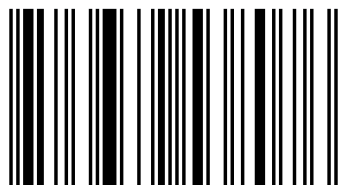


Innovación tecnológica de un aditivo de levaduras de manzana

Los probióticos y aditivos alimenticios de levaduras, compuestos fundamentalmente por *Saccharomyces cerevisiae*, han permitido mejorar la salud y la productividad de los animales al ser adicionados en la alimentación animal. La importancia de los cultivos vivos de levaduras es por la producción de enzimas, vitaminas del complejo B, minerales y diversos tipos de aminoácidos; como consecuencia estimulan la absorción de nutrientes mejorando el ambiente intestinal favoreciendo la respuesta del sistema inmune, por lo que producirán carne y leche libre de antibióticos. Por otra parte, los minerales traza tales como el Zinc, Cobre y Manganeso son elementos que juegan un papel importante en varias funciones corporales, necesarias para mantener la salud en los animales, ejerciendo su efecto sobre un correcto crecimiento, reproducción, rutas de secreción hormonal y respuesta inmune. Del mismo modo, los antioxidantes pueden formar parte de enzimas que protegen a las células contra los efectos adversos de numerosas drogas y sustancias carcinogénicas.

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.



978-3-639-53807-6

editorial académica **española**

Levaduras benéficas en nutrición animal



Daniel Díaz Plascencia (Ed.) · Pablo Mancillas F · Carlos Rodríguez M

Innovación tecnológica de un aditivo de levaduras de manzana

Levaduras para mejorar la producción y el bienestar animal de una manera libre de antibióticos

eae
editorial académica **española**

Daniel Díaz Plascencia (Ed.)

Pablo Mancillas F

Carlos Rodríguez M

Innovación tecnológica de un aditivo de levaduras de manzana

**Daniel Díaz Plascencia (Ed.)
Pablo Mancillas F
Carlos Rodríguez M**

Innovación tecnológica de un aditivo de levaduras de manzana

**Levaduras para mejorar la producción y el bienestar
animal de una manera libre de antibióticos**

Editorial Académica Española

Impressum / Aviso legal

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek: Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Alle in diesem Buch genannten Marken und Produktnamen unterliegen warenzeichen-, marken- oder patentrechtlichem Schutz bzw. sind Warenzeichen oder eingetragene Warenzeichen der jeweiligen Inhaber. Die Wiedergabe von Marken, Produktnamen, Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen u.s.w. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutzgesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Información bibliográfica de la Deutsche Nationalbibliothek: La Deutsche Nationalbibliothek clasifica esta publicación en la Deutsche Nationalbibliografie; los datos bibliográficos detallados están disponibles en internet en <http://dnb.d-nb.de>.

Todos los nombres de marcas y nombres de productos mencionados en este libro están sujetos a la protección de marca comercial, marca registrada o patentes y son marcas comerciales o marcas comerciales registradas de sus respectivos propietarios. La reproducción en esta obra de nombres de marcas, nombres de productos, nombres comunes, nombres comerciales, descripciones de productos, etc., incluso sin una indicación particular, de ninguna manera debe interpretarse como que estos nombres pueden ser considerados sin limitaciones en materia de marcas y legislación de protección de marcas y, por lo tanto, ser utilizados por cualquier persona.

Coverbild / Imagen de portada: www.ingimage.com

Verlag / Editorial:

Editorial Académica Española

ist ein Imprint der / es una marca de

OmniScriptum GmbH & Co. KG

Bahnhofstraße 28, 66111 Saarbrücken, Deutschland / Alemania

Email / Correo Electrónico: info@omniscryptum.com

Herstellung: siehe letzte Seite /

Publicado en: consulte la última página

ISBN: 978-3-639-53807-6

Copyright / Propiedad literaria & cop Pablo Mancillas F, Carlos Rodríguez M

Copyright / Propiedad literaria © 2017 OmniScriptum GmbH & Co. KG

Alle Rechte vorbehalten. / Todos los derechos reservados. Saarbrücken 2017

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue el desarrollo biotecnológico de un aditivo a base de levaduras autóctonas obtenido de la fermentación de subproductos de manzana para mejorar la alimentación y el bienestar animal. Los probióticos y aditivos alimenticios de levaduras, compuestos fundamentalmente por *Saccharomyces cerevisiae*, han permitido mejorar la salud y la productividad de los animales al ser adicionados en la alimentación animal. La importancia de los cultivos vivos de levaduras es por la producción de enzimas, vitaminas del complejo B, minerales y diversos tipos de aminoácidos; como consecuencia estimulan la absorción de nutrientes mejorando el ambiente intestinal favoreciendo la respuesta del sistema inmune, por lo que se producirá carne y leche libre de antibióticos. Por otra parte, los minerales traza tales como el Zinc, Cobre y Manganese son elementos que juegan un papel importante en varias funciones corporales, necesarias para mantener la salud en los animales, ejerciendo su efecto sobre un correcto crecimiento, reproducción, rutas de secreción hormonal y respuesta inmune. Del mismo modo, los antioxidantes pueden formar parte de enzimas que directa o indirectamente protegen a las células contra los efectos adversos de numerosas drogas y sustancias carcinogénicas. La adición de antioxidantes en la dieta de animales domésticos mejora la respuesta inmune y disminuye el estrés oxidativo, generando una mayor resistencia a enfermedades infecciosas y degenerativas. Este aditivo de levaduras está enfocado en mejorar el consumo de alimento de los animales favoreciendo el medio ambiente del rumen y el bienestar animal. Esta innovación está enfocada principalmente en la reducción del uso indiscriminado de antibióticos en la producción animal, formando parte de los probióticos, prebióticos y simbióticos que se perfilan como las opciones más destacadas respecto de la utilización de antibióticos en animales y como una solución promotora de la calidad y de la seguridad alimentaria, actuando de manera directa en el sistema inmunológico y en el bienestar del animal que lo consume, reduciendo de esta manera la frecuencia del uso de antibióticos a largo plazo.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	2
LISTA DE CUADROS.....	5
INTRODUCCIÓN.....	6
Fermentación de Manzana.....	8
Uso de Manzarina en la Alimentación Animal.....	8
Uso de Levaduras en la Nutrición Animal.....	9
Cultivos de Levadura en la Fermentación Ruminal.....	10
Probióticos en la Alimentación Animal.....	11
Mecanismos de Acción de las Levaduras en el Rumen.....	13
Función de la Pared Celular de Levaduras en el Sistema Inmune.....	13
Función de los Microminerales en el Sistema Inmune.....	14
Actividad Antioxidante.....	15
Biometría Hemática en Rumiantes.....	16
Experimento 1.....	18
MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	31
Experimento 2.....	32
MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	42
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	61

	Página
FICHA TÉCNICA.....	62
DESARROLLO DEL ADITIVO DE LEVADURAS.....	79
DISEÑO Y USO DEL FERMENTADOR.....	80
PREPARACIÓN DEL ADITIVO DE LEVADURAS DE MANZANA.....	82
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Medias ($\pm$ EE) del comportamiento fermentativo <i>in vitro</i> entre tratamientos de ocho cepas de levaduras.....	28
2	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).....	30
3	Composición del alimento concentrado por tratamiento.....	34
4	Temperatura ambiental promedio registrada durante el experimento.....	43
5	Medias ($\pm$ EE) del comportamiento productivo de becerros alimentados con tres dietas diferentes.....	44
6	Medias ($\pm$ EE) de la concentración de zinc ($\mu\text{mol/L}$) en suero sanguíneo de becerros alimentados con tres dietas diferentes.....	47
7	Medias ($\pm$ EE) de la concentración de manganeso ($\mu\text{mol/L}$) en suero sanguíneo de becerros alimentados con tres dietas diferentes.....	49
8	Medias ($\pm$ EE) de la concentración de cobre ($\mu\text{mol/L}$) en suero sanguíneo de becerros alimentados con tres dietas diferentes.....	51
9	Medias ($\pm$ EE) de la actividad antioxidante ($\mu\text{mol/L FeSO}_4$) ² en plasma sanguíneo de becerros alimentados con tres dietas diferentes.....	54
10	Medias ($\pm$ EE) ² de células blancas de biometría hemática de becerros alimentados con tres dietas diferentes.....	56
11	Medias ($\pm$ EE) ² de células rojas de biometría hemática de becerros alimentados con tres dietas diferentes.....	57

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, nace la necesidad de plantear nuevas alternativas para reducir el uso de antibióticos usados hoy en día en la ganadería que ponen 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 del alimento y ayudan a mantener el equilibrio microbial en el intestino de los animales, lo que disminuye el estrés derivado de los cambios en las dietas, la susceptibilidad al ataque de patógenos y el mal manejo de los animales (Kornegay *et al.*, 1995; Anderson *et al.*, 1999). Las enzimas, vitaminas y otros nutrientes o factores de crecimiento producidos por estos microorganismos favorecen la respuesta de producción en los animales que los consumen (Kornegay *et al.*, 1995; Castro y Rodríguez, 2005).

El desarrollo de productos mediante la fermentación sólida sumergida (FSS) ha generado mayor interés en los últimos años. Esto debido 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, los cuales se han empleado en una forma dinámica en las últimas décadas buscando mejorar la respuesta productiva de los animales a menor tiempo y costo de inversión. Está documentado que los aditivos de levaduras, compuestos fundamentalmente por *Saccharomyces cerevisiae* han mejorado la salud y la productividad de los animales que las consumen (Miller *et al.*, 2002; Lila *et al.*, 2004).

La búsqueda de alternativas para mejorar la calidad de alimentos y la productividad de los animales a menor costo y que no compitan con la alimentación humana y que además constituyan fuentes naturales y seguras para la salud del consumidor y la de los propios animales son algunas de las primicias

para los nutriólogos (Calsamiglia *et al.*, 2005). 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 mismos 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.

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

Por lo anterior, el objetivo de la investigación fue la evaluación de diferentes sustratos y cepas de levaduras autóctonas obtenidas de la fermentación de subproductos de manzana para la elaboración de un aditivo líquido para ser usado en la alimentación animal y el bienestar de los animales.

Fermentación de Manzana

Becerra (2006) y Díaz (2006) desarrollaron un proceso biotecnológico del cual obtuvieron un producto al que llamaron “manzarina” el cual usaron en la alimentación animal, que obtuvieron de la fermentación en estado sólido (FES) 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 FES (Díaz, 2006). El uso de la FES de subproductos de manzana constituye una alternativa para su aprovechamiento, evitando la contaminación ambiental provocada por la rápida descomposición de su material orgánico (Díaz-Plascencia *et al.*, 2010b).

Uso de 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). Es un suplemento proteico que se ha obtenido a mediana escala en condiciones rusticas para ofrecerse en la dieta de rumiantes. Se reportó que puede sustituir parte de la cantidad de los ingredientes en dieta de vacas lecheras, con incremento en la producción láctea (Gutiérrez, 2007) y beneficios en la salud del animal (Gallegos, 2007). Se ha evaluado como ingrediente en la dieta para la alimentación de borregos en engorda (Hernández, 2008) y como parte del suplemento en alimentación de bovinos productores 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 en la dieta completa puede tener ganancias diarias de peso de 0.570 kg d⁻¹; la dieta se basó en el uso de forraje verde picado y rastrojo de maíz,

utilizando el bloque multinutricional como concentrado proteico. El consumo de bloque fue de 1.52 kg a⁻¹ d⁻¹, el costo de la materia prima para la elaboración de los bloques fue menor al utilizar la manzanarina comparado con el costo de la materia prima que se requiere para elaborar bloques multinutricionales con harinolina como principal fuente de proteína. Becerra *et al.*, (2008); Villagrán *et al.*, (2009); Díaz-Plascencia *et al.*, (2010b), coincidieron que durante la FES del bagazo de manzana (BM), el producto obtenido es enriquecido nutricionalmente por el incremento de la cantidad de levaduras con que se inoculó o por el desarrollo poblacional de aquellas que se encuentran presentes de manera natural en el BM; por lo cual se puede asumir que además de ser un alimento rico en proteína verdadera (PV), aporte alta cantidad de levaduras en el alimento a ofrecer a los animales.

Una célula de levadura puede llegar a pesar 7.922x10⁻¹¹g (Haddad y Lindegren, 1953), lo que puede representar una fracción importante de la materia seca (MS) de la manzanarina, considerando que se han obtenido conteos de hasta 4.5x10⁸ UFC/mL (Rodríguez *et al.*, 2006b) en base seca, esa cantidad puede ser hasta 10 veces mayor.

Uso de Levaduras en la Nutrición Animal

Las levaduras agregadas en la dieta de rumiantes 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 el pH en el rumen (Moya *et al.*, 2008); incluso 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 las 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, 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 la producción y el porcentaje de grasa en la leche (Putnam *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2001), y 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 debido a que las 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 de la cerda (Kim *et al.*, 2008).

Cultivos de Levadura en la Fermentación Ruminal

La inclusión de *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) en la dieta resulta en un aumento en el número total de bacterias celulolíticas (*Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus*), tanto *in vitro* como *in vivo* (Lila *et al.*, 2004). Chaucheyras *et al.*, (1995) observaron la estimulación del crecimiento del hongo *Neocallimastix frontalis*. Estos mismos autores reportaron que Sc parece estimular la utilización de lactato por *Megasphaera elsdenii* y *Staphylococcus ruminantium* propiciando un aumento en la síntesis de propionato (Lila *et al.*, 2004). Así mismo, estos últimos reportaron que la disminución del nivel de ácido láctico resulta en un incremento del pH ruminal favoreciendo el crecimiento de las bacterias celulolíticas, provocando un incremento en la digestión de la fibra y en la producción de ácidos grasos volátiles (AGV). Por otra parte, el efecto de Sc sobre la concentración de nitrógeno amoniacal ($N-NH_3$) es muy variable, y se ha observado tanto una reducción como un incremento (Chaucheyras-Durand y Fonty, 2001).

Calsamiglia *et al.*, (2005) reportaron evidencia del efecto de las levaduras sobre la fermentación ruminal, mencionando que las levaduras y sus medios de cultivos pueden contener nutrientes (ácidos orgánicos, vitaminas del grupo B, enzimas, aminoácidos, etc.) que estimulan el crecimiento de las bacterias que digieren la celulosa y utilizan el ácido láctico. Estos mismos autores publicaron que las levaduras vivas mediante su acción de respiración, consumen el oxígeno residual disponible en el medio ruminal, protegiendo a las bacterias anaeróbicas estrictas. Newbold *et al.*, (1996) compararon varias cepas de Sc y observaron una fuerte correlación entre la capacidad de las levaduras de consumir oxígeno y el crecimiento bacteriano, lo que les permitió concluir que el efecto de estimulación de Sc sobre las bacterias ruminales podría atribuirse, al menos parcialmente a su actividad respiratoria.

Yoon y Stern (1996) reportaron un mecanismo de acción para levaduras y hongos mediante el cual el aumento del pH ruminal y la reducción de la disponibilidad de oxígeno estimulan el incremento en número de las bacterias celulolíticas y por ende, se mejora la degradabilidad de la fibra, disminuye el llenado ruminal, aumenta la ingestión de materia seca e incrementa la producción, sin que mejore necesariamente la eficacia de utilización de nutrientes. Chung *et al.*, (2011) publicaron que la levadura también tiene un potencial de incrementar el proceso de fermentación en el rumen de manera que disminuya la formación de gas metano (CH₄). Por otra parte, propusieron que a través de una selección de cepas, puede ser posible desarrollar un producto de levadura comercial que disminuya la producción de CH₄ mientras minimiza la acidosis ruminal y promueva la digestión y fermentación de la fibra (Newbold y Rode, 2006).

