53.

- Rodríguez, R., H. E. 2009. Producción y evaluación de alimentos fermentados a partir de bagazo y desecho de manzana y su efecto sobre el desarrollo ruminal y parámetros sanguíneos. Disertación Doctoral. Facultad de Zootecnia y Ecología Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua. Méx.
- Rosero, J., R. 2002. Estudo químico, "*in situ*", "*in vitro*" e microscópico da paredes celular de cinco genótipos de sorgo colhidos em três épocas de corte. Ph. D. Thesis. Belo Horizonte: Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.
- SAS. 2004. SAS/STAT® 9.1 User's Guide. SAS Institute Inc. Estados Unidos de Norteamérica.
- Schüller, C., Mamnun, Y.M., Mollapour, M., Krapf, G., Shuster, M., Bauer, B.E., Piper, P.W. y Kuchler, K. 2004. Global phenotypic analysis and transcriptional profiling defines the weak acid stress response regulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *MBC Online*. 15:706-720.
- Tang, S.X., Tayo, G.O., Tan, Z.L. Sun, Z.H., Shen, L.X., Zhou, C.S., Xiao, W.J., Ren, G.P., Han, X.F y Shen, S.B. 2008. Effects of yeast culture and fibrolytic enzyme supplementation on *in vitro* fermentation characteristics of low-quality cereal straws. *J. Anim. Sci.* 86: 1164-1172.
- Taylor, K. A. C. C. 1996. A simple colorimetric assay for muramic acid and lactic acid. *Appli Biochemis and Biotechnol* 56: 49-58.
- Theodorou M K, Williams B. A., Dhanoa M. S., McAllan A. B. y France J 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim. Feed. Sci. Techno.* 48: 185-197.
- Valiño, E., A. Elias, V. Torres y N. Albelo. 2002. Study of the microbial contenton fresh sugar cane bagasse as substrate for animal feeding by solid state fermentation. *Cub. J. Agri. Sci.* 36:359-364.
- Villagran, D., Rodríguez-Muela, C., Burrola, E., González, E., Ortega, A. 2009. Identificación de levaduras involucradas en la fermentación en estado sólido de bagazo de manzana. Página 2 en Memorias de la XLV Reunión Nacional de Investigación Pecuaria. Saltillo, Coah, Méx.
- Villegas-Castañeda, M., Meneses-Mayo, M., Miranda-Romero, L.A., Loera-Corral, O. 2010. Producción de gas *in vitro* y desaparición de la materia seca del cultivo sólido con hongos ligninolíticos. *Agrociencia*. 44: 917-929.
- Williams, P. E. V., Walter, A., Macrae, J. C. 1990. Rumen probiosis: the effects of addition of yeast culture (viable yeast *Saccharomyces cerevisiae* plus

growth medium) on duodenal pro-teín flow in wether sheep. Proc. Nutr. Soc. 49:128 (Abstr).

Wollin, M. J. y Miller, T. L. 1988. Microbe-microbe interactions. Rumen microbial ecosystem. P.N. Hobson, ed. Elseivers Science, Essex, U.K. p 343.

FOR AUTHOR USE ONLY

**ESTUDIO III. CINÉTICA DE FERMENTACIÓN *IN VITRO* DE RACIONES  
PARA VACAS HOLSTEIN ALTAS PRODUCTORAS ADICIONADAS CON UN  
INÓCULO A BASE DE LEVADURAS**

## RESUMEN

Con el objetivo de determinar el nivel óptimo de un inóculo a base de levaduras, adicionado a dietas para vacas holstein altas productoras mediante la técnica de producción de gas *in vitro*, fueron evaluados cuatro tratamientos: t1) 0.2 g de muestra de la dieta sin adición de levaduras t2) 0.2 g de muestra con  $3 \times 10^{11}$  cel/kg de MS; t3) 0.2 g de muestra con  $6 \times 10^{11}$  cel/kg de MS y t4) 0.2 g de muestra con  $9 \times 10^{11}$  cel/kg de MS. Además, todos los tratamientos contaron con 10 mL de líquido ruminal + 20 mL saliva artificial. El inóculo fue elaborado a partir de 4 cepas de levaduras: *Kluyveromyces lactis*, cepas 2 y 11; *Issatchenkia orientalis*, cepa 3 y *Saccharomyces cerevisiae*, cepa 6. Las variables evaluadas fueron pH, conteo de levaduras (CL), conteo de protozoos (CP), nitrógeno amoniacal (NA), ácido láctico (AcL), ácidos grasos volátiles (AGV) con muestreos a las 12, 24, 48 y 96 h y para la producción de gas (PG) con muestreos a las 3, 6, 12, 24, 48 y 96 h. Los datos se evaluaron con el procedimiento (PROC MIXED) para un diseño al azar de cuatro tratamientos en parcelas divididas en el tiempo. Todas las variables evaluadas mostraron ( $P < 0.01$ ) de tratamiento por la interacción de tiempo. El pH se incrementó ( $P < 0.01$ ) a través del tiempo de 7.1 a 7.4; en tanto que los tratamientos t2, t3 y t4 con inóculo mostraron un descenso gradual a partir de la h12 a la h24. En el CL se incremento ( $P < 0.01$ ) con mayor producción el t4, ( $1.8 \times 10^7 \pm 0.01$  cel/mL a la h48). CP sobresalió ( $P < 0.01$ ) en el t4, con  $2.0 \times 10^7 \pm 0.00$  cel/mL a la h48. El NA subió ( $P < 0.01$ ) en todos los tratamientos de la h12 a la h96. El AcL bajo ( $P < 0.01$ ) con la adición del aditivo en el t2, t3 y t4 con un marcado descenso en la reducción del AcL, de la h12 a la h96 con valores de  $7.12 \pm 0.19$  a  $2.04 \pm 0.19$

mM/mL en t2 de  $6.73 \pm 0.19$  a  $1.36 \pm 0.17$  mM/mL en t3 y de  $10.73 \pm 0.29$  a  $1.95 \pm 0.16$  mM/mL en t4 siendo este el que mejor reducción presentó de AcL. La producción de AGV's subió ( $P < 0.01$ ) entre tratamientos con mayor concentración de acetato, propionato y butirato los cuales fueron superiores en el t2 con una mayor concentración de estos compuestos a las 12 y 24 h. Se concluye que la adición del inóculo a las dietas favoreció la PG, CL, CP y AGV's con una marcada reducción del AcL con la adición del inóculo a la dieta en los t2, t3 y t4 mostrando que el nivel más adecuado de inóculo para ser empleado en las dietas para vacas altas productoras fue de 10mL/kg de MS.

FOR AUTHOR USE ONLY

## ABSTRACT

### IN VITRO FERMENTATION KINETICS OF RATIONS OF HIGH PRODUCING HOLSTEIN COWS WITH A YEAST BASED ADDITIVE

In order to determine the optimal level of yeast-based inoculums added to diets for high producing Holstein cows, four levels of the enzyme were evaluated using the technique of *in vitro* gas production: T1) 0.2 g of diet sample without yeast; t2) 0.2 g of sample with  $3 \times 10^{11}$  cells/kg; t3) 0.2 g of sample with  $6 \times 10^{11}$  cells/kg and t4) 0.2 g of sample with  $9 \times 10^{11}$  cells/kg. All treatments were also added with 10 mL of rumen fluid and 20 ml artificial saliva. The inoculum was prepared from 4 strains of yeasts: *Kluyveromyces lactics*, strains 2 and 11; *Issatchenkia orientalis*, *Saccharomyces cerevisiae* strain 3 and strain 6. The variables studied were pH, yeast count (YC), protozoa count (PC), ammonia nitrogen (AN), lactic acid (LA), volatile fatty acids (VFA) on samples at 12, 24, 48 and 96h of gas production (GP) with samples at 3, 6, 12, 24, 48 and 96h. Data were analyzed with PROC MIXED procedure of SAS into a randomized design of four treatments in a split plot in time. All variables showed ( $P < 0.01$ ) interaction treatment x time. t1 showed a gradual increase over time of pH from 7.1 to 7.4, while the t2, t3 and t4 showed a gradual decrease from 12h to 24h. YC was also affected ( $P < 0.01$ ) having a higher production in t4 ( $1.8 \times 10^7 \pm 0.01$  cells/mL at 48h). PC was considerably higher ( $P < 0.01$ ) in t4, with  $2.0 \times 10^7 \pm 0.00$  cells/mL at 48h. All treatments had different ( $P < 0.01$ ) AN from 12h to 96h. LA was reduced ( $P < 0.01$ ) in t2, t3 and t4 with the additive from 12h to 96h (t2= $7.12 \pm 0.19$  to  $2.04 \pm 0.19$  mM/mL, t3= $6.73 \pm 0.19$  to  $1.36 \pm 0.17$  mM/mL and t4  $10.73 \pm 0.29$  to  $1.95 \pm 0.16$  mM/mL) being t4 the best to reduce LA. VFA production increased

( $P < 0.01$ ) between treatments resulting the higher concentrations of acetate, propionate and butyrate in t2 at 12 and 24h. It is concluded that the addition of inoculums to diets favored GP, YC, PC and VFA with a marked reduction of LA on t2, t3 and t4. The most appropriate level of inoculums to be used in diets for cow's production resulted to be t2 (10 mL/kg of DM).