Probióticos en la Alimentación Animal

La dieta juega un rol importante en la salud animal y humana. En años anteriores, se ha dedicado especial atención a la producción de alimentos funcionales, teniendo como objetivo adicionar microorganismos o compuestos benéficos dentro del organismo a través del consumo diario de la dieta (Di Criscio *et al.*, 2010).

Los probióticos han mostrado resultados prometedores en varias áreas de producción animal. Un probiótico se define como un cultivo o cultivo mixto de microorganismos vivos que benefician al hombre o animales mejorando las propiedades de la microflora autóctona del intestino (Champagne *et al.*, 2005). Así mismo, se ha mencionado que los probióticos son microorganismos viables y benéficos para el huésped cuando son consumidos en cantidades apropiadas, lo que se traduce en una mejor producción y salud (Rook y Burnet, 2005). Los beneficios incluyen la inhibición de bacterias patógenas, reducción de niveles de colesterol en suero, diarrea y cáncer intestinal; mejoran la tolerancia a la lactosa, absorción de calcio, síntesis de vitaminas y estimulan el sistema inmune (Sánchez *et al.*, 2009). Bontempo *et al.*, (2006) sugirieron posibles mecanismos que exhiben el papel benéfico en el animal, indicando la colonización y adhesión en la mucosa intestinal (competencia por receptores), competencia por nutrientes, producción de sustancias antimicrobiales y la estimulación de la mucosa y sistema inmune.

Las levaduras como probióticos están ganando popularidad en los sistemas de engorda, ya que son resistentes y con una alta viabilidad en condiciones ambientales adversas. Comitini *et al.*, (2005) reportaron que las levaduras ejercen actividad inhibitoria sobre diferentes cepas de bacterias patógenas, desarrollando una actividad bactericida o bacteriostática debido a ciertos compuestos metabólicos producidos por las mismas. Stephens *et al.*, (2007) mencionaron que corderos alimentados con probióticos disminuyeron la excreción de *Escherichia coli* O157:H7, los mismos autores publicaron que la suplementación microbiana directa en el alimento también redujo la cantidad de *Salmonella* *ssp.* en bovinos productores de carne. La utilización de varias especies de probióticos favorecen el incremento de la ganancia diaria de peso (GDP) y eficiencia alimenticia de corderos y bovinos en engorda durante el periodo inicial de la alimentación (Lema *et al.*, 2001).

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 propuesto 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 propuesto 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).

Función de la Pared Celular de Levaduras en el Sistema Inmune

La pared celular de las levaduras contiene mananoligosacáridos (MOS) que pueden actuar como receptores de alta afinidad compitiendo con los sitios de unión con las bacterias gram negativas, las cuales poseen fimbrias específicas de manosa tipo 1 (Ofek *et al.*, 1977), eliminando patógenos del sistema digestivo y evitando la colonización y fijación del patógeno a la mucosa (Nocek *et al.*, 2011). Ferket, (2003) mencionó que este beneficio puede provocar una respuesta antigénica importante, mejorando así la inmunidad humoral contra patógenos específicos a través de la presencia de antígenos a las células inmune atenuada, además, este proceso puede deprimir la respuesta inmune proinflamatoria, la cual es perjudicial para el comportamiento productivo. Otro componente predominante de la pared celular de levaduras, es el β -1,3/1,6-glucano (β -glucano), el cual ha mostrado tener efecto inmunomodulatorio cuando las levaduras se usaron como suplementos en dietas para aves (Chae *et al.*, 2006), cerdos (Li *et al.*, 2006) y animales acuáticos (Dalmo y Bogwald, 2008).

Pocos estudios han investigado el uso de los componentes de la pared celular de levaduras sobre la función inmune en ganado lechero (Nocek *et al.*, 2011). Sin embargo, Franklin *et al.*, (2005) observaron que la suplementación de vacas secas con MOS mejoraron la respuesta inmune humoral contra rotavirus e incrementaron la transferencia de anticuerpos para sus crías. Reed y Nagodawithana, (1991) publicaron

que los oligosacáridos presentes en la pared celular de *Sc* tales como glucanos y mananos mejoran el sistema inmune e influyen en la interacción patógeno-huésped en el tracto digestivo de animales y humanos. Animales de laboratorio, que consumieron glucanos de avena mejoraron la función de neutrófilos incrementando la defensa contra patógenos (Murphy *et al.*, 2007). Esto puede ser particularmente importante en becerros jóvenes, que son comúnmente afectados por protozoarios, virus y bacterias que causan enfermedades del tracto digestivo y algunos otros que pueden dar lugar a infecciones sistémicas (Magalhães *et al.*, 2008). Así mismo, productos solubles de cultivos de levaduras inhiben la actividad y crecimiento microbiano y modulan el sistema inmune (Jensen *et al.*, 2008).

Función de los Microminerales en el Sistema Inmune

Los minerales traza (MT) tales como el cobre (Cu), zinc (Zn), manganeso (Mn) y cobalto (Co) son importantes para el correcto crecimiento, reproducción y respuesta inmune (Dorton *et al.*, 2007) y en muchos procesos fisiológicos de los animales. Sin embargo, el impacto de la suplementación de MT sobre la inmunidad en rumiantes ha sido variable (Spears, 2000). Este mismo autor mencionó que la suplementación de oligoelementos se centró en un principio en prevenir signos clínicos de deficiencia y la disminución de la producción, pero el rol de estos elementos en la inmunidad ha sido enfatizado en estudios más recientes. La concentración de Zn y Cu en suero están influenciados por muchos factores, tales como el tiempo de muestreo y el animal (Spolders *et al.*, 2010). Por otro lado, en los componentes de la sangre pueden influir muchos factores externos (clima, estación del año y hora del día) y factores internos tales como la raza, edad y etapa de lactación (McDowell, 2003).

Las deficiencias de MT resultan en un daño en la tasa de crecimiento (Blackmon *et al.*, 1967), dificultades al parto (James *et al.*, 1987) y disminución en la producción de células T, células B, neutrófilos y macrófagos, propiciando un incremento en la susceptibilidad a infecciones (Chandra, 1999).

Actividad Antioxidante

La nutrición tiene un gran efecto sobre la salud y la inmunidad en los animales, las deficiencias nutricionales perjudican la respuesta inmune y por lo tanto, incrementan la morbilidad y mortalidad (Chew, 1995). Este mismo autor mencionó que los antioxidantes sirven para estabilizar los radicales libres altamente reactivos, por lo que mantienen la integridad funcional y estructural de las células. Los antioxidantes han sido agrupados en enzimáticos y no enzimáticos, y son las sustancias capaces de controlar en el organismo la producción de radicales libres (RL) que se generan como consecuencia del metabolismo aerobio, ya sea secuestrando RL o estabilizándolos (Halliwell y Whiteman, 2004). Tremellen (2008) mencionó que para contrarrestar los RL existe en primera instancia el sistema antioxidante enzimático, que incluye la seleno-enzima glutatión peroxidasa (GPx) que actúa fundamentalmente reduciendo el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y la SOD que actúa sobre el anión superóxido (O_2^-) transformándolo en un radical secundario (H_2O_2) para una posterior acción de la GPx.

La mayoría de las moléculas presentes en el organismo son químicamente estables, es decir, tienen un número par de electrones en su orbital externo, pero existen otras cuyo número de electrones es impar, estas sustancias químicas altamente inestables y reactivas se conocen como radicales libres (Barquinero, 1992). Halliwell (1992) reportó que cuando un radical interactúa con una sustancia estable, toma de ella un electrón cargando positivamente la molécula; así el compuesto estable se convierte en un radical libre altamente agresivo, pudiendo generar más radicales, dando lugar a una reacción en cadena. Por otra parte, el oxígeno aun siendo esencial para la vida, también es tóxico por ser una sustancia oxidante ya que puede aceptar electrones desestabilizando a la molécula que lo pierde, por tanto en el metabolismo aerobio se producen oxidantes denominados metabolitos oxigenados reactivos, entre los que se encuentra el O_2^- , hidróxido (OH) y H_2O_2 (Ceballos *et al.*, 1998).

El confinamiento y el estrés calórico pueden contribuir a incrementar los requerimientos de antioxidante en los animales. Por lo que se ha motivado en realizar estudios en los que se ofrecen suplementos antioxidantes a los animales, en la dieta o en forma parenteral, observándose que la

suplementación mejora la respuesta inmune y disminuye el estrés oxidativo, provocando una mayor resistencia a enfermedades infecciosas y degenerativas (Chew, 1995). Así mismo, González-San José *et al.*, (2001) publicaron que a medida que un individuo envejece dicho balance está a favor de los oxidantes, lo que hace de interés la necesidad de ingerir alimentos con antioxidantes para disminuirlos. En otro estudio, mencionaron que la vitamina E es un antioxidante fenólico lípido soluble; por lo que su actividad antioxidante se basa en la habilidad de donar un átomo de hidrógeno a radicales libres (Yurttas *et al.*, 2000).

Biometría Hemática en Rumiantes

En la práctica clínica de la Medicina Veterinaria los parámetros de los valores de biometría hemática (BH) son una ayuda diagnóstica fundamental en el análisis y orientación del estado clínico de un animal y en el seguimiento de un determinado hato; esta información es útil en los casos de control, valoración de procesos de estabilidad enzoótica y el estado nutricional de los animales. Así mismo, la BH es un examen de ayuda diagnóstica que en la evaluación clínica permite tomar decisiones profilácticas y curativas. Barrio *et al.*, (2003) mencionaron que la BH es la evaluación numérica y descriptiva de los elementos celulares de la sangre (glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas); constituyendo una de las pruebas más solicitadas en el laboratorio clínico, ya que acompaña casi todos los protocolos de diagnóstico con precisión, exactitud y rapidez.

Los componentes celulares sanguíneos, transportan oxígeno (glóbulos rojos o eritrocitos), protegen de organismos extraños y antígenos (glóbulos blancos o leucocitos), fagocitando, capturando o destruyéndolos, e inician la coagulación (Aiello y Mays, 2000). Estos mismos autores, mencionaron que las células sanguíneas se dividen en leucocitos (fagocitos y linfocitos); los fagocitos se subdividen en monocitos (mononucleares) y granulocitos (polimorfonucleares), así mismo, estos últimos se subdividen en neutrófilos, eosinófilos y basófilos. Por otro lado, los linfocitos son glóbulos blancos responsables de la inmunidad humoral y celular, su producción se origina en la medula ósea. En otro estudio, Aiello y Mays

(2000) reportaron que los análisis hematológicos muestran las cantidades de los elementos celulares; su evaluación permite determinar problemas de salud, inflamación de tejidos o funciones proliferativas de la médula ósea.

Cabe mencionar y destacar que toda esta información presentada ha servido como plataforma para plantear el desarrollo de un aditivo líquido de levaduras vivas, ayudando de una manera significativa en la reducción de la mano de obra que se requiere para desarrollarlo y llevarlo a cabo.

Experimento 1

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_3), ácido láctico (AL) 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_3 , AL y CL. Los valores más bajos de NH_3 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 1.0×10^7 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.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del Área de Trabajo

El estudio se llevó a cabo en 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)®, bombas oxigenadoras portátiles, mangueras y conexiones de plástico, envases de plástico de 10 mL, frascos de vidrio de 50 mL, malla de nylon®, potenciómetro de mesa (HANNA)®, microscopio, cámara de Neubauer^{MR}, refractómetro HI 96801(HANNA)®, termómetro digital (TAYLOR)®, espectrofotómetro Coleman Junior® II modelo 6J20, Incubadora Shaker I2400, CO₂ 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 ADNr 18S mediante la reacción en cadena a la polimerasa (PCR, por sus siglas en ingles), 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 1.8×10^9 UFC/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 (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_3)

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_2 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 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10.0 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1.0 g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 8.0 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 100 mL con agua destilada; la solución B (solución búfer) consta de 39.0 g NaHCO_3 ó 35.0 g NaHCO_3 + 4.0 g de $(\text{NH}_4) \text{HCO}_3$ en 1 litro con agua destilada; la solución C (macro mineral) está constituida por 5.7 g Na_2HPO_4 , 6.2 g KH_2PO_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 inóculos por tratamiento.

Para la recolección del líquido de ruminal se utilizaron tres vacas Holstein en producción con un peso promedio de 600 kg, fistulado en el saco dorsal del rumen y provisto 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, harinolína, 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 CO₂ 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 CO₂ 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 buscó 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

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

Donde:

Y_{ijk} .- Es la variable de respuesta.

μ .- Es la media general.

C_i .- Es el efecto del i-ésimo nivel de cepa.

$R(C_{ij})$.- Es 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.

ε_{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. 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 (Ingledew 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). 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 substratos 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_2), péptidos y aminoácidos entre otros (Henderickx y Martin, 1963; Mc Donald *et al.*, 2002 y Dehority, 2003).

Nitrógeno Amoniacal (N-NH₃)

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. El nitrógeno amoniacal (N-NH₃) 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 NH₃ por efecto de especies microbianas ureolíticas así lo han reportado diversos autores en diferentes trabajos en la producción de manjarina y sacharina 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 NH₃ producido es retenido en el sustrato, Díaz-Plascencia *et al.*, (2010a). El NH₃ también puede producirse por actividad desaminativa y de esta manera el NH₃ 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 NH₃; 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. 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*.

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 1).

Cuadro 1. Medias ($\pm$ EE) del comportamiento fermentativo *in vitro* entre tratamientos de ocho cepas de levaduras

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

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 (Cuadro 2).

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).

Cuadro 2. 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 ^e	1.63 $\pm$ 0.12 ^h	0.83 $\pm$ 0.03 ^b	0.60 $\pm$ 0.00 ^f	0.60 $\pm$ 0.00 ^g
1	KI-2	4.63 $\pm$ 0.06 ^a	2.80 $\pm$ 0.00 ^c	2.80 $\pm$ 0.00 ^b	2.60 $\pm$ 0.05 ^a	2.00 $\pm$ 0.05 ^a
2	KI-9	4.36 $\pm$ 0.08 ^b	2.86 $\pm$ 0.03 ^b	2.83 $\pm$ 0.03 ^b	2.36 $\pm$ 0.14 ^b	2.03 $\pm$ 0.03 ^a
3	KI-11	4.36 $\pm$ 0.12 ^b	2.40 $\pm$ 0.00 ^g	2.23 $\pm$ 0.03 ^e	2.23 $\pm$ 0.03 ^c	2.03 $\pm$ 0.03 ^a
4	KI-13	4.26 $\pm$ 0.12 ^c	2.46 $\pm$ 0.03 ^f	2.33 $\pm$ 0.08 ^d	2.20 $\pm$ 0.05 ^c	1.93 $\pm$ 0.08 ^b
5	Io-3	4.26 $\pm$ 0.03 ^c	2.96 $\pm$ 0.18 ^a	2.93 $\pm$ 0.06 ^a	2.33 $\pm$ 0.27 ^b	1.03 $\pm$ 0.08 ^e
6	Io-8	4.16 $\pm$ 0.12 ^d	2.60 $\pm$ 0.11 ^d	2.16 $\pm$ 0.06 ^f	1.80 $\pm$ 0.00 ^e	0.66 $\pm$ 0.14 ^f
7	Sc-4	4.33 $\pm$ 0.08 ^b	2.86 $\pm$ 0.06 ^b	2.83 $\pm$ 0.08 ^b	2.66 $\pm$ 0.06 ^a	1.80 $\pm$ 0.01 ^c
8	Sc-6	4.36 $\pm$ 0.08 ^b	2.56 $\pm$ 0.03 ^e	2.46 $\pm$ 0.03 ^c	2.10 $\pm$ 0.10 ^d	1.43 $\pm$ 0.06 ^d

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.

Experimento 2.

RESUMEN

El objetivo del estudio fue evaluar el efecto de un inóculo de levaduras (IL) y bagazo de manzana fermentado (BMZN) en la dieta de becerros Angus en crecimiento sobre el comportamiento productivo y sistema inmune. Se utilizaron 26 becerros ($PV=112\pm6.2$ kg) de cuatro meses de edad, los cuales fueron distribuidos al azar en tres tratamientos: T1 (testigo, $n=9$), T2 (BMZN, $n=9$) y T3 (IL, $n=8$), alimentados con las siguientes dietas: T1: heno de avena (HA) + ensilaje de maíz (EM) + concentrado; T2: HA + EM + concentrado + BMZN; T3: HA + EM + concentrado + IL. Las dietas fueron isoproteicas (28.8 % PC) e isoenergéticas (1.26 Mcal/kg MS). Las variables evaluadas fueron peso vivo (PV), ganancia diaria de peso (GDP), consumo diario de alimento (CDA), conversión alimenticia (CA) y concentración de Zn, Mn y Cu en suero sanguíneo. Además, se cuantificó actividad antioxidante (AA) en plasma sanguíneo y biometría hemática (BH) en sangre completa. Las variables fueron evaluadas cada 28 d de la prueba, excepto BH (56 y 84 d). Las variables de la prueba de comportamiento se analizaron con un modelo estadístico que incluyó como efecto fijo el tratamiento. En la concentración de Zn, Mn, Cu, AA y BH se incluyeron como efectos fijos tratamiento y muestreo; y como efecto aleatorio el animal. El T3 fue superior ($P<0.05$) en CDA y CA (8.512 ± 0.12 kg/d y 1.530 ± 0.03 , respectivamente). El Mn presentó diferencia significativa ($P<0.05$) el día 28 de muestreo, siendo T2 y T3 quienes manifestaron la menor concentración (4.29 ± 2.11 y 7.28 ± 2.22 $\mu\text{mol/L}$). El día 28 de muestreo el T1, T2 y T3 mostraron menor ($P<0.05$) concentración de Cu (8.04 ± 2.34 , 8.32 ± 2.34 y 9.76 ± 2.47 $\mu\text{mol/L}$). La AA reveló efecto de tratamiento ($P<0.05$) el día 84 de la prueba, siendo superiores el T2 y T3 con 15.72 ± 0.03 y 15.71 ± 0.03 mmol/L, respectivamente. El T1 y T2 mostraron la concentración más alta ($P<0.05$) de Leu el día 84 (9.82 ± 0.95 y $11.11\pm0.95 \times 10^3/\mu\text{L}$, respectivamente) y Lin (7.30 ± 0.92 y $8.73\pm0.92 \times 10^3/\mu\text{L}$). Se concluye que el T3 incrementó el CDA y CA, por otra parte, mantuvo la cantidad de Leu y Lin cerca del nivel máximo, sin mostrar variaciones significativas a través del tiempo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del Área de Estudio

El presente estudio se desarrolló en las instalaciones del rancho La Cañada, localizado en el municipio de Guerrero, Chihuahua, Chih., México. Ubicada en las coordenadas 28° 33' 05" latitud norte y 106° 30' 07" longitud oeste, con una altitud de 2,010 msnm, según sistema de posicionamiento global (GPS por sus siglas en inglés, MAGELLAN®, MobileMapper-Pro).

El clima es semihúmedo templado; la temperatura media anual es de 13 °C, con una media máxima de 42 °C y una media mínima de -17.6 °C. La precipitación promedio anual es de 517.2 mm, con una humedad relativa del 65 % y un promedio anual de 90 días de lluvia (INAFED, 2010). El experimento inicio el 17 de febrero y finalizo el 25 de mayo de 2014.

Descripción de los Animales y Tratamientos

Se utilizaron 27 becerros Angus destetados con peso inicial de 112±6.2 kg y edad promedio de cuatro meses. Los becerros se asignaron aleatoriamente a tres tratamientos; T1 (testigo, n=9): heno de avena (HA) + ensilaje de maíz (EM) + concentrado; T2 (BMZN, n=9): HA + EM + concentrado + BMZN y T3 (IL, n=8): HA + EM + concentrado + IL. Los concentrados (Cuadro 12) 3 se adicionaron al HA y EM al momento de ofrecer el alimento.

El BMZN se preparó con 75 kg de manzana de desecho, al cual se le adicionaron 350 gr de urea + 100 gr de sulfato de amonio + 200 gr de premezcla de vitaminas y minerales traza, posteriormente se mezclaron en un fermentador aeróbico por 72 h, manteniendo el mezclado por 15 min en cada tiempo (0, 6, 12, 24, 48 y 72 h). Esta cantidad de mezcla se preparó en dos etapas, la primera para preparar el concentrado para los meses febrero y marzo (600 kg), y la segunda para los meses abril y mayo (600 kg).

Cuadro 3. Composición del alimento concentrado por tratamiento.

Ingredientes	T1	T2	T3
	% (BS)		
Maíz rolado	32.0	30.6	32.0
Melaza	10.0	5.0	8.0
Harinolina 41 % PC	20.6	15.0	20.6
Pasta de soya 44 % PC	30.0	30.0	30.0
Carbonato de calcio	2.4	2.4	2.4
BMZN ²	0.0	12.0	0.0
Sal común	2.0	2.0	2.0
Minerales y vitaminas ^{12:10} ¹	3.0	3.0	3.0
Inoculo de levaduras	0.0	0.0	2.0
Análisis calculado			
ENg Mcal/kg	1.26	1.25	1.26
PC %	28.81	28.83	28.89
PD %	53.91	51.78	53.07
Ca %	1.67	1.77	1.68
P %	0.98	0.99	0.99
Cu mg/kg	16.12	13.75	15.32
Mn mg/kg	31.66	30.18	31.17
Zn mg/kg	42.48	40.32	42.70

¹Mezcla de minerales y vitaminas 12:10: P, Ca y Mg (12.0, 11.5, 0.6 %), Mn, Zn, Fe, Cu, I, Co y Se (2160, 2850, 580, 1100, 102, 13, 9 ppm), Vitamina A, D3 y E (220000, 24500, 30 UI/kg).

²BMZN = Bagazo de manzana fermentado.

Material Biológico

Las cuatro 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 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. 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, realizando su análisis por medio del 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 y 11; *I. orientalis* cepa 3 y *S. cerevisiae* cepa 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 fué de 48 horas a una temperatura de 30 °C. Posteriormente, se conservaron en refrigeración a una temperatura de 4 °C.

El IL que se utilizó en el presente experimento, se preparó en 5 botes de 20 L, a 4 de ellos se le agregaron cultivos de levaduras provenientes de 3 cajas Petri de cada una de las cepas descritas anteriormente, adicionando a cada uno de los 5 botes, 6 g de urea, 1 g de sulfato de amonio, 500 g de melaza de caña, 2.5 g de premezcla de vitaminas y minerales y 6 L de agua destilada. A cada bote se le adaptó un oxigenador portátil durante 96 h con la finalidad de suministrar el oxígeno necesario para favorecer el crecimiento de las levaduras.

Posteriormente se tomaron muestras de 10 mL de cada bote en frascos de plástico de 50 mL cerrados herméticamente, los cuales se trasladaron al Laboratorio de Nutrición Animal para realizar el conteo de levaduras por microscopia, con la ayuda de una micropipeta (Nichiryo LE) de un volumen de 10 a 100 μ L y puntas desechables, así mismo, se preparó una dilución serial de 1 mL de muestra utilizando como diluyente agua destilada, posteriormente se tomaron 10 μ L de la dilución de cada muestra y se colocaron en un hematocímetro (cámara de Neubauer) para el conteo (Díaz, 2006).

La cantidad de células individuales o en gemación se contaron en los 4 cuadrantes de la cámara de Neubauer. Se determinó el promedio por cuadrante y se calculó la cantidad de células por mililitro (cel/mL), ajustando la cantidad de cada cepa a 3.7×10^9 UFC/mL en 500 mL por medio de diluciones con el sustrato sin levaduras, para adicionar 2 L de inóculo en el concentrado del T3.

Manejo de los Animales

Previo al inicio del experimento los becerros fueron pesados e identificados con arete plástico, vacunados vía intramuscular (IBR, DVB, PI3, VRSB) con una dosis de 2 mL/animal, desparasitados interna y externamente vía subcutánea con Ivermectina 1 % (1 mL/50 kg de PV). Posteriormente, fueron divididos al azar en tres grupos de nueve becerros, cada grupo estuvo formado por tres corrales (18 m²) con piso de tierra, provistos con bebedero y comedero alojando tres animales cada uno, con disponibilidad permanente de agua y alimentados *ad libitum* una vez al día a las 9:00 h. Se utilizaron tres dietas de crecimiento durante el experimento (NRC, 1996), ofreciendo 1.2 kg de HA y 1.7 kg de EM en base a materia seca (MS), adicionando 1.2 kg de MS de concentrado por animal por día según el tratamiento correspondiente. Cada 14 d se ajustó el consumo de alimento, pesando el alimento ofrecido y rechazado por tres días consecutivos, donde únicamente se aumentaron los kg de HA y EM en un 15 %, asegurando la disponibilidad de la dieta durante todo el día.

Un becerro fue descartado de la prueba, debido a causas ajenas al efecto de tratamiento, por lo que el tamaño de muestra del T3 fue de 8 becerros.

Toma de Muestras

Temperatura ambiental. La temperatura ambiental (TA) máxima y mínima se registró diariamente con un termómetro de mercurio a las 7:00 am y 1:00 pm.

Comportamiento productivo. Las variables de la prueba de comportamiento se midieron al inicio y cada 28 d durante todo el experimento, pesándose individualmente a los becerros los días 1, 28, 56 y 84 de la prueba, utilizando una báscula REVUELTA® con capacidad de 1500 kg para conocer su peso vivo (PV). El alimento ofrecido y el rechazado fueron registrados tres días consecutivos por corral a mitad de cada periodo de pesaje mediante una báscula manual PEXA, para calcular el consumo de materia seca (CMS), ajustándose a un rechazo de un 10 %.

Para calcular la ganancia diaria de peso (GDP) se realizó una resta entre pesos consecutivos y el producto se dividió entre 28, siendo el número de días que transcurrieron entre un pesaje y otro. La información obtenida sobre el CMS y GDP fue usada para determinar la conversión alimenticia (CA), la cual es la cantidad resultante entre la cantidad de alimento consumido y la ganancia de peso en un periodo de 28 d.

Muestras sanguíneas. Por animal se colectaron cuatro tubos de muestra de sangre por punción directa de la vena yugular después del pesaje individual y antes que recibieran la dieta durante la mañana, estas muestras se preservaron en hielera abastecida con hielo.

Determinación de minerales en suero. Para la medición de Zinc (Zn), Manganese (Mn) y Cobre (Cu) se colectaron dos tubos Vacutainer® (sin anticoagulante), al inicio y cada 28 d de la prueba. Las muestras obtenidas fueron centrifugadas a 3500 xg durante 10 min a 4 °C para extraer el suero sanguíneo; se colectó el sobrenadante en viales color ámbar de 10 mL previamente marcados y posteriormente se congelaron a - 20 °C hasta realizar su análisis. Previo a su medición,

se descongelaron en refrigeración a 4 °C, posteriormente se tomaron tres submuestras de 2 mL para cada mineral (Zn, Mn y Cu) en tubos (BD Falcon) de 5 mL, adicionándole ácido tricloroacético (ATCA) al 20 % (1 mL ATCA: 1 mL de suero), mezclándose en vórtice (Vortex Genie II) por 10 segundo (s) para después centrifugar a 3500 xg durante 10 min y 4 °C para obtener un sobrenadante desproteinizado, posteriormente la cantidad de sobrenadante se diluyó con agua destilada en la misma proporción (1 mL:1 mL).El análisis fue realizado con estándares preparados con glicerol para mantener las características de viscosidad de las muestras diluidas. Todas las soluciones utilizadas fueron preparadas con agua tridestilada.

La solución estándar de Zn ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) fue preparada con 1.09 g diluidos en 250 mL de agua tridestilada, adicionando el 5 % de glicerol; el estándar de Mn ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) fue preparado con 0.77 g diluidos en 250 mL de agua tridestilada, adicionando el 10 % de glicerol; y la solución estándar de Cu ($\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) fue preparada con 9.71 mL diluidos en 100 mL de agua destilada, adicionando 10 % de glicerol. Las soluciones de trabajo de los estándares fueron preparadas un día antes de analizar las muestras. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado por medio de espectrofotometría de absorción atómica (AAnalyst 200, Perkin-Elmer instruments), siguiendo las recomendaciones de Makino y Takahara (1981) reportando los resultados en partes por millón (ppm).

Medición de la actividad antioxidante en plasma (AA). Para la medición de actividad antioxidante (AA) se colectó una muestra en tubo Vacutainer® (7.2 mg de EDTA como anticoagulante) al inicio y cada 28 d del experimento. Las muestras destinadas para determinar AA, se trasladaron al laboratorio de nutrición animal de la Facultad de Zootecnia y Ecología donde fueron centrifugadas a 3500 xg por 10 min a 4 °C, el plasma se decantó en viales color ámbar de una capacidad de 10 mL, previamente rotulados, posteriormente se congelaron a - 20 °C hasta el momento de su medición. Esta variable se analizó con la técnica desarrollada por Benzie y Strain

(1996), la cual tiene como objetivo medir la habilidad del plasma para reducir el fierro o FRAP por sus siglas en inglés (Ferric Reductive Ability of Plasma). Esta técnica se realiza por colorimetría, diluyendo las muestras de plasma en agua destilada y metanol (73.75 % de agua destilada, 25 % de metanol y 1.25 % de plasma).

Para la medición de AA se prepararon tres soluciones: 1.- Solución búfer (300 mM de $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, pH 3.6) se agregaron 3.1 g de acetato de sodio trihidratado, se añadieron 16 mL de ácido acético glacial ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$) y se aforó a 1 litro (L) con agua destilada, esta solución se preservó a 4 °C; 2.- Solución de ácido clorhídrico (HCl) 40 mM, se adicionó 1.46 mL de HCl concentrado en un matraz de 1 L, aforándose con agua destilada, esta solución se preservó a temperatura ambiente; 3.- Solución tris-piridil-triacina (TPTZ; 10 mM/L de 2,4,6-trispyridyl-s-triazine), se mezclaron 0.031 g de TPTZ en 10 mL de la solución 2, este reactivo se preparó al momento en que fue utilizado; 4.- Solución de cloruro férrico hexahidratado (20 mM de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), se mezclaron 0.054 g en 10 mL de agua destilada, esta solución se preparó un día antes de ser utilizada y se preservó en refrigeración (4 °C).

La solución FRAP estuvo compuesta por las soluciones 1, 3 y 4 en una relación de 10:1:1 (v/v/v), este reactivo fué preparado al momento en que fueron preparadas las muestras para su análisis, ya que no puede ser preservado.