FOR AUTHOR USE ONLY

## INTRODUCCIÓN

El uso indiscriminado de promotores de crecimiento en la producción animal y la creciente demanda por satisfacer las necesidades de alimentos, en una sociedad cada vez más exigente, se plantean nuevas alternativas para reducir el uso de aditivos que pongan en riesgo la salud humana y animal.

Algunos microorganismos benéficos, conocidos como 'probióticos', así como ciertas biomoléculas y compuestos derivados, se suministran directamente a los animales para mejorar su metabolismo, salud y producción (Glade y Biesik, 1986; Wiedmeier *et al.*, 1987; Cole *et al.*, 1992).

Los probióticos estimulan la digestión y ayudan a mantener el equilibrio microbial en el intestino de los animales, acciones que contrarrestan el estrés derivado de los cambios en las dietas, las condiciones detriminales de manejo, y el ataque de patógenos (Kornegay *et al.*, 1995; Anderson *et al.*, 1999).

Las enzimas, vitaminas y otros nutrientes o factores de crecimiento producidos por estos microorganismos originan respuestas de producción benéficas en los animales que los consumen (Kornegay *et al.*, 1995; Castro y Rodríguez, 2005).

El uso de un inóculo de levaduras *Kluyveromyces lactis* obtenido a partir del bagazo de manzana, por medio de la técnica fermentación sólida sumergida (FSS) ha contribuido en el desarrollo de levaduras de gran utilidad en la nutrición y alimentación animal, al aportar de una manera eficiente levaduras efectivas benéficas activas (LEBAS), siendo una vía biotecnológica adecuada para el aprovechamiento de desechos agroindustriales ricos en carbohidratos (Díaz-Plascencia *et al.*, 2010).

El objetivo del presente trabajo fue determinar el nivel óptimo de un inóculo a base de levaduras, adicionado a dietas para vacas Holstein altas productoras mediante la técnica de producción de gas *in vitro*.

FOR AUTHOR USE ONLY

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Localización del Área de Trabajo

El estudio se llevó a cabo en el laboratorio de nutrición animal de la Facultad de Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua, ubicada en el km 1 del Periférico Francisco R. Almada de la ciudad de Chihuahua; latitud norte 28° 35', longitud oeste 106° 04', con una altitud de 1595 m.s.n.m.; tiene una temperatura media anual de 17 °C (Álvarez, 1992).

### Material y Equipo Experimental

El material utilizado para este experimento fue: cuatro cepas de levaduras obtenidas del bagazo de manzana, melaza de caña, urea, sulfato de amonio, agua destilada, suero de leche, balanza analítica, bombas oxigenadoras, mangueras y conexiones de plástico, envases de plástico de 10 mL, frascos de vidrio de 50 mL, maya de nylon<sup>®</sup>, potenciómetro de mesa (HANNA)<sup>®</sup>, microscopio, cámara de Neubauer<sup>MR</sup>, refractómetro HI 96801(HANNA)<sup>®</sup>, termómetro digital (TAYLOR)<sup>®</sup>, espectrofotómetro Coleman Junior<sup>®</sup> II modelo 6|20, Incubadora Shaker I2400, cromatógrafo SRI 8610 CO<sub>2</sub> y tres vacas Holstein fistuladas con promedio de 620 kg de peso vivo, alimentadas con una dieta típica para vacas en producción.

### Preparación del Inóculo

Las cepas de levaduras utilizadas para este trabajo fueron: *Kluyveromyces lactis*, cepas 2 y 11; *Issatchenkia orientalis*, cepa 3 y *Saccharomyces cerevisiae* cepa 6, todas obtenidas a partir de la fermentación en estado sólido del bagazo de manzana (BM), las cuales fueron identificadas a través de la extracción y amplificación del ADNr 18S mediante la reacción en

cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), en el laboratorio de transgénesis animal de la Facultad de Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua (Villagrán *et al.*, 2009). Además se agregaron 250 g de melaza de caña, suero de leche 750 mL,  $1 \times 10^8$  células vivas de levaduras de las diferentes cepas, 2 g de urea, .04 g de sulfato de amonio por inóculo utilizando un oxigenador; el tiempo de fermentación para el inóculo fue de 96 h a una temperatura ambiente promedio de 28 °C. Una vez terminado el tiempo de fermentación se realizó el conteo de levaduras encontrando la cantidad de  $1.2 \times 10^9$  para posteriormente ajustar la cantidad de células requeridas por tratamiento; empleando las mismas condiciones y metodología que se describen en la segunda parte de este trabajo.

### **Tratamientos**

t1) Testigo: 0.2 g de muestra de la dieta sin adición del inóculo + 10 mL líquido ruminal + 20 mL saliva artificial; t2) 0.2 g de muestra con  $3 \times 10^{11}$  cel/kg de MS+ 10 mL líquido ruminal + 20 mL saliva artificial; t3) 0.2 g de muestra con  $6 \times 10^{11}$  cel/kg + 10 mL líquido ruminal + 20 mL saliva artificial y t4) 0.2 g de muestra con  $9 \times 10^{11}$  cel/kg + 10 mL líquido ruminal + 20 mL saliva artificial.

Para cada tratamiento se pesó 1 Kg de MS de alimento (ración completa) ofreciéndose a las vacas altas productoras, (Cuadro 7). Posteriormente se molió la muestra de alimento y se agregó la cantidad mencionada de inóculo de levaduras por tratamiento en una charola de plástico, se mezcló manualmente y se homogenizó con el alimento, posteriormente se tomó la cantidad de 0.2 g de muestra de la dieta y se depositó en frascos de vidrio de 50 mL a lo que se les agregó también: 10 mL líquido ruminal + 20 mL saliva artificial, (Cuadro 8).

Cuadro 7. Contenido y análisis calculado de la dieta para vacas Holstein altas productoras con producción esperada de 35 L de leche vaca/d utilizada en el experimento

Ingredientes	%
Alfalfa	25
Maíz rolado	20
Pasta de soya	14
Cáscara de soya	13
Salvado de trigo	10
Semilla de algodón	10
Melaza	4
Grasa de sobrepaso (vegetal de palma)	2.5
Premezcla de vitaminas y minerales	0.5
Ortofosfato	0.5
Bicarbonato de sodio	0.5
Total	100
<i>Análisis Calculado</i>	
Energía neta lactante	1.73 MC/Kg
Materia seca	85.69 %
Proteína total	17.29 %
Extracto etéreo	5.85 %
Fibra detergente neutro	32.70 %
Fibra detergente ácido	23.10 %
Fibra cruda	17.84 %
Cenizas	5.93 %
Fosforo total	0.58 %
Calcio	0.87 %
Magnesio	0.22 %
Potasio	1.47 %

\* Formulación y análisis calculado por medio del software Nutrión 5

\*\* Requerimientos nutricionales tomados del (NRC, 2001)

Cuadro 8. Diseño de tratamientos con diferentes niveles de inóculo

Tratamientos	Muestra g	Inóculo cel/kg	Líquido ruminal mL	Saliva artificial mL
t1 (0 mL)	0.2	0	10	20
t2 (10 mL/kg)	0.2	$3 \times 10^{11}$	10	20
t3 (20 mL/kg)	0.2	$6 \times 10^{11}$	10	20
t4 (30 mL/kg)	0.2	$9 \times 10^{11}$	10	20

Sus combinaciones fueron evaluadas en 48 frascos de vidrio de 50 mL, con 3 repeticiones por tratamiento (t) y diferentes horas (h) de muestreo 12, 24, 48 y 96 h para las variables; pH, conteos de levaduras (CL), conteos de protozoarios, nitrógeno amoniacal (NH<sub>3</sub>), ácido láctico (AcL), producción de gas (PG), ácidos grasos volátiles (AGV's).

Para la producción de gas *in vitro* (PG) fueron utilizados 12 frascos de vidrio de 50 mL con 3 repeticiones por tratamiento en diferentes horas de muestreo 3, 6, 12, 24, 48 y 96 h.