La solución estándar para la curva de calibración se preparó con 0.0417 g de sulfato ferroso heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) diluido en 50 mL de metanol grado HPLC (CH_3OH), con esta mezcla se prepararon muestras de 0.0 (blanco), 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 mL, a dichas cantidades se les agregó metanol (excepto a la última) hasta completar 1 mL y posteriormente a cada una se le adicionó 3 mL de agua destilada, se agitaron en vórtice por 10 s, posteriormente cada punto de la curva se analizó por triplicado, extrayendo 200 μL de cada punto y adicionándole 1,800 μL de solución FRAP por cada tubo del triplicado, nuevamente se agitaron en vórtice y después de 10 min

de reposo a temperatura ambiente se procedió a tomar la lectura en un espectrofotómetro Junior® II Coleman modelo 6/20 a una absorbancia de 593 nanómetros (nm). Con los datos que se obtuvieron se elaboró una curva de predicción en base a una ecuación de regresión.

Una vez descongelado el plasma se procedió a preparar las muestras, se tomaron 7 µL de plasma y se añadieron a un tubo en el que previamente se habían adicionado 200 µL de agua, enseguida se agregaron 195 µL de metanol y se mezclaron en vortex, a dicha mezcla se le añadieron 2,000 µL de solución FRAP, pasados 10 min de reposo se procedió a tomar la lectura a una absorbancia de 593 nm. El blanco se preparó de la misma forma que las muestras, excepto que se le adicionaron 7 µL de agua destilada, las muestras y el blanco se prepararon por triplicado. Con la ecuación y la cantidad de absorbancia de la muestra, se calculó la AA por micromolar (µM) de plasma sanguíneo, los resultados se expresaron en micromolar equivalentes a Fe₂ (µM Fe₂).

Biometría hemática (BH). Para analizar biometría hemática (BH) se colectó un tubo Vacutainer® (7.2 mg de EDTA como anticoagulante) los días 56 y 84 del experimento. Se determinaron diferentes componentes sanguíneos en cantidad, porcentaje y peso, siendo los siguientes: Leucocitos (Leu), Neutrófilo (Neu), Linfocitos (Lin), Células mixtas (Cm), Eritrocitos (Er), Hemoglobina (Hem), Hematocrito (Hto), Volumen corpuscular medio (VCM), Hemoglobina corpuscular medio (HCM), Concentración de hemoglobina corpuscular medio (CHCM) y Plaquetas (Pq).

Las muestras para BH se enviaron a las instalaciones de ASSAY Laboratorio Clínico S. de R. L. de C. V., donde realizaron su análisis mediante un citómetro Beckman Coulter®/act/dif/1al.

Análisis Estadístico

Las variables de la prueba de comportamiento, como el PV, CDA, GDP y CA se analizaron tomando como efecto fijo el tratamiento y el peso inicial como covariable en un diseño completamente al azar. Por otra parte, se analizaron Zn, Mn, Cu, AA y BH tomando como efectos

fijos tratamiento y muestreo, y su interacción, y como efecto aleatorio al animal, se utilizó la prueba de Tukey para establecer las posibles diferencias entre las medias de los tratamientos (Steel y Torrie, 1997).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Temperatura Ambiental

La TA promedio que se registró durante los meses transcurridos en este experimento, se muestra en el (Cuadro 4). La TA es probablemente la variable más investigada y al mismo tiempo la más utilizada como indicador de estrés. Los efectos de la temperatura ambiente sobre el rendimiento de los animales han sido estudiados ampliamente en el ganado bovino (Mujibi *et al.*, 2010), y se ha encontrado que un animal dentro de su capacidad genética y fisiológica, se ajusta continuamente para enfrentar los cambios ambientales (Young *et al.*, 1989). Por otro lado, Arias (2006) mencionó que la temperatura ambiente efectiva de confort es el estado constante de temperatura corporal, la cual puede ser mantenida sin necesidad de ajustes fisiológicos o de comportamiento.

En este estudio es probable que los animales hayan experimentado un cuadro de estrés por frío, y como respuesta incrementaron el consumo de alimento para generar calor metabólico lo que coincide con Young (1983) quien reportó que animales expuestos a bajas temperaturas desencadenan diversos mecanismos de termorregulación donde los requerimientos para mantenimiento permanecen sin cambios hasta que la temperatura crítica sea superada; por el contrario, puede provocar daños de tejidos, del sistema inmune y disminución en la respuesta reproductiva y de crecimiento (Moberg, 1987).

Prueba de Comportamiento

Se observó un efecto significativo ($P < 0.05$) sobre el CDA y CA como consecuencia de la dieta (Cuadro 5). Los becerros del T3 fueron superiores ($P < 0.05$) en el CDA (8.512 ± 0.12 kg/d) y en la CA (1.530 ± 0.03) que aquellos que se les ofreció bagazo de manzana fermentado y la dieta testigo.

Cuadro 4. Temperatura ambiental promedio registrada durante el experimento

Fecha	Día de muestreo ^b	Temperatura °C ^a	
		Máxima	Mínima
17-Febrero / 01-Marzo	1	24.3	-7.3
02-Marzo / 30-Marzo	28	27.2	-3.0
31-Marzo / 27-Abril	56	30.4	0.9
28-Abril / 25-Mayo	84	30.7	2.6
Promedio		28.1	-1.7

^a La temperatura máxima y mínima corresponde al promedio registrado en el transcurso de los días de las fechas indicadas.

^b Son los días de muestreo durante el tiempo que duró el experimento.

Cuadro 5. Medias ($\pm$ EE) del comportamiento productivo de becerros alimentados con tres dietas diferentes.

Variables	Tratamientos ¹		
	T1	T2	T3
Peso vivo, kg	184.96 $\pm$ 4.34 ^a	178.34 $\pm$ 4.36 ^a	183.60 $\pm$ 4.61 ^a
CDA, kg/d	7.89 $\pm$ 0.12 ^b	7.54 $\pm$ 0.12 ^b	8.51 $\pm$ 0.12 ^a
GDP, kg/d	0.86 $\pm$ 0.05 ^a	0.79 $\pm$ 0.05 ^a	0.85 $\pm$ 0.05 ^a
CA	1.39 $\pm$ 0.03 ^b	1.38 $\pm$ 0.03 ^b	1.53 $\pm$ 0.03 ^a

^{a,b} Medias con diferente literal en fila, son diferentes ($P<0.05$) entre tratamiento.

¹ T1 = Heno de avena (HA) + ensilaje de maíz (EM) + concentrado; T2 = HA + EM + concentrado + bagazo de manzana fermentado (BMZN); T3 = HA + EM + concentrado + inóculo de levaduras (IL).

Sin embargo, a pesar de que los becerros que recibieron un IL en su dieta mostraron un efecto sobre CDA y CA, no hubo ($P>0.05$) diferencia en PV y GDP al compararse con los otros dos tratamientos. Es posible que el IL haya estimulado el crecimiento numérico de las bacterias celulolíticas e incrementado la fermentación de la fibra a nivel ruminal, aumentando así el consumo de alimento sin mejorar el PV y GDP.

De acuerdo con otras investigaciones, el aumento en el consumo diario de alimento observado es resultado de un incremento en la degradación ruminal de la fibra por efecto de la adición del cultivo de levadura (Newbold *et al.*, 1996), lo que parece estar asociado al estímulo en crecimiento y actividad de las bacterias celulolíticas, incrementando el flujo de proteína hacia el intestino delgado por lo que se espera un mejor desarrollo del animal por tener más disponibilidad de nutrientes (Biricik y Turkmen, 2001). Young (1983) indicó que animales expuestos a condiciones de frío por abajo de la temperatura corporal crítica, está asociada con la aclimatación metabólica, lo que se traduce en mayor producción de calor para mantener las funciones vitales del organismo. Delfino y Mathison (1991) reportaron evidencia de que las bajas temperaturas provocan un comportamiento pobre en términos de eficiencia alimenticia.

En el presente estudio, posiblemente la TA extrema que se registró durante el desarrollo de la prueba limitó la expresión del potencial productivo de los animales. La menor producción durante el invierno está asociada a mayor demanda de energía para mantenimiento y menor digestibilidad del alimento (Arias *et al.*, 2008) por incremento en la actividad de la glándula tiroides que influye en el tracto gastrointestinal, causando incremento de la motilidad intestinal y tasa de pasaje de los alimentos (NRC, 1996). En otro estudio mencionaron que el consumo de alimento se incrementó en invierno sin tener efecto en la eficiencia alimenticia, por lo que la energía del alimento fue dirigida para mitigar los efectos de las condiciones climáticas adversas, tales como, incrementar la producción de calor o la acumulación de grasa corporal para ayudar a disminuir la pérdida de calor (Mujibi *et al.*, 2010).

Concentración de Minerales en Suero

Zinc. El (Cuadro 6) presenta la concentración en suero sanguíneo, mostrando significancia ($P<0.05$) el día de muestreo. El Zn superó el nivel más alto dentro de la especie, excepto el día 56, siendo este día donde los tres tratamientos registraron la concentración más baja ($P<0.05$), con valores de 11.14 ± 2.77 , 10.56 ± 2.81 y 12.30 ± 2.90 $\mu\text{mol/L}$ para el T1, T2 y T3, respectivamente. Así mismo, al final del experimento el T2 reveló diferencia ($P<0.05$) mostrando 22.29 ± 2.81 $\mu\text{mol/L}$, inferior al 1 y 28 d de muestreo, pero superior al 56 d. Los valores de referencia para el Zn van desde 13.96 a 16.43 $\mu\text{mol/L}$ (McDowell y Arthington, 2005).

La concentración de Zn mostró significancia al incrementarse los niveles cuando se presentaron las temperaturas más bajas. El rol específico del Zn en la respuesta inmune no está completamente claro, sin embargo, se considera esencial para la integridad del sistema inmune (Hambridge *et al.*, 1986). Murray *et al.*, (2000) mencionaron que el Zn es un componente estructural de la enzima superóxido dismutasa (SOD), la cual ayuda a eliminar los radicales libres producidos en el cuerpo durante una respuesta inmune. Droke y Spears (1993) publicaron que la respuesta inmune de corderos alimentados con deficiencia marginal de zinc (8.7 mg/kg MS) en su dieta, no revelaron diferencias con respecto a los corderos que recibieron cantidades adecuadas de zinc (44.0 mg/kg MS). Sin embargo, en este estudio se obtuvieron los límites fisiológicos más bajos el día 56 de muestreo sin observarse signos clínicos, lo que concuerda con Cuesta *et al.*, (2011) quienes observaron valores promedio de 13.19 $\mu\text{mol/L}$ inferiores al límite más bajo para la especie con un 87.5 % de los animales por abajo del rango inferior sin observarse animales físicamente enfermos.

Cuadro 6. Medias ($\pm$ EE) de la concentración de zinc ($\mu\text{mol/L}$) en suero sanguíneo de becerros alimentados con tres dietas diferentes

Día de muestreo	Tratamientos ¹		
	T1	T2	T3
1	31.38 $\pm$ 2.77 ^x	31.65 $\pm$ 2.81 ^x	31.15 $\pm$ 2.90 ^x
28	30.03 $\pm$ 2.77 ^x	36.75 $\pm$ 2.81 ^x	29.62 $\pm$ 2.90 ^x
56	11.14 $\pm$ 2.77 ^y	10.56 $\pm$ 2.81 ^z	12.30 $\pm$ 2.90 ^y
84	29.05 $\pm$ 2.77 ^x	22.29 $\pm$ 2.81 ^y	24.76 $\pm$ 2.90 ^x

^{x,y,z} Medias con diferente literal en columna, son diferentes ($P < 0.05$) entre día de muestreo.
¹ T1 = Heno de avena (HA) + ensilaje de maíz (EM) + concentrado; T2 = HA + EM + concentrado + bagazo de manzana fermentado (BMZN); T3 = HA + EM + concentrado + inóculo de levaduras (IL).

Spears (2000) reportó que la deficiencia de zinc en corderos disminuye el porcentaje de linfocitos e incrementan los neutrófilos en la circulación sanguínea; de acuerdo a lo publicado por este autor, en nuestro estudio la disminución de Zn el día 56 propició una reducción en la cantidad de linfocitos e incrementan los neutrófilos en la circulación sanguínea; de acuerdo a lo publicado por este autor, en nuestro estudio la disminución de Zn el día 56 propició una reducción en la cantidad de linfocitos pero no un incremento en el número de neutrófilos, lo que coincide con lo publicado por (Hambridge *et al.*, 1986). Cerone *et al.*, (2000) reportaron que la deficiencia de Zinc y Cobre provoca en bovinos atrofia del bazo y del timo, linfopenia, monocitosis y disminución de la capacidad fagocítica de los neutrófilos, afecta a las células T y B y por tanto la producción de anticuerpos.

Manganeso. La mayor ($P<0.05$) concentración de Mn que presentaron los tratamientos fue al inicio y al final de la prueba (Cuadro 7), sin embargo, el día 28 se observaron las concentraciones más bajas ($P<0.05$) con 4.97 ± 2.15 , 4.29 ± 2.11 y 7.28 ± 2.22 $\mu\text{mol/L}$ para T1, T2 y T3, respectivamente. Excepto para el T1 con niveles similares el día 28 y 56 ($P>0.05$).

La absorción de Mn es influenciada por muchos factores tales como la forma química e interacciones entre diferentes micronutrientes (Sanchez-Morito *et al.*, 1999). Así mismo, el Mn es otro antagonista potencial del Cu que afecta su absorción a nivel intestinal (Grace, 1973), limitados estudios han examinado el efecto antagónico que ejerce el Mn sobre el Cu en dietas de rumiantes. Arredondo *et al.*, (2003) sugirieron que el Mn y Cu pueden compartir la misma ruta en la absorción y transporte a nivel intestinal, por medio de la proteína transportadora 1 de metales divalentes lo que los hace competir entre ellos. En su estudio Ivan y Grieve (1976) encontraron que la adición de 50 mg Mn/kg MS a una dieta que contenía 12 mg Mn/kg MS resultó en una disminución en la absorción de Cu en el tracto gastrointestinal de becerros Holstein; sin embargo, la dinámica del antagonismo en rumiantes no está muy clara.

Cuadro 7. Medias ($\pm$ EE) de la concentración de manganeso ($\mu\text{mol/L}$) en suero sanguíneo de becerros alimentados con tres dietas diferentes.

Día de muestreo	Tratamientos ¹		
	T1	T2	T3
1	22.57 $\pm$ 2.15 ^x	21.10 $\pm$ 2.11 ^x	21.81 $\pm$ 2.22 ^x
28	4.97 $\pm$ 2.15 ^y	4.29 $\pm$ 2.11 ^z	7.28 $\pm$ 2.22 ^z
56	8.50 $\pm$ 2.15 ^y	12.56 $\pm$ 2.11 ^y	14.92 $\pm$ 2.22 ^y
84	22.30 $\pm$ 2.15 ^x	23.71 $\pm$ 2.11 ^x	23.37 $\pm$ 2.22 ^x

^{x,y,z} Medias con diferente literal en columna, son diferentes ($P < 0.05$) entre día de muestreo.

¹ T1 = Heno de avena (HA) + ensilaje de maíz (EM) + concentrado; T2 = HA + EM + concentrado + bagazo de manzana fermentado (BMZN); T3 = HA + EM + concentrado + inóculo de levaduras (IL).

En el presente estudio, la disminución de Mn y Cu el día 28 de muestreo tal vez se debió a la alta concentración de Zn que ocurrió el mismo día, siendo el Cu para el día 56 quien propicio la menor cantidad de Mn y Zn.

Aunque existen otros minerales que pueden provocar su disminución tal como la deficiencia de Mg puede modificar indirectamente la absorción de Mn por la alteración de la disponibilidad de otros cationes divalentes tales como Ca, Zn (Planells *et al.*, 1994) y Cu (Jimenez *et al.*, 1997). Sanchez-Morito *et al.*, (1999) asumieron que la disminución en la concentración de Mn estuvo relacionada a un incremento en la actividad metabólica en la medula ósea, como un mecanismo para incrementar la eritropoyesis e intentar compensar la hemolisis inducida por la deficiencia de Mg (Piomelli *et al.*, 1973). Por otra parte, Jenkins y Hiridoglou (1991) publicaron que el exceso de Mn afecta negativamente el metabolismo de Fe en bovinos, resultando en una disminución del volumen del paquete celular y de la hemoglobina, reduciendo la capacidad de unión de Fe en suero.

Cobre. La concentración de Cu de los tres tratamientos sobrepasó el nivel máximo dentro de la especie durante la prueba (Cuadro 8), excepto en el día 28, este mismo día los tres tratamientos fueron inferiores ($P<0.05$) al resto de los días de muestreo (8.04 ± 2.34 , 8.32 ± 2.34 y 9.76 ± 2.47 $\mu\text{mol/L}$ para el T1, T2 y T3, respectivamente). Sin embargo, los tres tratamientos el día 56 revelaron la más alta ($P<0.05$) concentración que el resto de los días de muestreo, excepto el día 56 y 84 del T3 los cuales fueron similares ($P>0.05$). El rango de valores de referencia para Cu en suero de bovinos es de 11.0 a 18.0 $\mu\text{mol/L}$ (McDowell y Arthington, 2005).

Castillo *et al.*, (2012) mencionaron que el Cu es un elemento traza esencial para los procesos de respuesta inmune, juega un rol de cofactor para muchas enzimas (citocromo oxidasa, ceruloplasmina y superóxido dismutasa), por lo que puede realizar varias funciones en el sistema inmune de las cuales el mecanismo directo de acción no está muy claro (Solaiman *et al.*, 2007).

Cuadro 8. Medias ($\pm$ EE) de la concentración de cobre ($\mu\text{mol/L}$) en suero sanguíneo de becerros alimentados con tres dietas diferentes

Día de muestreo	Tratamientos ¹		
	T1	T2	T3
1	22.17 $\pm$ 2.34 ^y	24.48 $\pm$ 2.34 ^y	23.83 $\pm$ 2.47 ^y
28	8.04 $\pm$ 2.34 ^z	8.32 $\pm$ 2.34 ^z	9.76 $\pm$ 2.47 ^z
56	33.36 $\pm$ 2.34 ^x	38.06 $\pm$ 2.34 ^x	31.29 $\pm$ 2.47 ^x
84	23.16 $\pm$ 2.34 ^y	20.96 $\pm$ 2.34 ^y	29.29 $\pm$ 2.47 ^x

^{x,y,z} Medias con diferente literal en columna, son diferentes ($P<0.05$) entre día de muestreo.
¹ T1 = Heno de avena (HA) + ensilaje de maíz (EM) + concentrado; T2 = HA + EM + concentrado + bagazo de manzana fermentado (BMZN); T3 = HA + EM + concentrado + inóculo de levaduras (IL).

Se ha observado que animales con deficiencias de Cu pueden tener cupremias dentro de rango, ya que en los tejidos donde se acumula sigue enviando sus reservas a la circulación (Quiroz-Rocha y Bouda, 2001). Asimismo, animales con intoxicación crónica por Cu pueden tener acumulación excesiva principalmente en hígado y los niveles séricos encontrarse dentro de rangos de referencia (Wikse *et al.*, 1992).

En este estudio, el día 28 de muestreo los tres tratamientos presentaron niveles inferiores a los límites fisiológicos de la especie, esto tal vez debido al incremento de Zn que haya competido en la absorción de Cu y repercutido en su concentración, o posiblemente porque el Cu fue incorporado a la SOD en las células rojas durante la hematopoyesis y vida útil de eritrocitos la cual es alrededor de 150 días (Suttle y McMurray, 1983).

En otro estudio, Cuesta *et al.*, (2011) diagnosticaron valores promedio de Cu de 11.5 $\mu\text{mol/L}$ y el 40 % de sus bovinos presentaron valores inferiores al límite crítico de 11.0 $\mu\text{mol/L}$ sin presentar signos clínicos. Los rumiantes en su mayoría, excepto el ovino, tienen alta capacidad de almacenar Cu en el hígado (Mertz y Davis, 1987), esto se debe a su capacidad de síntesis de metalotioneínas que ayudan a retener al Cu y otros minerales en el hepatocito (Gooneratne *et al.*, 1989). Durante la hipocuprosis disminuye la actividad de enzimas Cu dependientes como la citocromo oxidasa, que es necesaria para la actividad fagocítica y de la superóxido dismutasa (SOD), lo que reduce la vida media de los leucocitos al ser estas células dependientes de esta enzima y todo ello causa predisposición de enfermedades infecciosas y virales afectándose negativamente el sistema inmunológico del animal y con ello la capacidad de respuesta a la infección (Spears, 2003).

Actividad Antioxidante

La mayor AA ($P < 0.05$) se observó al inicio del experimento en los tres tratamientos, mostrando un incremento significativo ($P < 0.05$) el T2 ($15.99 \pm 0.03 \mu\text{mol/L}$) al compararse con el T1 y T3, sin

embargo, el T1 el día 84 fué inferior ($P<0.05$) al T2 y T3 ($15.62\pm0.03\ \mu\text{mol/L}$). Así también, el día 28 y 56 el T2 y T3 fueron similares entre sí, pero inferiores ($P<0.05$) al día 1 y 84 de la prueba (Cuadro 18)9.

Tanaka *et al.*, (2008) mencionaron que el estrés por calor estimula la producción de radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ROS). Por otra parte, el estrés oxidativo corresponde a un desequilibrio entre la tasa de producción de oxidantes y la de su degradación (Sorg, 2004).

Los resultados del presente estudio, mostraron que al exponer los becerros al frío en los primeros días del experimento, los niveles de los minerales y BMZN del T2 ejercieron efecto sobre las enzimas antioxidantes, disminuyendo la liberación de ROS en los becerros, pudiendo protegerlos de un estrés oxidativo, mostrando el mismo patrón el día 84 para los T2 y T3. Lo que coincide con Prior y Cao (1999) quienes publicaron que un incremento en la producción de ROS puede causar una disminución en la capacidad antioxidante total *in vivo*. Rodríguez (2008) reportó que ovinos engordados con una dieta con manzanarina, presentaron un incremento de AA con respecto al grupo testigo (24.34 y $21.79\ \mu\text{mol/L}$). En otro estudio Gallegos (2007) publicó que vacas Holstein en producción alimentadas con manzanarina, mostraron mayor AA ($22.52\ \mu\text{mol/L}$) con respecto al grupo control ($18.65\ \mu\text{mol/L}$) al final de la prueba reportaron que los bovinos requieren alrededor de 3 o 4 días después de iniciado un cambio calórico para disminuir totalmente los efectos de la carga calórica, seguido de una recuperación del poder total antioxidante en su cuerpo (Worapol *et al.*, 2011).

Biometría hemática

El Cuadro 10 y 11 muestran los niveles hematológicos y los parámetros de referencia. Los leucocitos (Leu), linfocitos (Lin), volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM) y plaquetas (Pq) presentaron efecto ($P<0.05$) del día de muestreo; los neutrófilos (Neu) en % y μL presentaron diferencia ($P<0.05$) entre tratamientos.

Cuadro 9. Medias ($\pm$ EE) de la actividad antioxidante ($\mu\text{mol/L FeSO}_4$)² en plasma sanguíneo de becerros alimentados con tres dietas diferentes.

Día de muestreo	Tratamientos ¹		
	T1	T2	T3
1	15.73 $\pm$ 0.03 ^{b x}	15.99 $\pm$ 0.03 ^{a x}	15.81 $\pm$ 0.03 ^{b x}
28	15.62 $\pm$ 0.03 ^{a y}	15.64 $\pm$ 0.03 ^{a z}	15.62 $\pm$ 0.03 ^{a z}
56	15.58 $\pm$ 0.03 ^{a y}	15.61 $\pm$ 0.03 ^{a z}	15.62 $\pm$ 0.03 ^{a z}
84	15.62 $\pm$ 0.03 ^{b y}	15.72 $\pm$ 0.03 ^{a y}	15.71 $\pm$ 0.03 ^{a y}

^{ab} Medias con diferente literal en fila, son diferentes ($P < 0.05$) entre tratamiento.

^{x,y,z} Medias con diferente literal en columna, son diferentes ($P < 0.05$) entre día de muestreo.

¹ T1 = Heno de avena (HA) + ensilaje de maíz (EM) + concentrado; T2 = HA + EM + concentrado + bagazo de manzana fermentado (BMZN); T3 = HA + EM + concentrado + inóculo de levaduras (IL).

² $\mu\text{mol/L FeSO}_4$ (micromolar de actividad reductiva de FeSO_4), por litro de plasma sanguíneo.

Leucocitos y linfocitos. Las concentraciones de Leu y Lin el día 84 de muestreo presentaron aumento significativo ($P<0.05$) en el T1 y T2 mostrando 9.82 ± 0.95 y $11.11\pm0.95 \times 10^3/\mu\text{L}$ para Leu y 7.30 ± 0.92 y $8.73\pm0.92 \times 10^3/\mu\text{L}$ para Lin, respectivamente.

Cabe mencionar que el T2 y T3 superaron el nivel máximo dentro de la especie en Lin (Cuadro 10). Los becerros que recibieron IL en su dieta mantuvieron la cantidad de Leu y Lin cerca del nivel máximo para estas variables, sin mostrar variaciones significativas a través del tiempo.

El día 56 de muestreo fue donde se observó la menor cantidad de Leu y Lin, tal vez debido a la presencia de un cuadro de estrés, provocado por las bajas temperaturas promedio registradas durante los días 1, 28 y 56 (-7.3 , -3.0 y 0.9 °C) del experimento seguido por la disminución en la concentración de Zn, Mn y AA lo que repercutió en la disminución de estas células exponiendo a los becerros a una liberación de ROS. Sin embargo, el día 84 incrementaron la cantidad de células blancas, minerales y AA, lo cual puede relacionarse con la recuperación de su confort, superando el desafío de estrés térmico sin haber mostrado signos clínicos adversos.

Gupta *et al.*, (2007) mencionaron que existe una estrecha relación entre el perfil de leucocitos y el nivel de glucocorticoides plasmáticos durante el estrés fisiológico; estas hormonas pueden actuar incrementando el número y porcentaje de neutrófilos, mientras que disminuyen los linfocitos (Blanco *et al.*, 2009). Buckham *et al.*, (2008) publicaron que los linfocitos circulantes se adherían a las células endoteliales que cubren las paredes de los vasos sanguíneos como respuesta al incremento de los glucocorticoides durante el estrés, y posteriormente pasan de la circulación a tejidos como los ganglios linfáticos, médula ósea, bazo y piel donde son retenidos, produciendo por lo tanto una disminución del número de linfocitos circulantes.

Cuadro 10. Medias ($\pm$ EE)² de células blancas de biometría hemática de becerros alimentados con tres dietas diferentes.

Células	Día de muestreo	Tratamientos ¹			Valores de BH ³
		T1	T2	T3	
Leucocitos (10 ³ /μL)	56	7.58 $\pm$ 0.95 ^y	8.18 $\pm$ 0.95 ^y	9.65 $\pm$ 1.00 ^y	4-12
	84	9.82 $\pm$ 0.95 ^x	11.11 $\pm$ 0.95 ^x	10.80 $\pm$ 1.00 ^y	
Neutrófilos (%)	56	3.22 $\pm$ 0.76 ^b	6.67 $\pm$ 0.76 ^a	5.87 $\pm$ 0.80 ^a	15-45
	84	4.44 $\pm$ 0.76 ^a	4.22 $\pm$ 0.76 ^a	5.00 $\pm$ 0.80 ^a	
Linfocitos (%)	56	65.00 $\pm$ 4.69	73.00 $\pm$ 4.69	74.00 $\pm$ 4.97	45-75
	84	74.44 $\pm$ 4.69	76.89 $\pm$ 4.69	71.50 $\pm$ 4.97	
Cél. Mixtas (%)	56	31.78 $\pm$ 4.51	20.33 $\pm$ 4.51	20.12 $\pm$ 4.78	2-20
	84	21.11 $\pm$ 4.51	18.89 $\pm$ 4.51	23.50 $\pm$ 4.78	
Neutrófilos (10 ³ /μL)	56	0.24 $\pm$ 0.08 ^b	0.53 $\pm$ 0.08 ^a	0.61 $\pm$ 0.09 ^a	0.6-4
	84	0.43 $\pm$ 0.08 ^a	0.48 $\pm$ 0.08 ^a	0.56 $\pm$ 0.09 ^a	
Linfocitos (10 ³ /μL)	56	4.84 $\pm$ 0.92 ^y	5.99 $\pm$ 0.92 ^y	7.12 $\pm$ 0.98 ^y	2.5-7.5
	84	7.30 $\pm$ 0.92 ^x	8.73 $\pm$ 0.92 ^x	7.75 $\pm$ 0.98 ^y	
Cél. mixtas (10 ³ /μL)	56	2.49 $\pm$ 0.40	1.65 $\pm$ 0.40	1.91 $\pm$ 0.42	0-2.4
	84	2.09 $\pm$ 0.40	1.90 $\pm$ 0.40	2.49 $\pm$ 0.42	

^{ab} Medias con diferente literal en fila, son diferentes (P<0.05) entre tratamiento.

^{xy} Medias con diferente literal en columna, son diferentes (P<0.05) entre día de muestreo.

¹ T1 = Heno de avena (HA) + ensilaje de maíz (EM) + concentrado; T2 = HA + EM + concentrado + bagazo de manzana fermentado (BMZN); T3 = HA + EM + concentrado + inóculo de levaduras (IL).

² Medias sin literal en fila y columna, no mostraron diferencia (P>0.05).

³ Valores de biometría hemática de bovinos.

Cuadro 11. Medias ($\pm$ EE)² de células rojas de biometría hemática de becerros alimentados con tres dietas diferentes.

Células	Día de muestreo	Tratamientos ¹			Valores de BH ³
		T1	T2	T3	
Eritrocitos (10 ⁶ /μL)	56	5.14 $\pm$ 0.41	5.40 $\pm$ 0.41	5.32 $\pm$ 0.44	5-10
	84	5.51 $\pm$ 0.41	6.54 $\pm$ 0.41	5.92 $\pm$ 0.44	
Hemoglobina (g/dL)	56	11.45 $\pm$ 0.50	11.33 $\pm$ 0.50	11.72 $\pm$ 0.53	8-15
	84	11.20 $\pm$ 0.50	12.62 $\pm$ 0.50	11.60 $\pm$ 0.53	
Hematocrito (%)	56	38.42 $\pm$ 2.41	34.02 $\pm$ 2.41	33.77 $\pm$ 2.56	24-46
	84	33.60 $\pm$ 2.41	37.87 $\pm$ 2.41	34.80 $\pm$ 2.56	
VCM (fL)	56	73.78 $\pm$ 3.26 ^x	63.51 $\pm$ 3.25 ^x	64.09 $\pm$ 3.45 ^x	40-60
	84	61.87 $\pm$ 3.26 ^y	59.69 $\pm$ 3.25 ^x	59.31 $\pm$ 3.45 ^x	
HCM (Pg)	56	22.50 $\pm$ 0.86 ^x	21.15 $\pm$ 0.86 ^x	22.36 $\pm$ 0.91 ^x	11-17
	84	20.17 $\pm$ 0.86 ^y	19.89 $\pm$ 0.86 ^x	19.77 $\pm$ 0.91 ^y	
CHCM (g/dL)	56	31.47 $\pm$ 1.07	33.29 $\pm$ 1.07	35.35 $\pm$ 1.14	30-36
	84	33.30 $\pm$ 1.07	33.30 $\pm$ 1.07	33.30 $\pm$ 1.14	
Plaquetas (10 ⁵ /μL)	56	5.69 $\pm$ 0.37 ^x	5.67 $\pm$ 0.37 ^x	4.35 $\pm$ 0.40 ^x	1-8
	84	2.41 $\pm$ 0.37 ^y	2.70 $\pm$ 0.37 ^y	2.06 $\pm$ 0.40 ^y	

^{xy} Medias con diferente literal en columna, son diferentes (P<0.05) entre día de muestreo.