### **Variables Medidas**

#### **pH**

Se midió de manera directa con un potenciómetro digital de una precisión de  $\pm 0.1$  unidades.

#### **Conteo de Levaduras (CL)**

Para este análisis se tomó como base, la metodología descrita por (Díaz, 2006). Se realizó en las muestras de las h 12, 24, 48 y 96 únicamente, siguiendo las mismas condiciones que se describen en la primera parte de este trabajo.

#### **Conteo de Protozoarios (CP)**

Los protozoarios se contaron al microscopio óptico en cámara de Neubauer. Para ello los protozoarios se tiñeron con una solución de violeta de genciana al 0.01% en ácido acético glacial al 1% según método de Painting y Kirsop (1990).

#### **Nitrógeno Amoniacal (N-NH<sub>3</sub>)**

De las muestras líquidas obtenidas de la h 12, 24, 48 y 96 se determinaron por colorimetría según el procedimiento de (Broderick y Kang, 1980) siguiendo las mismas condiciones que se describen en la primera parte de este trabajo.

#### **Ácido Láctico (AcL)**

De las muestras líquidas obtenidas de las h 12, 24, 48 y 96 y fue determinado por colorimetría según el procedimiento de Taylor, (1996) siguiendo las mismas condiciones que se describen en la primer parte de este trabajo.

#### **Producción de Gas *In Vitro* (PG)**

El procedimiento de PG *in vitro* fue hecho de acuerdo a la técnica de Menke y Steingass (1988) con algunas modificaciones hechas por Muro, (2007) y con las mismas condiciones que se describen en la segunda parte de este trabajo.

#### **Concentración de Ácidos Grasos Volátiles (AGV's)**

La concentración de ácido acético, propiónico y butírico se determinó por cromatografía de gases. Los análisis se hicieron en un cromatógrafo SRI 8610, con una columna Alltech phase EC™ 1000, de 15 metros de largo, 0.53 mm de diámetro interno y un espesor de capa de 1.20 µm. Las muestras se inyectaron con una jeringa Hamilton de 10 µl. Cada muestra se inyectó (2 µl) dos veces; se utilizó nitrógeno como gas acarreador y un detector de iones con flama alimentada por una mezcla de hidrógeno y aire.

El programa de temperatura usado fue: inició 100°C, incrementó desde 100 hasta 130°C en dos minutos ( $\Delta 15^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ), incrementó desde 130 hasta

140°C en 1 minuto ( $\Delta 10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ), para terminar, la temperatura se incrementó desde 140 hasta 200°C en 2.4 minutos ( $\Delta 25^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ). La columna se calentó a 200°C por al menos 30 minutos antes de comenzar a realizar el análisis de las muestras diariamente. El estándar de ácidos grasos volátiles se preparó únicamente con ácido acético ( $3.46\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), ácido propiónico ( $3.97\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y ácido butírico ( $1.53\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) con las concentraciones recomendadas por Galyean (1997).

### **Análisis Estadístico**

Se realizó con un modelo mixto, en el cual, se utilizaron como efectos fijos el tiempo y el tratamiento. Como efecto aleatorio, se utilizó la repetición anidada dentro de cada tratamiento; los datos se evaluaron con el procedimiento (Proc Mixed) del programa SAS, (2004) para un diseño al azar de cuatro tratamientos en parcelas divididas en el tiempo.

### **Modelo Estadístico**

$$Y_{ijk} = \mu + C_i + R(C_{ij}) + T_k + C^*T_{ik} + e_{ijk}$$

Donde:

- $Y_{ijk}$ .- es la variable de respuesta
- $\mu$ .- es la media general
- $C_i$ .- es el efecto del i-ésimo nivel de tratamiento
- $R(C_{ij})$ .- es el efecto de la repetición del i-ésimo nivel de tratamiento
- $T_k$ .- es el efecto del j-ésimo tiempo de fermentación sobre la variable de respuesta
- $C^*T_{ik}$ .- es el efecto de la interacción del i-ésimo nivel de tratamiento por tiempo
- $e_{ijk}$ .- es el error experimental

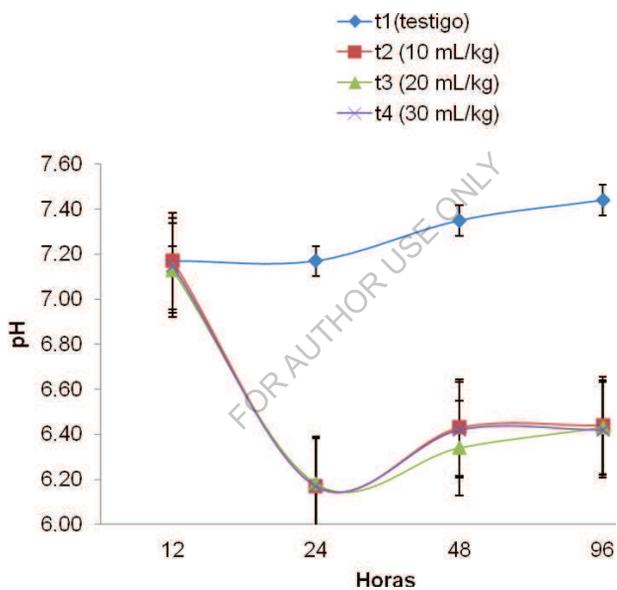
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### pH

Esta variable mostró efecto ( $P < 0.01$ ) por la interacción tratamiento por tiempo, los valores estimados, de la h12 a la h96 el pH en el t1, incrementó su valor de manera gradual en el tiempo de  $7.1 \pm 0.00$  a  $7.4 \pm 0.00$  en tanto que los tratamientos t2, t3 y t4 mostraron un descenso gradual a partir de la h12 a la h24, con un ligero incremento de la hora 48 a la 96, (Gráfica 16). El pH ruminal refuerza el balance entre la capacidad amortiguadora y la acidez de la fermentación ya que al disminuir el pH, se estrechan las relaciones acetato propionato, por consecuencia al incrementarse el pH se amplían las relaciones acetato propionato (Hobson, 1972).

En el presente estudio el pH fue más alto de lo normal, arriba de 7 ya que la alfalfa tiene propiedades amortiguadoras y además se incluyó bicarbonato de sodio en la dieta, lo que también hace que suba el pH del rumen.

La composición de la dieta y las prácticas de alimentación influyen sobre el pH ruminal, ya que a medida que se incrementa la proporción de ingredientes de fermentación rápida disminuye el pH y viceversa (Kaufmann, 1976). Aún cuando no puede definirse un pH óptimo en el medio ruminal, los microorganismos presentan cierto intervalo en el cual se reproducen mejor y su metabolismo es más eficiente, los protozoarios manifiestan su principal desarrollo a pH cercano a 6.5 y son severamente afectados con pH superiores a 8 e inferiores a 5.5, siendo este último uno de los factores que más afectan su población (Hino *et al.*, 1973).



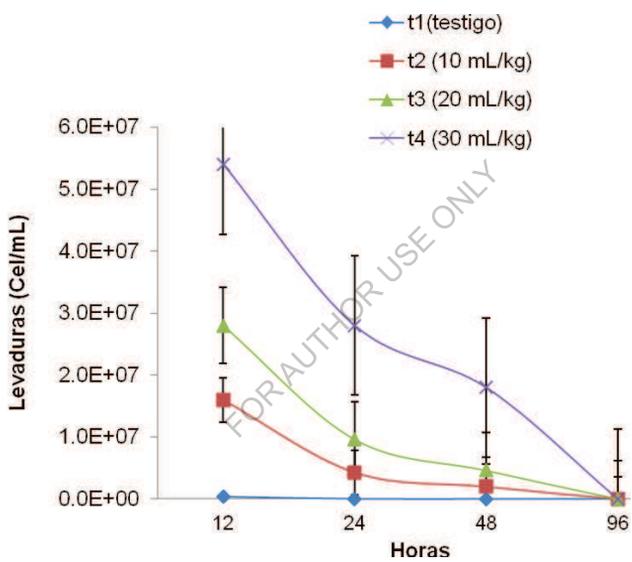
Gráfica 16. Comportamiento del pH en los diferentes tratamientos durante la producción de gas.

### Conteo de Levaduras (CL)

Se encontró efecto ( $P < 0.01$ ) por la interacción tratamiento por tiempo en la cantidad de levaduras, con un comportamiento de reducción en los distintos tratamientos en función al tiempo. La concentración más alta de levaduras que se encontró en la PG se observó como era de esperar en el t4, con un valor de  $5.4 \times 10^7 \pm 0.00$  a la h12 y de  $1.8 \times 10^7 \pm 0.01$  cel/mL a h48 (Gráfica17).

Las levaduras de los diferentes tratamientos disminuyeron a medida que transcurrió el tiempo de fermentación lo cual coincide con resultados similares obtenidos por (Ingledeew y Jones, 1982; Arambel y Rung-Syin, 1987; Castillo, 2009), cuando estudiaron el crecimiento de la *S. cerevisiae* en ambiente ruminal. Las levaduras mantienen su actividad metabólica y resisten el estrés físico asociado con el secado, calentamiento y exposición al pH ácido en condiciones anaeróbicas. No obstante, se ha demostrado que *S. cerevisiae* presenta crecimiento limitado bajo esas condiciones (Andreasen y Stier 1953) y es incapaz de mantener una población productiva dentro del ecosistema ruminal (Dawson y Newman 1987; Arambel y Rung-Syin 1987), en donde mencionan que no pueden mantener una población viable en el rumen y son incapaces de establecerse permanentemente (Williams *et al.* 1990); por tal motivo, no es común que desarrolle crecimiento a nivel ruminal, en forma adicional a lo anterior el crecimiento de las levaduras se ve afectado por la presencia de ácidos grasos insaturados, tales como el colesterol y el ácido nicotínico.

En este estudio la mayor cantidad de células viables adicionadas por tratamiento permitió una permanencia mayor en el ambiente ruminal, pues las



Gráfica 17. Producción de levaduras en los diferentes tratamientos durante la producción de gas.

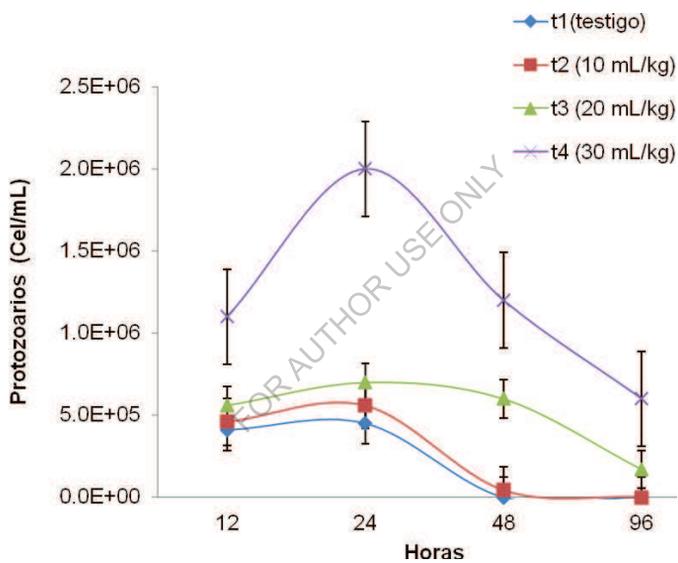
levaduras ayudaron a mantener el medio anaerobio y fueron capaces de permanecer por más de 48 horas viables, en particular las del t4.

### **Conteo de Protozoarios (CP)**

Se encontró efecto ( $P < 0.01$ ) por la interacción tratamiento por tiempo en la cantidad de protozoarios destacando el t4 con una producción de  $2.0 \times 10^7 \pm 0.00$  cel/mL, (Gráfica 18). El incremento probablemente se debió a que hubo un pH favorable y un suministro de  $N-NH_3$  y del AcL adecuados para su crecimiento y multiplicación.

La degradación de los protozoos generalmente está asociada con una disminución en la proporción de butirato e incremento de propionato o acetato (Jouany, 1994). Los tiempos de multiplicación varían de 5 a 14 h para los protozoarios como lo mencionan Williams y Coleman (1988) y de 24 a 30 h para los hongos (Bauchop, 1981; Joblín, 1981). Es posible que la eficiencia del crecimiento bacteriano este directamente relacionada con la tasa de dilución de las bacterias y/o del contenido ruminal, debido a que las bacterias en el rumen están asociadas a los sólidos alimenticios, al líquido y la pared ruminal; por lo tanto, la tasa de crecimiento bacteriano puede estar en relación a la tasa de dilución del líquido, lo cual se explica porque solamente en cultivos continuos *in vitro* de estado estable, la tasa de crecimiento específico de los microorganismos es igual a la tasa de dilución del cultivo (Bergen, 1979).

Se ha reportado también, que la adición de levadura *S. cerevisiae* incrementa la concentración de bacterias gram- en el contenido ruminal ( $1.6 \times 10^4$  vs  $2.0 \times 10^5$  UFC/mL, unidades formadoras de colonias) y también incrementa el contenido de bacterias gram- en las heces ( $1.1 \times 10^4$  vs  $2.6 \times 10^5$



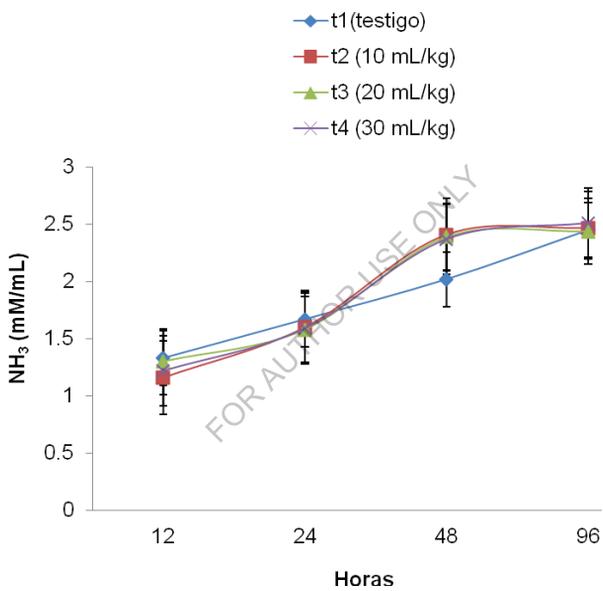
Gráfica 18. Producción de protozoarios en los diferentes tratamientos durante la producción de gas.

UFC/mL), mencionando además, que la levadura estimula el crecimiento de bacterias amilolíticas a nivel ruminal Wiedmeier *et al.*, (1987), Harrison *et al.*, (1988), Dawson *et al.*, (1990), Gedek *et al.*,(1993) estos resultados que fueron confirmados por Kumar *et al.*, (1994), quienes indican que la levadura incrementa el número de bacterias totales, bacterias viables totales, celulolíticas, amilolíticas y protozoarios; sin embargo; se han encontrado resultados contradictorios por Chiquette (1995), Sohn y Song (1996).

### **Nitrógeno Amoniacal (N-NH<sub>3</sub>)**

Se encontró efecto ( $P < 0.01$ ) por interacción tratamiento por tiempo en el N-NH<sub>3</sub>, este incremento fue para todos los tratamientos de la h12 a la h96 con valores de  $1.3 \pm 0.03$  a  $2.4 \pm 0.03$  mM/mL en t1;  $1.1 \pm 0.08$  a  $2.4 \pm 0.03$  mM/mL en t2;  $1.3 \pm 0.05$  a  $2.4 \pm 0.05$  mM/mL en t3 y  $1.2 \pm 0.05$  a  $2.5 \pm 0.06$  mM/mL en t4; (Gráfica 19).

Este efecto es dado por la urea añadida a los sustratos en los procesos de fermentación, ya que es transformada a NH<sub>3</sub> por efecto de especies microbianas ureolíticas así lo han reportado diversos autores en diferentes trabajos en la producción de manjarina y sacharina mostrando efectos similares a este (Valiño *et al.*, 2002; Calderón *et al.*, 2005 y Rodríguez, 2009), si el sustrato tiene un aporte energético bajo, los microorganismos no pueden incorporarlo en la formación de aminoácidos para su crecimiento o lo hacen en una proporción baja. Cuando se tiene un pH bajo el NH<sub>3</sub> producido es retenido en el sustrato, Díaz-Plascencia *et al.*, (2010).



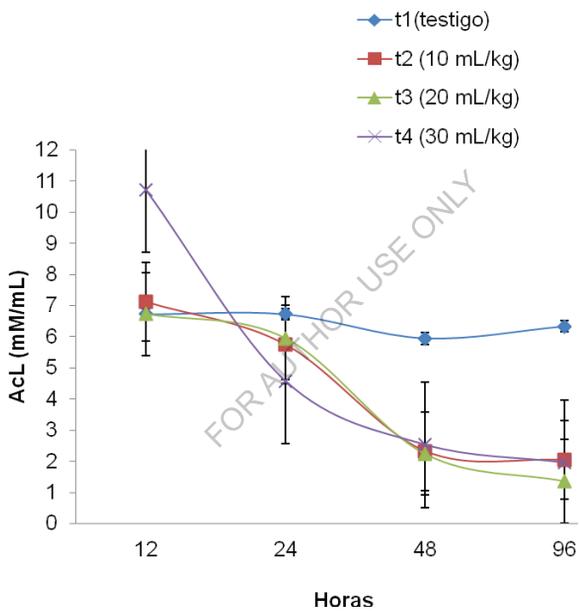
Gráfica 19. Acumulación de nitrógeno amoniacal en los diferentes tratamientos durante la producción de gas.