¹ T1 = Heno de avena (HA) + ensilaje de maíz (EM) + concentrado; T2 = HA + EM + concentrado + bagazo de manzana fermentado (BMZN); T3 = HA + EM + concentrado + inóculo de levaduras (IL).

² Medias sin literal en fila y columna, no mostraron diferencia (P>0.05).

³ Valores de biometría hemática de bovinos.

En otra investigación, Rodríguez (2008) reportó que ovinos engordados con manzarina en su dieta, presentaron un incremento de leucocitos (9.49 y $8.78 \times 10^3/\mu\text{L}$) al finalizar la prueba. Gallegos (2007) publicó que vacas Holstein en producción alimentadas con y sin manzarina, no presentaron efecto ($P>0.05$) en la cantidad de leucocitos en sangre.

Neutrófilos. Los tres tratamientos durante la prueba estuvieron por abajo del límite inferior de Neu en porcentaje y concentración, excepto el T3 al día 56. A pesar de este comportamiento, el T1 presentó la menor ($P<0.05$) cantidad de Neu el día 56 ($3.22\pm 0.76\%$ y $0.24\pm 0.08 \times 10^3/\mu\text{L}$), con respecto al resto de los tratamientos (Cuadro 10).

La baja cantidad de Neu tal vez se debió a la baja concentración de Zn y Mn el día 56, sin lograr alcanzar la cantidad óptima al final de la prueba a pesar del incremento de los minerales en mención. Por otra parte, aún y cuando estuvieron por abajo del límite inferior, el T1 el día 56 fue el más perjudicado con respecto al T2 y T3. Aunado a esto, se observó que los animales del T2 y T3 mostraron mayor nivel de Neu que el T1 durante la prueba. Rodríguez (2008) reportó efecto de sexo en ovinos alimentados con manzarina, donde las hembras que recibieron manzarina tuvieron mayor cantidad de neutrófilos que los machos (59.2 y 50.2 %, respectivamente) del grupo control. Por otro lado, Gallegos (2007) no encontró diferencia en vacas Holstein en producción alimentadas con y sin manzarina (34.27 y 35.98 %). Romero *et al.*, (2011) mencionaron que los neutrófilos proliferan en la circulación como respuesta a infecciones, inflamaciones y al estrés; disminuyendo en ciertas infecciones y estados de anafilaxia. Por otro lado, los glucocorticoides de animales estresados estimulan el flujo de neutrófilos desde la médula ósea hacia la sangre y reducen el paso de estos hacia otros compartimentos, generando un incremento de neutrófilos maduros e inmaduros en la circulación sanguínea (Buckham *et al.*, 2008).

Volumen corpuscular medio. Los valores de VCM de los tres tratamientos el día 56 superaron el nivel máximo dentro de la especie, así mismo, el VCM del T1 el día 84 aún y cuando fué inferior (61.87 ± 3.26 fentolitros (fL) al día 56, sobre pasó el nivel máximo (Cuadro 11).

La alta cantidad de VCM que se observó el día 56 y 84 de la prueba en el T1, tal vez le perjudicó la baja cantidad de Zn, Mn y AA, lo que pudo haber incrementado una reacción inflamatoria y anemia macrocítica. El incremento del VCM es un indicador de anemia macrocítica, mientras los eosinófilos disminuyen ante el aumento a la reacción inflamatoria (Rodostitis *et al.*, 2000). En este estudio puede ser que haya existido una disminución de la concentración de Fe por efecto de los niveles altos de Mn y Cu mostrados en esta investigación, lo que coincidió con lo publicado de Reeves *et al.*, (2004). Así mismo, Jenkins y Hiridoglou (1991) mencionaron que altas concentraciones de Mn afectan el metabolismo de Fe en bovinos, resultando en una disminución del volumen del paquete celular y de la hemoglobina, lo que reduce la capacidad de unión de Fe en suero. Por otro lado, Rodríguez (2008) encontró un comportamiento similar al adicionar manzanina en la dieta de ovinos, donde los animales suplementados disminuyeron la cantidad de VCM en comparación con el grupo testigo (32.99 y 33.57 fL) pero sin desviarse de los valores normales dentro de la especie. En otro estudio, Coppo y Mussart (2006) no encontraron efecto significativo al suplementar vaquillas con orujo de citrus en época invernal durante 90 días con respecto al grupo control (46.5 y 47.0 fL).

Hemoglobina corpuscular media. Los niveles de HCM de los tres tratamientos en los dos días de muestreo superaron el nivel máximo de referencia (Cuadro 20), el día 84 el T1 y T3 disminuyeron ($P<0.05$) con respecto al día 56 (20.17 ± 0.86 y 19.77 ± 0.91 picogramos (Pg), respectivamente), pero superaron lo reportado por Aiello y Mays, 2000. Existen reportes que la HCM indica la concentración de hemoglobina en base a la cantidad de glóbulos rojos, de manera similar a lo que indica la concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM), aunque esta última es la que se considera más adecuada. Rodríguez (2008) encontró diferencia significativa entre sexo de ovinos y muestreo, donde los machos fueron superiores a las hembras (12.74 y 12.10 Pg), así mismo, superaron el rango mayor dentro de la especie. En otro estudio, Coppo y Mussart (2006) encontraron efecto significativo al suplementar vaquillas

con orujo de citrus en época invernal durante 90 d con respecto al grupo control (16.6 y 14.5 fL, respectivamente).

Plaquetas. La cantidad de Pq de los tres tratamientos (Cuadro 11) fue mayor ($P<0.05$) el día 56 con respecto al día 84 (5.69 ± 0.37 , 5.67 ± 0.37 y $4.35\pm0.40 \times 10^3/\mu\text{L}$ para el T1, T2 y T3, respectivamente). Las Pq presentaron efecto de muestreo, el día 56 fué donde se observaron las mayores cantidades, lo que pudo deberse al incremento de anticuerpos que se observaron durante la prueba, como lo han indicado otros estudios. Aiello y Mays (2000) mencionaron que la disminución en la producción de plaquetas puede deberse a fármacos, toxinas y en algunos casos a la actividad inmunológica, debido a la producción de anticuerpos que se pueden unir a la superficie de las mismas. Los tres tratamientos mostraron la menor cantidad de Pq el día 84, debido tal vez al incremento numérico de glóbulos blancos observados. Rodríguez (2008) reportó un efecto entre sexo de ovinos y muestreo, donde los machos en el segundo muestreo fueron superiores que las hembras mostrando valores de 7.6 y $5.4 \times 10^3/\mu\text{L}$. Por otro lado, Gallegos (2007) no encontró diferencia ($P>0.05$) en la cantidad de plaquetas al suplementar vacas Holstein en producción con y sin manzanina (4.5 y $3.8 \times 10^3/\mu\text{L}$).

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Bajo las condiciones en las que se realizó este trabajo, se concluye que la adición de un inóculo de levaduras en la dieta de becerros en crecimiento aumentó el CDA y CA.

A temperaturas ambientales bajas se observó la mayor concentración de Zn en suero sanguíneo, disminuyendo el Mn y Cu el día 28. Así mismo, los becerros que recibieron BMZN e IL tuvieron mayor AA al final de la prueba. Sugerimos que este comportamiento se debió a que favorecieron a las enzimas antioxidantes y por lo tanto disminuyeron la liberación de ROS.

Los leucocitos, linfocitos, VCM, HCM y plaquetas mostraron diferencia a través de los días de muestreo. Así mismo, el T1 presentó menor cantidad de Neu en % y en μL el día 56. Estos cambios indican a que el estrés térmico ocurrido en los animales, perjudicó a las células blancas disminuyendo su cantidad e incrementando el número de células rojas.

Es recomendable que se realice más investigación con los suplementos de BMZN e IL, exponiendo a los becerros precozmente destetados a temperaturas menos estresantes.

FICHA TÉCNICA

- I. Descripción
- II. Funcionamiento
- III. Importancia del uso de Levaduras Vivas
- IV. Uso de Levaduras En La Nutrición Animal
- V. Beneficios Productivos
- VI. Valor Energético
- VII. Análisis Bromatológico
- VIII. Análisis De Minerales
- IX. Forma De Empleo
- X. Presentación
- XI. Caducidad
- XII. Almacenamiento
- XIII. Dosificación

I. ¿Qué es un aditivo de manzana?

Es un aditivo líquido de levaduras *Kluyveromyces lactis*, *Issatchenkia orientalis* y *Saccharomyces cerevisiae* 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 ADNr 18S mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés).

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).

Este aditivo aporta directamente al animal que lo consume, levaduras benéficas activas en cantidades de 1×10^8 a 1×10^9 UFC/mL con una permanencia de 48 horas en el rumen del animal que lo consume, en comparación a las levaduras comerciales, que se ofrecen liofilizadas y que requieren de la temperatura corporal del animal para activarse en lapsos de hasta 12 horas, lo que desafortunadamente el animal las excreta antes de este tiempo.

II. ¿Cómo funciona?

El aditivo de levaduras está enfocado principalmente en la reducción del uso indiscriminado de antibióticos en la producción animal, formando parte de los probióticos, prebióticos y simbióticos que se perfilan como las opciones más destacadas respecto de la utilización de antibióticos en animales y como una solución promotora de la calidad y de la seguridad alimentaria, actuando de manera directa en el sistema inmunológico del animal que lo consume, reduciendo de esta manera la frecuencia del uso de antibióticos.

El aditivo de levaduras funciona como un activador ruminal, al aportar una gran cantidad de nutrientes al ambiente ruminal, lo que favorece el crecimiento de la micro flora y micro fauna ruminal,

mejorando sustancialmente la fermentación en el rumen y con ello la digestibilidad de las fibras en las dietas de los animales, utilizando de 10 a 50 % del alimento que consumen los animales y con ello reducir los costos de producción.

III. La Importancia del Uso de Levaduras Vivas

La importancia de los cultivos vivos de levaduras es que producen enzimas, vitaminas del complejo B, minerales y diversos tipos de aminoácidos y como consecuencia, estimulan la absorción de nutrientes creando un ambiente intestinal saludable y mejorando el sistema inmune. Por otra parte, los minerales traza tales como el Zinc, Cobre y Manganese son elementos que juegan un papel importante en varias funciones corporales, necesarias para mantener una salud óptima y por lo tanto son nutrientes esenciales para todos los animales, ejercen su efecto sobre un correcto crecimiento, reproducción, rutas de secreción hormonal y respuesta inmune. Del mismo modo, los antioxidantes pueden formar parte de enzimas que directa o indirectamente protegen a las células contra los efectos adversos de numerosas drogas y sustancias carcinogénicas. La adición de antioxidantes en la dieta de animales domésticos mejora la respuesta inmune y disminuye el estrés oxidativo, generando una mayor resistencia a enfermedades infecciosas y degenerativas.

IV. Uso de Levaduras en la Nutrición Animal

Las levaduras utilizadas en la alimentación y nutrición animal son consideradas una alternativa de la alimentación denominada orgánica. Tienen grandes beneficios por su gran contenido en proteínas de alto valor biológico; vitaminas de complejo B, principalmente tiamina, riboflavina, niacina y ácido pantoténico. Además, contienen cantidades razonables de ergosterol, lo que las convierte en una excelente fuente de vitamina D.

Las levaduras mejoran notablemente el rendimiento de las proteínas, por el aporte de sus aminoácidos, en las que podemos apreciar que los niveles de lisina y metionina son sobresalientes.

En la alimentación de rumiantes, las levaduras agregadas en la dieta influyen el metabolismo microbiano ruminal y 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). 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 y tienden a incrementar el porcentaje de grasa en la leche (Putnam *et al.*, 1997), la producción de leche (Bitencour *et al.*, 2008), el consumo de materia seca (Dann *et al.*, 2000) e incluso pueden disminuir la pérdida de condición corporal después del parto (Robinson, 1997).

En no rumiantes 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).

Microorganismos que Trabajan Día y Noche

Los rumiantes poseen la capacidad de utilizar los forrajes y alimentos toscos, los cuales son poco utilizados por otras especies domésticas. Esto ocurre en el rumen gracias a la presencia de microorganismos que mediante procesos de fermentación degradan la ración consumida por la vaca generando ácidos grasos volátiles (AGV); que son la principal fuente de energía para el rumiante y los

propios microorganismos ruminales. Además estas bacterias y protozoarios aportan una cantidad muy importante de la proteína que necesitan los animales en el día a día. (Davis 1993)

Estos microorganismos son muy susceptibles a cambios naturales o inducidos como son: modificaciones en la dieta, alteraciones en el manejo, cambios de clima y presencia de enfermedades, pues todos ellos alteran las condiciones del rumen, afectando directamente el número y el tipo de microorganismos que sobrevive en el medio, lo cual afecta el uso de los alimentos que consumen y esto repercute de forma directa en el comportamiento animal (producción, sanidad y reproducción) y por lo tanto encarece o abarata los costos de producción.

Las dietas extremas a las que sometemos a nuestro ganado (carne y leche) y los cambios bruscos han llevado a los investigadores a buscar alternativas que permitan a los animales soportar mejor esas condiciones sin afectar su comportamiento productivo.

Levaduras Para Múltiples Usos

Fuller (1989); define los probióticos como microorganismos vivos que incluidos en la alimentación de los animales afecta positivamente al huésped, mejorando su sistema digestivo. Las Levaduras vivas de uso zootécnico son posiblemente el grupo de microorganismos que más se han estudiado y que mayor acogida han tenido durante las últimas dos décadas en la producción bovina.

La levadura es un microorganismo que pertenece a la familia de los hongos y es utilizado por la humanidad desde tiempos antiguos en diversas labores. Es importante aclarar que si bien todas se llaman levaduras existen miles de cepas diferentes las cuales son específicas para cada labor (panificación, destilería, producción de extractos de levadura y uso en animales) De igual manera cuando hablamos de producto para uso animal existen muchos y muy diferentes entre sí por su composición y precio, razón por la cual el productor debe hacer una elección estricta basada en algunos factores como son: Entender

cómo funcionan, características propias y calidad del producto, disponibilidad de investigación seria y reconocida donde se demuestre la funcionalidad de lo que le ofrece.

¿Cómo Funcionan y que Hacen?

El modo de acción de la levadura para uso animal tiene tres grandes principios:

1. La actividad respiratoria de la levadura (exclusivo de organismos vivos) consume el oxígeno presente en el rumen y reduce el efecto negativo que este tiene sobre la población de microorganismos estrictamente anaerobios. Trabajos de Rose (1987), y Newbold *et al.*, (1996), demostraron que al agregar levadura viva al fluido ruminal (*invitro*), la presencia de oxígeno se reduce en 46 % y 89 %; esto genera un aumento en la población de microorganismos totales del rumen cercano al 30 % (Newbold *et al.*, 1998); lo que con lleva a una mejor utilización de los alimentos, provocando un aumento en la producción de energía (Newbold *et al.*, 1996) y proteína microbiana que oscila entre 10 % y 20 % (Williams *et al.*, 1990; Erasmus 1992); la consecuencia directa de esta mejora es un incremento en la producción de leche y/o carne entre 5 y 8 %. Además el uso de levadura viva estimula de forma selectiva el crecimiento de las poblaciones de bacterias consumidoras de lactato (*Megasphaera elsdenii* y *Selenomonas ruminantium*) lo que reduce la presencia de ácido láctico, evitando así las caídas muy pronunciadas de pH ruminal, lo que disminuye la incidencia de acidosis y por lo tanto los problemas digestivos, las cojeras y los altos conteos de células somáticas asociadas a esta causa.
2. El segundo principio demostrado en diversos estudios científicos es que la presencia de levadura viva en el sistema digestivo de los animales provoca un fenómeno llamado exclusión competitiva en la cual ciertas bacterias capaces de provocar enfermedades se adhieren a la superficie de las levaduras (esto gracias a un azúcar que forma la pared de la levadura)

eliminando así una cantidad importante de microorganismos nocivos y permitiéndole al animal defenderse de forma más efectiva.

3. El tercer mecanismo ocurre gracias a un componente que se encuentra en la pared externa que se llama betaglucano, el cual estimula el sistema de defensa natural del organismo, esto a su vez permite que cuando ocurra un ataque real el animal responda rápidamente y de manera más eficiente. Esto en la práctica representa una reducción de la mortalidad, recuperación de los animales enfermos más fácilmente y en menor tiempo y una mejor notable en la salud general del hato, lo que significa aumentar la rentabilidad de la empresa.

V. Beneficios Productivos

BOVINO LECHERO:

- ❖ La levadura está viva y activada.
- ❖ Incrementos de leche y grasa en la producción lechera.
- ❖ Reduce el conteo de células somáticas.
- ❖ Mejora la palatabilidad del alimento.
- ❖ Fuente natural rica en proteínas.
- ❖ Una fuente natural de vitaminas del complejo B.
- ❖ Es un buen complemento del alimento balanceado.
- ❖ Acelera los procesos de fermentación.
- ❖ Promotor de crecimiento.
- ❖ Reduce el ácido láctico producido por la mala digestión de los alimentos.
- ❖ Estabiliza el pH rumial.
- ❖ Fortalece el sistema inmunológico.
- ❖ Reducción de células somáticas.
- ❖ Mejora la digestibilidad de los lastres de mala calidad (rastros y esquilmos agrícolas).
- ❖ Incrementa el número de protozoarios encargados de degradar las fibras.
- ❖ Acción estimulante de la inmunidad.
- ❖ Mejora la asimilación de nutrientes.
- ❖ Corrige el balance de la población microbiana.
- ❖ Actúa como activador ruminal.

BOVINO DE ENGORDA:

- ❖ La levadura está viva y activada.
- ❖ Promotor de crecimiento.
- ❖ Mayor ganancia de peso.
- ❖ Mejora la palatabilidad del alimento.
- ❖ Fuente natural rica en proteínas.
- ❖ Una fuente natural de vitaminas del complejo B.
- ❖ Buen equilibrio de aminoácidos esenciales, con niveles altos en lisina.
- ❖ Es un buen complemento del alimento balanceado.
- ❖ Acelera los procesos de fermentación.
- ❖ Reduce el ácido láctico producido por la mala digestión de los alimentos.
- ❖ Estabiliza el pH rumial.
- ❖ Fortalece el sistema inmunológico.
- ❖ Mejora la digestibilidad de los lastres de mala calidad (rastros y esquilmos agrícolas).
- ❖ Incrementa el número de protozoarios encargados de degradar las fibras.
- ❖ Mejora la asimilación de nutrientes.
- ❖ Corrige el balance de la población microbiana.
- ❖ Actúa como activador ruminal.

OVINO:

- ❖ La levadura está viva y activada.
- ❖ Promotor de crecimiento.
- ❖ Mayor ganancia de peso.
- ❖ Mejora la palatabilidad del alimento.
- ❖ Fuente natural rica en proteínas.
- ❖ Una fuente natural de vitaminas del complejo B.
- ❖ Buen equilibrio de aminoácidos esenciales, con niveles altos en lisina.
- ❖ Es un buen complemento del alimento balanceado.
- ❖ Acelera los procesos de fermentación.
- ❖ Reduce el ácido láctico producido por la mala digestión de los alimentos.
- ❖ Estabiliza el pH rumial.
- ❖ Fortalece el sistema inmunológico.
- ❖ Mejora la digestibilidad de los lastres de mala calidad (Rastrojos y esquilmos agrícolas).
- ❖ Incrementa el número de protozoarios encargados de degradar las fibras.
- ❖ Mejora la asimilación de nutrientes.
- ❖ Corrige el balance de la población microbiana.
- ❖ Actúa como activador ruminal.

CAPRINO:

- ❖ La levadura está viva y activada.
- ❖ Incrementos de leche y grasa en la producción lechera.
- ❖ Promotor de crecimiento.
- ❖ Mayor ganancia de peso.
- ❖ Mejora la palatabilidad del alimento.
- ❖ Fuente natural rica en proteínas.
- ❖ Una fuente natural de vitaminas del complejo B.
- ❖ Buen equilibrio de aminoácidos esenciales, con niveles altos en lisina.
- ❖ Es un buen complemento del alimento balanceado.
- ❖ Acelera los procesos de fermentación.
- ❖ Reduce el ácido láctico producido por la mala digestión de los alimentos.
- ❖ Estabiliza el pH rumial.
- ❖ Fortalece el sistema inmunológico.
- ❖ Mejora la digestibilidad de los lastres de mala calidad (Rastrojos y esquilmos agrícolas).
- ❖ Incrementa el número de protozoarios encargados de degradar las fibras.
- ❖ Mejora la asimilación de nutrientes.
- ❖ Corrige el balance de la población microbiana.
- ❖ Actúa como activador ruminal.

PORCINO:

- ❖ La levadura está viva y activada
- ❖ Mejores camadas en cerdos
- ❖ Reduce el exceso de amoníaco en cerdos
- ❖ Promotor de crecimiento
- ❖ Mayor ganancia de peso
- ❖ Mejora la palatabilidad del alimento
- ❖ Fuente natural rica en proteínas
- ❖ Una fuente natural de vitaminas del complejo B
- ❖ Buen equilibrio de aminoácidos esenciales, con niveles altos en lisina
- ❖ Es un buen complemento del alimento balanceado
- ❖ Acelera los procesos de fermentación
- ❖ Fortalece el sistema inmunológico
- ❖ Aumenta la producción de leche materna
- ❖ Mejora la asimilación de nutrientes

Cerdas en Gestación:

1. Optimizar la producción lechera de la cerda durante toda la lactación.
2. Mayor peso del lechón al destete con la menor pérdida posible de condición corporal de la cerda reproductora.
3. Reduce el porcentaje de Mortinatos.
4. Reduce la mortalidad de lechones durante lactación.

Cerdos en General:

1. Reduce el nivel de estrés en los cerdos después de la vacunación. Evitando la inmunodepresión.
2. Es uno de los principales nutrientes para la eficiencia reproductiva en los cerdos tanto machos como hembras.
3. Aumenta la inmunidad, por lo tanto, animales más sanos.
4. Mejora la calidad del canal. Calidad de canal: se ha observado que la carne de los cerdos alimentados con levadura pierde menor cantidad de agua en el transcurso de 29 horas; y los consumidores manifiestan que la carne es más jugosa y tierna.

AVES:

- ❖ La levadura está viva y activada.
- ❖ En gallinas en postura, incrementa el nivel de proteína del huevo.
- ❖ Ayuda a obtener un huevo con un cascaron más resistente.
- ❖ Promotor de crecimiento.
- ❖ Mayor ganancia de peso.
- ❖ Ayuda mantener una pluma más saludable y con más brillo.
- ❖ Mejora la palatabilidad del alimento.
- ❖ Fuente natural rica en proteínas.
- ❖ Una fuente natural de vitaminas del complejo B.
- ❖ Reduce la pérdida de energía.
- ❖ Aumenta la digestibilidad de los nutrientes.
- ❖ Fortalece el sistema inmunológico.
- ❖ Mantiene el consumo durante los meses cálidos.
- ❖ Reduce los problemas entéricos relacionados con condiciones de stress.
- ❖ Sustituye promotores de crecimiento convencionales (antibióticos)

CONEJO:

- ❖ La levadura está viva y activada.
- ❖ Promotor de crecimiento.
- ❖ Mayor ganancia de peso.
- ❖ Aumenta la producción de leche materna.
- ❖ Ayuda mantener un pelaje más saludable y con más brillo.
- ❖ Mejora la palatabilidad del alimento.
- ❖ Fuente natural rica en proteínas.
- ❖ Una fuente natural de vitaminas del complejo B.
- ❖ Reduce la pérdida de energía.
- ❖ Aumenta la digestibilidad de los nutrientes.
- ❖ Fortalece el sistema inmunológico.
- ❖ Reduce los problemas entéricos relacionados con condiciones de stress.
- ❖ Sustituye promotores de crecimiento convencionales (antibióticos)

EQUINO

- ❖ La levadura está viva y activada.
- ❖ Promotor de crecimiento.
- ❖ Ayuda mantener un pelaje más saludable y con más brillo.
- ❖ Mejora la palatabilidad del alimento.
- ❖ Fuente natural rica en proteínas.
- ❖ Una fuente natural de vitaminas del complejo B.
- ❖ Reduce la pérdida de energía.
- ❖ Aumenta la digestibilidad de los nutrientes.
- ❖ Fortalece el sistema inmunológico.
- ❖ Reduce los problemas entéricos relacionados con condiciones de stress.
- ❖ Ayuda con los trastornos digestivos en los caballos. Como ejemplo: el cólico y el riesgo de laminitis.
- ❖ Aumentos significativos en las ganancias de peso y la altura a la cruz.
- ❖ La suplementación con concentrados de levadura viva contribuye a mejorar el rendimiento de caballos sometidos a ejercicio intenso.
- ❖ En yeguas, se ha determinado una mayor producción de leche para el potrillo durante el amamantamiento.
- ❖ Mejora la asimilación de nutrientes.
- ❖ Acelera los procesos de fermentación.
- ❖ Estudios han demostrado un 8-10 % de aumento en la digestibilidad de la fibra en animales adultos, y mejoras en la retención de nitrógeno (un indicador de la mejor digestión de la proteína) y una disminución en la cantidad de nitrógeno, en forma de amonio, excretada en la orina.

IV. Valor Energético

Energía Digestible (Mcal/kg)	0.47
Energía Metabolizable (Mcal/Kg)	0.44
Energía Aves (Mcal/Kg)	0.43
Energía Metab. Rumiantes (Mcal/Kg)	0.39
Energía Mantenimiento (Mcal/Kg)	0.02
Energía Ganancia (Mcal/Kg)	0.70
Energía Lactación (Mcal/Kg)	0.14

V. Análisis Bromatológico

Rumiantes, Cerdos, Aves, Conejos.

	Base Seca	Base Humedad
Proteína	23.45 %	4.08 %
Grasa	0.02 %	0.00 %
Fibra	0.00 %	0.00 %
Ceniza	16.69 %	2.91 %
Humedad		82.58 %
E.L.N.		10.43 %

Caballos

	Base Seca	Base Humedad
Proteína	16.19 %	2.50 %
Grasa	0.13 %	0.02 %
Fibra	0.00 %	0.00 %
Ceniza	15.76 %	2.43 %
Humedad		84.57 %
E.L.N.		10.48 %

VI. Análisis De Minerales.

MUESTRA: LEVADURAS, Caballo

ANALISIS MACROELEMENTOS RESULTADO

PH	3.99
Fosforo	Mg/L 0.0
Calcio	Ppm 1,980
Magnesio	Ppm 2,800
% Nitrógeno	0.27
Zinc	Ppm 5.6
Cobre	Ppm 2.07

MUESTRA: LEVADURAS, Rumiante, Cerdos, Aves, Conejo

ANALISIS MACROELEMENTOS RESULTADO

PH	3.96
Fosforo	Mg/L 0.0
Calcio	Ppm 1890
Magnesio	Ppm 2250
% Nitrógeno	0.70
Zinc	Ppm 5.6
Cobre	Ppm 1.89

VII. Forma De Empleo

- Mezclar en el alimento, durante su elaboración, o Mezclar en el alimento directamente al comedero, carro mezclador.
- Agitar antes de mezclar con el alimento.

VIII. Presentación

- Es un aditivo **LÍQUIDO** de levaduras.
- “Rumiante, Cerdo, Aves”, levadura elaborada especialmente para consumo de rumiantes, cerdos, aves, y conejo.
- “Caballo”, levadura elaborada especialmente para consumo del Caballo.

IX. Caducidad.

- Tiene aproximadamente 4 **MESES** de vida a partir de la fecha de la elaboración.

X. Almacenamiento

- Conservar en un contenedor de **PLASTICO**.
- **NUNCA** almacenar en contenedores de fierro.
- Mantener en un lugar fresco, protegido de la luz solar.
- Mantener alguna entrada de oxígeno, necesario para la sobrevivencia de la levadura.
- En cantidades mayores es necesario adaptar un sistema de inyección de aire al contenedor.

XI. Dosificación

- *Se puede emplear en todas las etapas del animal, destete en adelante.*

mL-Mililitros

lts- Litros

C- Concentrado

L-Lastre

Rumiante:

- **Bovino Lechero**
 - Directamente al comedero, o carro mezclador.
 - 50-100 mL x kilo de alimento terminado. (C y L)
 - 50-100 lts. x tonelada de alimento terminado. (C y L)
 - Al manejar silo (con bastante humedad) reducir las dosis al 50 %.
- **Bovino de Engorda**
 - Directamente al comedero, o carro mezclador.