La digestión de las proteínas también está relacionada con su solubilidad dentro del rumen, cuando la solubilidad es menor, disminuye la liberación de amoníaco; por lo tanto, la síntesis de proteína microbiana se ve limitada por la deficiencia de este compuesto (Pérez Gavilán, *et al.*, 1976). Distintas fuentes de nitrógeno contribuyen a la producción de amoníaco ruminal: el nitrógeno no protéico (NNP) de la dieta, nitrógeno salival y posiblemente pequeñas cantidades de urea que penetran al rumen a través de sus paredes, todas éstas son convertidas casi totalmente en amoníaco; dependiendo del tipo de dieta suministrada a los rumiantes, los microorganismos ruminales convierten en amoníaco del 60-90% de nitrógeno diario consumido y del 50-70% del nitrógeno bacteriano puede ser derivado del amonio de la dieta. La concentración óptima de nitrógeno amoniacal ( $N-NH_3$ ) en rumen, es aquella que resulta en la máxima tasa de fermentación o la máxima tasa de producción de proteína microbiana por unidad de sustrato fermentado (Mehrez *et al.*, 1977).

### **Ácido Láctico (AcL)**

Se encontró efecto ( $P < 0.01$ ) por interacción de tratamiento por tiempo en los tratamientos t2, t3 y t4 mostrando efecto en la reducción del AcL, de la h12 a la h96 con valores de  $7.1 \pm 0.19$  a  $2.0 \pm 0.19$  (mM/mL) en t2,  $6.7 \pm 0.19$  a  $1.3 \pm 0.17$  mM/mL en t3 y de  $10.7 \pm 0.29$  a  $1.9 \pm 0.16$  mM/mL con un efecto más marcado en el t4 siendo este el que mejor reducción presenta de AcL, (Gráfica 20).

El aumento en la concentración de AcL en el t4 se debe fundamentalmente, al establecimiento de las bacterias lactogénicas Dawson *et al.*, (1990) y Kumar *et al.*, (1994), quienes indican que la levadura incrementa el



Gráfica 20. Concentración de ácido láctico en los diferentes tratamientos durante la producción de gas.

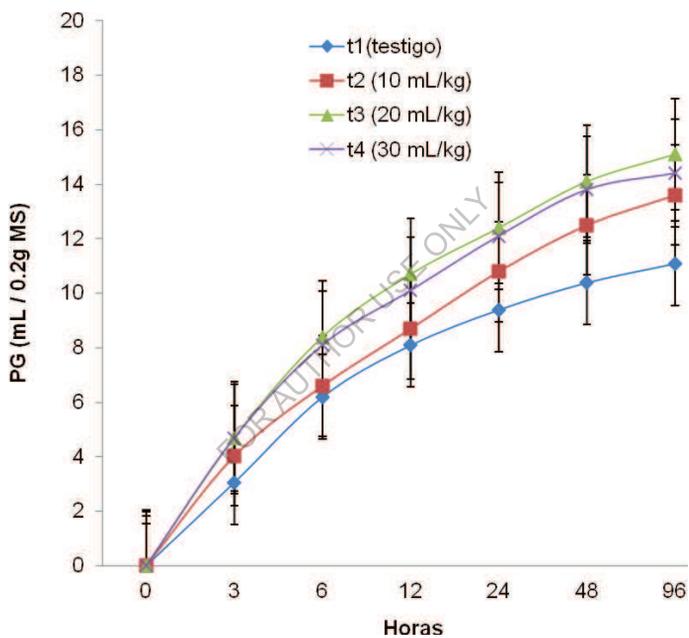
número de bacterias totales, bacterias viables totales, celulolíticas, amilolíticas y protozoarios. El incremento de A<sub>CL</sub> en algunas fermentaciones inhibe el crecimiento microbiano e induce a la muerte celular de la levadura o de los microorganismos presentes, así lo manifiestan varios estudios (Elías y Lezcano, 1993; Madrid *et al.*, 1999; Ludovico *et al.*, 2001).

### **Producción de Gas *In Vitro* (PG)**

Se encontró ( $P < 0.01$ ) por interacción de tratamiento por tiempo en todos los tratamientos. El incremento máximo de PG se presentó en los t<sub>3</sub> y t<sub>4</sub> a partir de las 3 h a las 6 h con valores de  $4.7 \pm 0.05$  en t<sub>3</sub> y  $4.7 \pm 0.05$  en t<sub>4</sub> posteriormente fue reduciéndose de manera gradual, (Gráfica 21 y Cuadro 9).

La velocidad y grado de fermentación de los carbohidratos en el rumen varía según el tipo y estructura de los mismos (Ivan *et al.*, 2005) y según la población microbiana predominante (Dehority, 2003). El incremento en la producción de gas que se obtuvo con estas cepas que podría ser el resultado del incremento de la producción de ácido propiónico debido a que el dióxido de carbono es producido cuando el ácido propiónico es formado por alguna bacteria ruminal por la ruta metabólica succinato propionato (Wolin y Miller, 1988). Tang *et al.*, (2008) también encontraron un efecto positivo en la adición de un cultivo de levaduras en la producción de gas de pajas de diferentes cereales.

El patrón de fermentación en los rumiantes se lleva a cabo en el ambiente ruminal que está influenciado por la interacción entre la dieta, la población microbiana y el propio animal (Allen y Mertens 1988). Dos aspectos



Gráfica 21. Producción de gas acumulada entre tratamientos durante la fermentación ruminal.

Cuadro 9. Medias ( $\pm$  EE) del comportamiento fermentativo entre tratamientos (t) durante la fermentación *in vitro*

Variable	t	Horas			
		12	24	48	96
pH	1	7.1 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	7.1 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	7.3 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	7.4 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>
	2	7.1 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	6.1 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	6.4 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	6.4 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>
	3	7.1 $\pm$ 0.00 <sup>c</sup>	6.1 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	6.3 $\pm$ 0.00 <sup>c</sup>	6.4 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>
	4	7.1 $\pm$ 0.00 <sup>d</sup>	6.1 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	6.4 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	6.4 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>
Levaduras (Cel/mL)	1	4.3 $\times 10^5 \pm 0.01^d$	1.5 $\times 10^4 \pm 0.05^d$	0.0 $\pm 0.00^d$	0.0 $\pm 0.00$
	2	1.6 $\times 10^7 \pm 0.02^c$	4.3 $\times 10^6 \pm 0.02^c$	2.0 $\times 10^6 \pm 0.05^c$	0.0 $\pm 0.00$
	3	2.8 $\times 10^7 \pm 0.00^b$	9.6 $\times 10^6 \pm 0.00^b$	4.6 $\times 10^6 \pm 0.01^b$	0.0 $\pm 0.00$
	4	5.4 $\times 10^7 \pm 0.00^a$	2.8 $\times 10^7 \pm 0.01^a$	1.8 $\times 10^7 \pm 0.01^a$	0.0 $\pm 0.00$
Protozoos (Cel/mL)	1	4.1 $\times 10^5 \pm 0.00^d$	4.5 $\times 10^5 \pm 0.03^d$	0.0 $\pm 0.00^d$	0.0 $\pm 0.00^c$
	2	4.6 $\times 10^5 \pm 0.00^c$	5.6 $\times 10^5 \pm 0.00^c$	4.3 $\times 10^4 \pm 0.02^c$	0.0 $\pm 0.00^c$
	3	5.6 $\times 10^5 \pm 0.00^b$	7.0 $\times 10^5 \pm 0.00^b$	6.0 $\times 10^5 \pm 0.01^b$	1.7 $\times 10^5 \pm 0.02^b$
	4	1.1 $\times 10^6 \pm 0.02^a$	2.0 $\times 10^6 \pm 0.00^a$	1.2 $\times 10^6 \pm 0.03^a$	6.0 $\times 10^5 \pm 0.00^a$
NH <sub>3</sub> (mM/mL)	1	1.3 $\pm 0.03^a$	1.6 $\pm 0.08^a$	2.0 $\pm 0.05^d$	2.4 $\pm 0.03^c$
	2	1.1 $\pm 0.08^d$	1.6 $\pm 0.03^b$	2.4 $\pm 0.03^a$	2.4 $\pm 0.03^b$
	3	1.3 $\pm 0.05^b$	1.5 $\pm 0.08^c$	2.3 $\pm 0.05^b$	2.4 $\pm 0.05^c$
	4	1.2 $\pm 0.05^c$	1.5 $\pm 0.05^c$	2.3 $\pm 0.05^c$	2.5 $\pm 0.06^a$
AcL (mM/mL)	1	6.7 $\pm 0.10^c$	6.7 $\pm 0.10^a$	5.9 $\pm 0.09^a$	6.3 $\pm 0.16^a$
	2	7.1 $\pm 0.19^b$	5.7 $\pm 0.17^c$	2.3 $\pm 0.09^c$	2.0 $\pm 0.19^b$
	3	6.7 $\pm 0.19^c$	5.9 $\pm 0.19^b$	2.2 $\pm 0.16^d$	1.3 $\pm 0.17^d$
	4	10.7 $\pm 0.29^a$	4.5 $\pm 0.17^d$	2.5 $\pm 0.00^b$	1.9 $\pm 0.16^c$

<sup>a, b, c, d</sup> Literales distintas como superíndice indican diferencia ( $P < 0.01$ ) entre tratamientos

importantes en el rumen para la fermentación, son las condiciones para una eficiente actividad celulolítica y las necesidades para una síntesis óptima de proteína microbial. Sin embargo, la importancia relativa de estos procesos varía de acuerdo con las características del alimento (Cuadro 10).

### **Concentración de (AGV'S)**

Se encontró efecto ( $P<0.01$ ) por interacción de tratamiento por tiempo en todos los tratamientos durante la producción de gas *in vitro*, la concentración de ácido acético en el t2, fue mayor de la h12 a la 24 que el t1 con valores de  $24.9\pm 0.02$  a  $39.0\pm 0.01$  mM/mL en el t2 y de  $10.9\pm 0.03$  a  $29.0\pm 0.02$  mM/mL el t1. El t3 tuvo una producción mínima de ácido acético de la h12 a la h48 con valores de  $17.3\pm 0.04$  a  $19.8\pm 0.22$  para después incrementar su concentración a  $52.2\pm 0.05$  en la h96. El t4 mostró una reducción en la concentración de ácido acético de la h12 a la h96 con medias de  $33.2\pm 0.02$  a  $21.8\pm 0.16$  mM/mL (Gráfica 22).

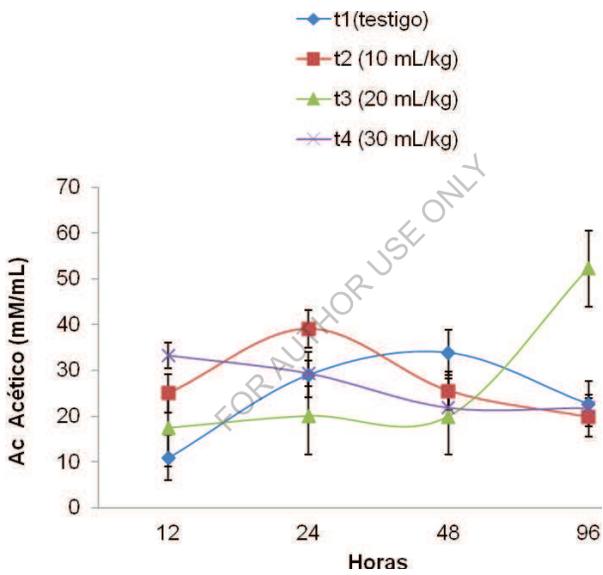
La concentración de ácido propiónico mostró efecto ( $P<0.01$ ) por interacción de tratamiento por tiempo. El ácido propiónico reporto una concentración mayor en el t2 a la h24 de  $11.7\pm 0.01$  en comparación con el t1 con  $10.6\pm 0.07$ . El t3 fue incrementado su concentración de la h12 a la h96 con medias de  $5.5\pm 0.04$  a  $16.5\pm 0.04$ . El t4 mostró un ligero incrementó en la concentración de ácido propiónico de la h12 a la h96 con valores de  $10.3\pm 0.02$  a  $10.5\pm 0.01$  (Gráfica 23).

En la concentración de ácido butírico se encontró efecto ( $P<0.01$ ) por interacción de tratamiento por tiempo. La mayor concentración de ácido butírico se encontró en el t2 a la h24 con valor de  $4.7\pm 0.13$  mM/mL (Gráfica 24).

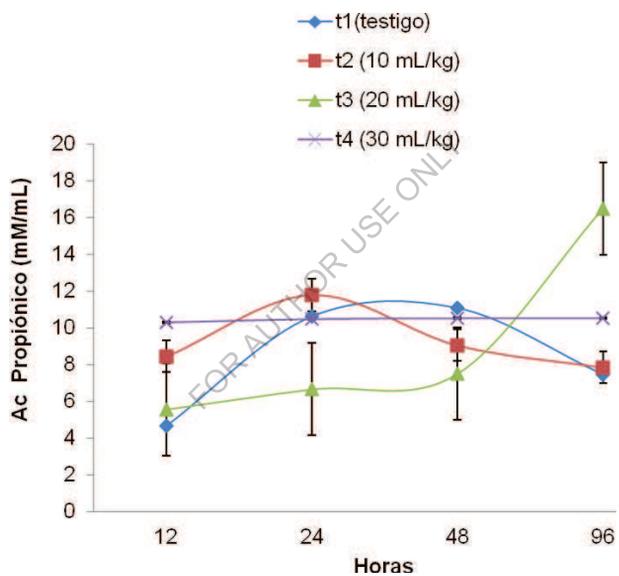
Cuadro 10. Medias ( $\pm$  EE) del comportamiento en la producción de gas entre tratamientos (t) durante la fermentación ruminal *in vitro* (PG en mL/0.2g MS)

t	Horas					
	3	6	12	24	48	96
1	3.0 $\pm$ 0.06 <sup>c</sup>	2.0 $\pm$ 0.03 <sup>d</sup>	1.8 $\pm$ 0.00 <sup>d</sup>	1.2 $\pm$ 0.03 <sup>d</sup>	1.0 $\pm$ 0.03 <sup>d</sup>	0.7 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>
2	4.0 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	2.5 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>	2.0 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	2.0 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	1.7 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	1.1 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>
3	4.7 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	3.7 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	2.2 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	1.7 $\pm$ 0.00 <sup>c</sup>	1.6 $\pm$ 0.06 <sup>c</sup>	1.0 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>
4	4.7 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	3.3 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	1.9 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>	2.0 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	1.7 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	0.6 $\pm$ 0.10 <sup>d</sup>

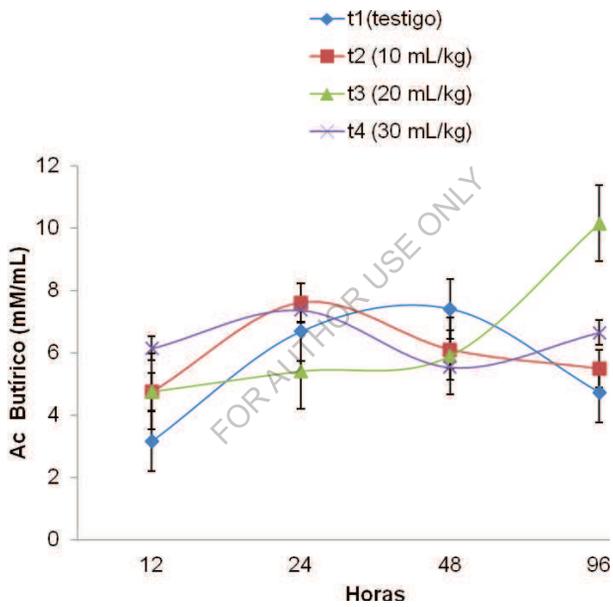
a, b, c, d Literales distintas como superíndice indican diferencia ( $P < 0.01$ ) entre tratamientos



Gráfica 22. Comportamiento en la concentración de ácido acético en los diferentes tratamientos.



Gráfica 23. Comportamiento en la concentración de ácido propiónico en los diferentes tratamientos.



Gráfica 24. Comportamiento en la concentración de ácido butírico en los diferentes tratamientos.

El t3 incrementó su concentración de ácido butírico de la h12 a la 96 con valores de  $4.7\pm 0.04$  a  $10.1\pm 0.04$  mM/mL siendo este el que mayor concentración obtuvo durante la fermentación ruminal. El t4 incrementó su concentración de ácido butírico de la h12 a la h24 con valores de  $6.1\pm 0.01$  a  $7.3\pm 0.04$  mM/mL.

Los AGV's son un producto de desecho de algunos microorganismos en condiciones anaerobias (Van Soest, 1982); en la FES de mezclas de caña de azúcar y boniato, puede haber producción de ácido acético y sus niveles pueden ser fluctuantes durante el proceso; también puede haber presencia de ácido propiónico en concentraciones muy bajas, este último puede desaparecer después de 48 h de FES (Rodríguez *et al.*, 2001); en este trabajo, sucedió algo similar, hubo presencia de ácido acético y ácido propiónico; la concentración de ácido acético fue mayor en el t2 a las 24h a las 96h la concentración de ácido propiónico fue mayor en el t2 en la h24 a las 96h la presencia de estos ácidos, indica que en ciertos momentos de la producción de gas hubo condiciones de anaerobiosis, encontrando además, ácido butírico.

El comportamiento que siguió el ácido acético y los incrementos de ácido propiónico y butírico en los diferentes tratamientos coinciden con la disminución de AcL en este trabajo. Van Soest (1982), describe que, en ciertas reacciones químicas, que se presentan en los procesos metabólicos, se pueden producir ácido propiónico y ácido butírico a partir del AcL.

La posible disminución de ácido propiónico y ácido butírico después de 48h de fermentación *in vitro* pudo deberse a que también se utilizaron como fuentes de energía (Van Soest, 1982). El incremento de ácido acético durante

la fermentación *in vitro* del t1 y t2, pudo ser resultado de diferentes procesos, como el de la metabolización de aminoácidos por bacterias clostrídicas o el de la metabolización de hexosas, pentosas y/o ácidos orgánicos por acción de bacterias heterolácticas, homolácticas, enterobacterias y/o levaduras (Ojeda *et al.*, 1987).

En este estudio la adición del inóculo de levaduras del t2 con 10mL/kg de MS favoreció la fermentación *in vitro* en las concentraciones de ácido acético, propiónico y butírico en las primeras 24h de fermentación (Cuadro 11).

FOR AUTHOR USE ONLY

Cuadro 11. Medias ( $\pm$  EE) del comportamiento en la producción de AGV's entre tratamientos (t) durante la fermentación *in vitro*

AGV's	t	Horas			
		12	24	48	96
Ac. Acético (mM/mL)	1	10.9 $\pm$ 0.03 <sup>d</sup>	29.0 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	33.8 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	22.6 $\pm$ 0.17 <sup>b</sup>
	2	24.9 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	39.0 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	25.5 $\pm$ 0.22 <sup>b</sup>	19.7 $\pm$ 0.05 <sup>d</sup>
	3	17.3 $\pm$ 0.04 <sup>c</sup>	19.9 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	19.8 $\pm$ 0.22 <sup>d</sup>	52.2 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>
	4	33.2 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	29.3 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	21.8 $\pm$ 0.23 <sup>c</sup>	21.8 $\pm$ 0.16 <sup>c</sup>
Ac. Propiónico (mM/mL)	1	4.6 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>	10.6 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>	11.0 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	7.4 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>
	2	8.4 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	11.7 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	9.0 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>	7.8 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>
	3	5.5 $\pm$ 0.04 <sup>c</sup>	6.6 $\pm$ 0.11 <sup>c</sup>	7.4 $\pm$ 0.04 <sup>d</sup>	16.5 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>
	4	10.3 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	10.4 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	10.5 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	10.5 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>
Ac. Butírico (mM/mL)	1	3.1 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	6.6 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	7.4 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	4.7 $\pm$ 0.05 <sup>d</sup>
	2	4.7 $\pm$ 0.13 <sup>b</sup>	7.6 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup>	6.1 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	5.4 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>
	3	4.7 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	5.4 $\pm$ 0.03 <sup>d</sup>	5.9 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>	10.1 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>
	4	6.1 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	7.3 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	5.5 $\pm$ 0.07 <sup>c</sup>	6.6 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>

a, b, c, d Literales distintas como superíndice indican diferencia ( $P < 0.01$ ) entre tratamientos

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La adición del inóculo de levaduras en los diferentes tratamientos mostró una participación en la reducción del ácido láctico y favoreció la producción de protozoarios, resistiendo por más tiempo a la degradación ruminal en el T2, T3 y T4.

La adición del inóculo a las dietas favoreció la producción de gas, el conteo de levaduras y el conteo de protozoos totales con una marcada reducción del ácido láctico.

La adición del inóculo de levaduras favoreció la fermentación *in vitro* en las concentraciones de ácido acético, propiónico y butírico en las primeras 24h de fermentación siendo el T2 con 10 mL/kg de MS es el nivel más óptimo recomendó en las dietas para vacas altas productoras al encontrar una mayor concentración de AGV's

## LITERATURA CITADA

- Álvarez, A. 1992. Compendio de temperaturas máximas extremas, mínimas extremas y precipitaciones pluviales. Boletín meteorológico. Estado de Chihuahua. Gobierno del Estado. Dirección de Desarrollo Rural. Servicio Meteorológico y Geográfico. Chihuahua, Chih. Méx.
- Allen, M. S. y Mertens, M. 1988. Evaluating constraints on fiber digestion by rumen microbes. J. Nutr. 118:261-270.
- Andreasen, A. y Stier, T. 1953. Anaerobic nutrition of *Saccharomyces cerevisiae*. Ergosterol requirement for growth in a defined medium. J. Cell. and Comp. Physiol. 41:23-27.
- Anderson, B., Mccracken, J., Aminov, I., Simpson, M., Mackie, I., Verstegen, A. y Gaskins, R. 1999. Gut microbiology and growth-promoting antibiotics in swine. Pig News Info. 20:115N-122N.
- Arambel, M.J., Rung-Syin, T. 1987. Evaluation of *Saccharomyces cerevisiae* growth in the rumen ecosystem. Páginas 17-19 Memorias. 19th Biennial conference on rumen function.
- Bauchop, T. 1981. The anaerobic fungi in rumen fiber digestion. Agric. Environ. 6:339-341.
- Bergen, W.G. 1979. Factors affecting growth yields of microorganisms in the rumen. Trop. Anim. Prod. 4:13-20.
- Broderick, G. A., y J. H. Kang. 1980. Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and in vitro media. J. Dairy Sci. 63:64-75.
- Calderón A., J. O., A. Elías I. y M. Valdivie N. 2005. Dinámica de la Fermentación en Estado Sólido de las camas de Cascarilla de Café en Inicio de Ponedoras Inoculadas con Vitafer. Rev. Elect. Vet. 5:1-7.
- Castillo C., Y. 2009. Fermentación *in vitro* para obtener la levadura candida norvegenesis en mezclas de alfalfa con bagazo de manzana fermentado y sus efectos sobre la actividad microbiana ruminal. Disertación Doctoral. Facultad de Zootecnia y Ecología. Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua. Méx.
- Castro M. Rodríguez F. 2005. Probióticos y prebióticos que mejoran la producción animal. Rev. Corpoica. 1: 1-27.

- Chiquette, J. 1995. *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* used alone or in combination, as a feed supplement for beef and dairy cattle. *Can. J. Anim. Sci.* 75:405-415.
- Cole, A., Purdy, W. y Hutcheson, P. 1992. Influence of yeast culture on feeder calves and lambs. *J. Anim. Sci.* 70:1682-1690.
- Galyean, M. L. 1997. *Laboratory Procedures in Animal Nutrition Research*. 12a Edición. Texas Tech University. Lubbock, Texas. Estados Unidos de América.
- Dawson, A., Newman, E. 1987. Fermentation in rumen stimulating continuous cultures receiving probiotic supplements. *J. Anim. Sci.* 66 (suppl.1):500. (Abstract)
- Dawson, K. A. 1989. Modification of rumen function and animal production using live microbial cultures as feed supplements. *Proceedings California Animal Nutrition Conference, centre Plaza, Holiday inn. Fresno. California.* pp 25-43.
- Dawson, K. A. Newman, K.E y Boling, J.A. 1990. Effects of microbial supplements containing yeast and lactobacilli on roughage-fed ruminal microbial activities. *J. Anim. Sci.* 68:3392-3398.
- Dehority, B.A. 2003. *Rumen Microbiology*. Nottingham University Press. p. 19-43.
- Díaz P., D. 2006. Producción de proteína microbiana a partir de manzana de desecho adicionada con urea y pasta de soya. Tesis de Maestría. Facultad de Zootecnia. Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua. Méx.
- Díaz-Plascencia D., C. Rodríguez. Muela, P. Mancillas-Flores, C. Angulo. F. Salvador, O. Ruiz, H. O. Rubio, S. Mena y A. Elías. 2010. Desarrollo de un inóculo con diferentes sustratos mediante fermentación sólida sumergida. *Rev. Elect. Vet.* 10:1-10.
- Elías, A. y Lezcano, O. 1993. Efecto de la fuente de N y algunos factores de crecimiento en la población de levaduras que se establecen en la producción de Saccharina. *Rev. Cub. Cienc. Agríc.* 28:319-322.
- 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.* 42:175-179.
- Glade, M. J. y L. M. Biesik. 1986. Enhanced N retention in yearling horses supplemented with yeast culture. *J. Anim. Sci.* 62: 1635-1640.

- Harrison, A., Hemken., W. Dawson., A. Harmon, J y Barker, 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.
- Hino, T., KametakaAnd M. Kandatsu, M. 1973. The cultivation of rumen oligotrich protozoa. I. Factors influencing the life of Entodinia. J. Gen. Microbiol.19:305-310.
- Hobson, P.N. 1972. Physiological characteristics of rumen microbes in relation to diet and fermentation patterns. Proc. Nutr. Soc. 31:135-139.
- Ingledeu, W.M. y Jones, G. A. 1982. The fate of live brewer's yeast slurry in bovine rumen fluid. J. Inst. Brew. 88: 18-20.
- Ivan, S. K., Grant, J., Weakley, D. y Beck, J. 2005. Comparison of a corn silage hybrid with high cell- wall content and digestibility with a hybrid of lower cell wal content on performance of Holstein cows. J. Dairy. Sci. 88: 244-254.
- Joblin, K.N. 1981. Isolation, enumeration and maintenance of rumen anaerobic fungi in roll tubes. Appl. Environ.Microbiol. 130:27-37.
- Jouany, J.P. 1994. Methods of manipulating the microbial metabolism in the rumen. Ann. Zootech. 43:49-62.
- Kaufmann, W. 1976. Influence of the composition of the ration and the feeding frequency on pH regulation in the rumen and feed in take in ruminants. Livest. Prod. Sci. 3:103-114.
- Kornegay, T., D. Rhein-Welker, M. D. Lindemann y C.M. Wood. 1995. Performance and nutrient digestibility in weanling pigs as influenced by yeast culture additions to starter diets containing dried whey or one of two fiber sources. J. Anim. Sci. 73: 1381-1389.
- Kumar, K., Sareen, K., Singh, S. 1994. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* yest culture supplements on ruminal metabolism in buffalo calves given a high concentrate diet. Brit Soc. Anim. Sci. 59:209-215.
- Ludovico, P., João, S. M., Silva, M. T., Leão, C. y Côte-Real. 2001. *Saccharomyces cerevisiae* commits to programmed Cell death process in response to acetic acid. Microbiol. Rev. 147:2409-2415.
- Madrid, J., A. Martínez-Teruel, F. Hernández y M. D. Megías. 1999. A comparative study on the determination of lactic acid in silage juice by colorimetric, high-performance liquid chromatography and enzymatic methods. J. Sci. Food. Agri. 79:1722-1726.

- Mehrez, A. Z., Orskov, E. R., Mcdonal, Y. 1977. Rates of rumen fermentation in relation to ammonia concentration. *Br. J. Nutr.* 38:437-443.
- Menke, K. H. and Steingass, H. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Anim. Resear. Develop.* 28:7-55.
- Muro, R., A 2007. Cinética de degradación ruminal de tres fuentes de forraje mediante la técnica de digestibilidad *in vitro* por producción de gas. *Disertación Doctoral. Facultad de Zootecnia. Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua. Méx.*
- NRC. 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle. National Academy Press. Seventh Revised Edition. Estados Unidos de América. pp. 283.*
- Ojeda, F., M. Esperance y L. Luis. 1987. *Ensilajes de Pastos Tropicales. Pastos y Forrajes.* 10:189-198.
- Painting, K. y Kirsop, B. 1990. A quick method for estimating the percentage of viable cells in a yeast population, using methylene blue staining. *Worl J. Microbiol Biotechnol.* 33: 109-116.
- Pérez, Gavilán., J. P., Viniestra, G. G., Roso, C. 1976. Evaluación bromatológica de suplementos proteicos para ganado bovino. Evaluación de la solubilidad de los compuestos nitrogenados. *Veterinaria. México.* 7:8-15.
- Rodríguez, R., H. E. 2009. Producción y evaluación de alimentos fermentados a partir de bagazo y desecho de manzana y su efecto sobre el desarrollo ruminal y parámetros sanguíneos. *Disertación Doctoral. Facultad de Zootecnia y Ecología Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua. Méx.*
- Rodríguez, Z., A. Elías, R. Bocourt y O. Núñez. 2001. Efectos de los niveles de nitrógeno ureico en la síntesis proteica durante la fermentación de mezclas de caña (*Saccharum officinarum*) y boniato (*Ipomea batata Lam.*). *Rev. Cub. Cienc. Agrí.* 35:29-36.
- SAS. 2004. *SAS/STAT® 9.1 User's Guide. SAS Institute Inc. Estados Unidos de Norteamérica.*
- Sohn, H. J., Song. M.K. 1996. Effect of feeding yeast diets on the ruminal fermentation characteristic and whole tract digestibility by sheep. *Korean J. Anim. Sci.* 38:578-588.
- Tang, X., Tayo, O., Tan, L. Sun, H., Shen, X., Zhou, S., Xiao, J., Ren, P., Han, F y Shen, B. 2008. Effects of yeast culture and fibrolytic enzyme

- supplementation on *in vitro* fermentation characteristics of low-quality cereal straws. J. Anim. Sci. 86: 1164-1172.
- Taylor, K. A. C. C. 1996. A simple colorimetric assay for muramic acid and lactic acid. Appl. Biochemist and Biotechnol. 56: 49-58.
- Valiño, E., A. Elias, V. Torres y N. Albelo. 2002. Study of the microbial contenton fresh sugar cane bagasse as substrate for animal feeding by solid state fermentation. Cub. J. Agri. Sci. 36:359-364.
- Van Soest, P. J. 1982. Nutritional Ecology of the Ruminant. Books, Inc. Estados Unidos de América.
- Villagran, O., Rodríguez-Muela, C., Burrola, E., González, E., Ortega, A. 2009. Identificación de levaduras involucradas en la fermentación en estado sólido de bagazo de manzana. Página 2 en Memorias de la XLV Reunión Nacional de Investigación Pecuaria. Saltillo, Coah, México.
- Wiedmeier, D., M. J. Arambel y J. L. Walters. 1987. Effect of yeast culture and *Aspergillus oryzae* fermentation extract on ruminal characteristics and nutrient digestibility. J. Dairy. Sci. 70: 2063-2068.
- Williams, V., Walter, A., Macrae, C. 1990. Rumen probiosis: the effects of addition of yeast culture (viable yeast *Saccharomyces cerevisiae* plus growth medium) on duodenal protein flow in wether sheep. Proc. Nutr. Soc. 49:128-129 (Abstr)
- Williams, A. G. Coleman, G. S. 1988. The rumen protozoa. Páginas en The Rumen Microbial Ecosystem P.N. Hobson eds. Elsevier. Applied. Sci. London and New York.
- Wollin, M. J. y Miller, T. L. 1988. Microbe-microbe interactions. Página 343 en Rumen Microbial Ecosystem. P.N. Hobson, eds. Elseivers. Science, Essex. U.K.

FOR AUTHOR USE ONLY

**More  
Books!**



yes  
**I want morebooks!**

Buy your books fast and straightforward online - at one of world's fastest growing online book stores! Environmentally sound due to Print-on-Demand technologies.

Buy your books online at  
**[www.morebooks.shop](http://www.morebooks.shop)**

¡Compre sus libros rápido y directo en internet, en una de las librerías en línea con mayor crecimiento en el mundo! Producción que protege el medio ambiente a través de las tecnologías de impresión bajo demanda.

Compre sus libros online en  
**[www.morebooks.shop](http://www.morebooks.shop)**

KS OmniScriptum Publishing  
Brivibas gatve 197  
LV-1039 Riga, Latvia  
Telefax: +371 686 20455

[info@omniscryptum.com](mailto:info@omniscryptum.com)  
[www.omniscryptum.com](http://www.omniscryptum.com)

OMNIScriptum



FOR AUTHOR USE ONLY

FOR AUTHOR USE ONLY

FOR AUTHOR USE ONLY