- 50-100 mL x kilo de alimento terminado. (C y L)
 - 50-100 lts. x tonelada de alimento terminado.(C y L)
 - Al manejar silo (con humedad) reducir las dosis 50 %.
- **Ovino**
 - **Directamente al comedero, o carro mezclador.**
 - **Iniciador:** 25-50 mL x kilo de alimento terminado. (C y L)
25-50 lts x tonelada de alimento terminado (C y L)
 - **Engorda:** 50-100 mL x kilo de alimento terminado (C y L)
50-100 lts x tonelada de alimento terminado (C y L)
 - **Gestación/ Lactancia:** 50-100 mL x kilo de alimento terminado (C y L)
50-100 lts x tonelada de alimento terminado
 - **Caprino:**
 - **Directamente al comedero, o carro mezclador.**
 - **Iniciador:** 25-50 mL x kilo de alimento terminado. (C y L)
25-50 lts x tonelada de alimento terminado (C y L)
 - **Engorda:** 50-100 mL x kilo de alimento terminado (C y L)
50-100 lts x tonelada de alimento terminado (C y L)
 - **Gestación y Lactancia:** 50-100 mL x kilo de alimento terminado (C y L)
50-100 lts x tonelada de alimento terminado (C y L)
 - **Lechero:** 50-100 mL x kilo de alimento terminado (C y L)
50-100 lts x tonelada de alimento terminado (C y L)

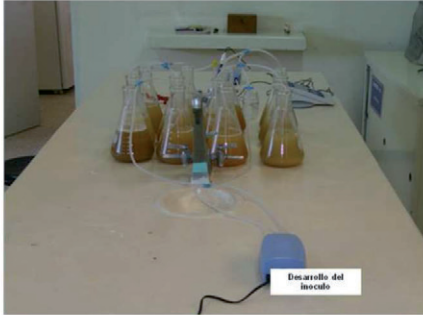
Monogástrico:

- **Porcino:**
 - **Pre- Iniciador:** 20 mL x kilo de alimento terminado (C)
20 lts x tonelada de alimento terminado (C)
 - **Iniciador:** 25 mL x kilo de alimento terminado (C)
25 lts x tonelada de alimento terminado (C)
 - **Crecimiento y Desarrollo :** 30 mL x kilo de alimento terminado (C)
30 lts x tonelada de alimento terminado (C)
 - **Engorda :** 40 mL x kilo de alimento terminado (C)
40 lts x tonelada de alimento terminado (C)

- **Gestación y Lactancia :** 40 mL x kilo de alimento terminado (C)
40 lts x tonelada de alimento terminado (C)
- **Gallinas Postura:** 25 mL x kilo de alimento terminado (C)
25 lts x tonelada de alimento terminado (C)
- **Pollo de engorda:**
 - **Iniciador :** 20 mL x kilo de alimento terminado (C)
20 lts x tonelada de alimento terminado (C)
 - **Engorda:** 25 mL x kilo de alimento terminado (C)
25 lts x tonelada de alimento terminado (C)
- **Conejo:** 25 mL x kilo de alimento terminado (C)
25 lts x tonelada de alimento terminado (C)
- **Caballo:**
 - 100ml x comida, dependiendo de la actividad física del caballo.
- **Alimento encostalado** (Dosificación para plantas de alimento) Con un tiempo de almacenamiento de varios días.
 - 10-15 litros x tonelada de Alimento terminando

Nota: Patente en trámite.

DESARROLLO DEL ADITIVO DE LEVADURAS



DISEÑO Y USO DEL FERMENTADOR



Piezas	Concepto	Precio unitario	Total
2	Tinaco Plastinack de 1, 100 Lts	1,100	2,200
1	Motor de 1/2 H.P. Evans	1,080	1,080
1	Venturi 1"	450	450
6	Llaves de 1" Bronce	99	594
12	Codos 1" PVC	5	60
8	Mts. Tubo PVC hidráulico	13.5	108
2	Conectores para tinaco de 1"	40	80
1	Nudo de 1"	25	25
1	Cruceta de 1"	20	20
1	Temporizador	95	95
4	Cople T de 1"	7	28
Total con IVA			\$4,800.00



Piezas	Concepto	Precio unitario	Total
2	Tinaco Industrial de 10,000 Lts	17,000	34,000
2	Motor de 1 H.P. Evans	1,550	3,100
2	Venturi 1"	450	900
6	Llaves de 1" Bronce	99	594
12	Codos 1" PVC	5	60
24	Mts. Tubo PVC hidráulico	13.5	324
2	Conectores para tinaco de 1"	40	80
2	Nudo de 1"	25	50
2	Temporizador	95	190
6	Cople T de 1"	7	196
Total con IVA			\$39,494.00

PREPARACIÓN DEL ADITIVO DE LEVADURAS DE MANZANA

Esta Innovación tecnológica tiene como fin ayudar a los ganaderos a reducir sus costos de producción, mejorar el sistema inmunológico de los animales y producir carne, leche y huevo de una manera segura y con calidad al estar libres de antibióticos.

Esta tecnología está diseñada para que el productor la pueda implementar de una manera segura en su granja o en su planta de alimentos y producir el mismo el aditivo.

Para producir 1,000 litros de aditivo necesita el productor 10 litros de la cepa de levadura concentra (secreto industrial) que es lo que se le vendería al productor, 200 kg de melaza de caña 10 kg de urea, 500 gr de sulfato de amonio y aforar con agua limpia, esta parte es la que el productor tendrá que realizar.

La fermentación dura 96 horas, durante este tiempo es necesario la oxigenación del medio de cultivo a través de un sistema de inyección de aire cada 4 horas 15 minutos de aireación, después de las 96 horas solo es necesario la oxigenación cada 8 horas por 15 minutos.

Proceso

El costo del aditivo está pensado y diseñado para que no supere el precio de 2.50 pesos el litro con una producción mínima de levaduras por mL de 800, 000,000 de células vivas y activadas. Las levaduras que se adquieren comercialmente oscilan entre 200 y 500 peso el kg lo que deja de ser atractivo para el ganadero y se limita a solo utilizar de 1 a 2 kg por tonelada de alimento balanceado.

Como se activa la levadura en los animales.

Las levaduras liofilizadas son incluidas en el alimento de los animales, su proceso de activación es a través de la humedad y la temperatura corporal 29 °C y el tiempo de activación dura entre 6 y 8 horas, lo que el animal las excreta antes de este tiempo con un porcentaje muy bajo de colonización. Es importante aclarar que cada cepa de levadura actúa y se activa a diferentes temperaturas, según la cepa.

La gran ventaja que tiene una levadura liofilizada es que la trasportación es más fácil y la vida de anaquel es más larga hasta 1 año.

Levadura de manzana.

Para empezar la manzana requiere horas frio para producir la fruta, esto es lo interesante, utilizamos cepas de esta fruta porque son cepas autóctonas de la fruta lo que favorece su fermentación con temperaturas de 17 °C, algo que no ocurre con otras levaduras ya que en promedio requieren 27 °C para poder fermentar.

La innovación de este aditivo se centra en lo siguiente utilizamos cepas autóctonas para favorecer su fermentación en temperaturas frescas, utilizamos la melaza de caña por contener 90 grados brix, azúcar que requiere la levadura para reproducirse cada 40 minutos, utilizamos un tinaco como fermentador y una bomba eléctrica y un Venturi para oxigenar el medio de cultivo, el tinaco es por así decirlo el estómago de la vaca donde desarrollamos la levadura viva, cuando nosotros ofrecemos 100 ml por cada kg de alimento que la vaca consume, la levadura entra directamente a ser su función y no requiere que se active con la temperatura corporal de la vaca dado que está viva y en concentraciones de 8×10^8 UFC.

Costo financiero para fermentar el aditivo liquido de levaduras de manzana

Litros requeridos de Cepa de levadura	Costo	Contenedor en litros (tinaco)	Producción/mes
10	1,300	1,000	4,000
20	2,600	2,000	8,000
50	6,500	5,000	20,000
100	13,000	10,000	50,000

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aiello, S. E. y A. Mays. 2000. El Manual Merck de Veterinaria. 5ta ed. Océano Grupo Editorial, S. A. España.
- Aksu, T., B. Özsoy, D. S. Aksu, M. A. Yörük y M. Gül. 2011. The effects of lower levels of organically complexed zinc, copper and manganese in broiler diets on performance, mineral concentration of tibia and mineral excretion. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 17: 141-146.
- 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).
- 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.
- 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.
- Arias, R. A. 2006. Environmental factors affecting daily water intake on cattle finished in feedlots. Master Thesis, University of Nebraska-Lincoln, Nebraska, E. U. A.
- Arias, R. A., T. L. Mader y P. C. Escobar. 2008. Factores climáticos que afectan el desempeño productivo del ganado bovino de carne y leche. *Arch. Med. Vet.* 40:7-22.
- Arredondo, M., P. Munoz, C. V. Mura y M. Nunez. 2003. DMT1, a physiologically relevant apical Cu¹⁺ transporter of intestinal cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 284:C1525-C1530.
- Barquinero, J. 1992. Los Radicales Libres: Una Amenaza para la Salud. En: Crystal, R. G. y J. R. Ramon. 1992. Sistema GSH. Glutación: Eje de la Defensa Antioxidante. Excerpta Médica. Medical Communications B. V., Amsterdam. Reino de los Países Bajos.
- Barrio, M., M. C. Correa y M. E. Jiménez. 2003. El hemograma: análisis e interpretación de valores sanguíneos. Universidad de Antioquia, Medellín. Colombia.
- 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., C. Rodríguez, J. Jiménez, O. Ruiz, A. Elías y A. Ramírez. 2008. Urea y maíz en la fermentación aeróbica de bagazo de manzana para la producción de proteína. *TECNOCENCIA Chihuahua.* 2:7-14.

- Benzie, I. F. F. y J. J. Strain. 1996. Ferric reductive ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the frap assay. *Anal. Biochem.* 239:70-76.
- Biricik, H. y İ. İ. Türkmen. 2001. The effect of *Saccharomyces cerevisiae* on *in vitro* rumen digestibilities of dry matter, organic matter and neutral detergent fiber of different forage:concentrate ratios in diets. *J. Fac. Vet. Med.* 20:29-37.
- Blackmon, D. M., W. J. Miller y J. D. Morton. 1967. Zinc deficiency in ruminants, occurrence, effects, diagnosis, and treatments. *Vet. Med.* 62:265-272.
- Blanco, M., I. Casasús y J. Palacio. 2009. Effect of age at weaning on the physiological stress response and temperament of two beef cattle breeds. *Animal.* 3:108-117.
- 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. Technol.* 40: 109-119.
- Bontempo, V., A. Giancamillo, G. Savoini, V. Dell'Orto y C. Domeneghini. 2006. Live yeast dietary supplementation acts upon intestinal morpho-functional aspect and growth in weaning piglet. *Anim. Feed Sci. Technol.* 129:224-236.
- 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.
- Buckham Sporer, K. R., P. S. D. Weber, J. L. Burton, B. Earley y A. Crowe. 2008. Transportation of young beef bulls alters circulating physiological parameters that may be effective biomarkers of stress. *J. Anim. Sci.* 86:1325-1334.
- 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.
- 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.
- 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).
- 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.

- Castillo, C., J. Hernández, M. García Vaquero, M. López Alonso, V. Pereira, M. Miranda, I. Blanco y J. L. Bedito. 2012. Effect of moderate Cu supplementation on serum metabolites, enzymes and redox state in cattle. *Int. J. Biometeorol.* 55:741-748.
- Castro M. Rodríguez F. 2005. Probióticos y prebióticos que mejoran la producción animal. *Rev. Corpoica.* 1: 1-27.
- Ceballos, A., F. Wittwer, P. A. Contreras y T. M. Böhmwald. 1998. Actividad sanguínea de glutatión peroxidasa en rebaños lecheros a pastoreo: variación según y época del año. *Arch. Med. Vet.* 30:13-22.
- Cerone, S. I., A. S. Sansinanea, S. A. Streitenberg, M. C. García y N. J. Auza. 2000. Bovine monocyte-derived macrophage function in induce copper deficiency. *Gen Phy Biophys.* 19:49-58.
- Chae, B. J., J. D. Lohakare, W. K. Moon, S. L. Lee, Y. H. Park y T. W. Hahn. 2006. Effects of supplementation of beta-glucan on the growth performance and immunity in broilers. *Res. Vet. Sci.* 80:291-298.
- Champagne, C. P., N. J. Gardner y D. Roy. 2005. Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 45:61-84.
- Chandra, R. K. 1999. Nutrition and immunology: From the clinic to cellular biology and back again. *Proc. Nutr. Soc.* 58:681-683.
- 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.
- Chaucheyras-Durand, F. y G. Fonty. 2001. Establishment of cellulolytic bacteria and development of fermentative activities in the rumen of gnotobiotically-reared lambs receiving the microbial additive *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-1077. *Reprod. Nutr. Dev.* 41:57-68.
- Chew, P. B. 1995. Antioxidant vitamins affect food animal immunity and health. *J. Nutr.* 125: 1804S-1808S.
- Chung, Y. H., N. D. Walker, S. M. McGinn y K. A. Beauchemin. 2011. Differing effects of 2 active dried yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) strains on ruminal acidosis and methane production in nonlactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 94:2431-2439.
- Cole, A., Purdy, W. y Hutcheson, P. 1992. Influence of yeast culture on feeder calves and lambs. *J. Anim. Sci.* 70:1682-1690.
- Comitini, F., R. Ferretti, F. Clementi, I. Mannazzu y M. Ciani. 2005. Interaction between *Saccharomyces cerevisiae* and malonic bacteria: preliminary characterization of a yeast proteinaceous compounds active against *Oenococcus oeni*. *J. Appl. Microbiol.* 99:105-111.

- Coppo, J. A. y N. B. Mussart. 2006. Orujo de citrus como suplemento invernal de vaquillas cruza cebú en Argentina. Vol. VII, No. 04, Abril.
- Cuesta, M. M., D. J. R. García, P. E. A. Silveira y G. Y. Pino. 2011. Administración parenteral de un compuesto de zinc, cobre y manganeso en vacas lecheras. Revista Electrónica de Veterinaria. 12:28-36.
- Czarnecki-Maulden, G. L. 2008. Effect of dietary modulation of the intestinal microbiota on reproduction and early growth. Theriogenology 70:286-290.
- Dalmo, R. A. y J. Bogwald. 2008. Beta-glucans as conductors of immune symphonies. Fish Shellfish Immunol. 25:384-396.
- 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.
- Dehority, B.A. 2003. Rumen Microbiology. Nottingham University Press. 19-43.
- Delfino, J. G. y G. W. Mathison. 1991. Effects of cold environment and intake level on the energetic efficiency of feedlot steers. J. Anim. Sci. 69:4577-4587.
- Desnoyers, M., S. Giger-Reverdin, G. Bertin, C. Duvaux-Ponter y D. Sauvant. 2009. Metaanalysis of the influence of *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on ruminal parameters and milk production of ruminants. J. Dairy Sci. 92:1620-1632.
- Dewhurst, R.J., Davues, D.R. y Merry, R.J. 2000. Microbial protein supply from the rumen. Anim. Feed. Sci. Techno. 85: 1-21.
- Di Criscio, T., A. Fratianni, R. Mignogna, L. Cinquanta, R. Coppola, E. Sorrentino y G. Panfili. 2010. Production of functional probiotic, prebiotic and synbiotic ice creams. J. Dairy Sci. 93:4555-4564.
- 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. Chih. Mex.
- 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.

- Dorton, K. L., T. E. Engle, R. M. Enns y J. J. Wagner. 2007. Effects of trace mineral supplementation, source, and growth implants on immune response of growing and finishing feedlot steers. *The Professional Animal Scientist*. 23:29-35.
- Droker, A. E. y J. W. Spears. 1993. *In vitro* and *in vivo* immunological measurements in growing lambs fed diets deficient, marginal or adequate in zinc. *J. Nutr. Immunol.* 2:71-90.
- Elias, 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. Agric.* 28:319-325.
- Ferket, P. R. 2003. Controlling gut Health with the Use of Antibiotics. Pag. 57-68 in *Proc. 30th Annu. Carolina Poultr. Nutr. Conf., Research Triangle Park, NC. North Carolina State University, Raleigh. E. U. A.*
- Franklin, S. T., M. C. Newman, K. E. Newman y K. I. Meek. 2005. Immune parameters of dry cows fed mannan oligosaccharide and subsequent transfer of immunity to calves. *J. Dairy Sci.* 88:766-775.
- Gallegos A, M. A. 2007. Cuento 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).
- 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.
- Glade, M. J. y L. M. Biesik. 1986. Enhanced N retention in yearling horses supplemented with yeast culture. *J. Anim. Sci.* 62: 1635-1640.
- González-San José, M. L., R. P. Muñoz y V. B. Valls. 2001. Actividad antioxidante de la cerveza: estudios *in vitro* e *in vivo*. Centro de información cerveza y salud. Departamento de biotecnología y ciencia de los alimentos. Universidad de Burgos. Departamento de pediatría, ginecología y obstetricia. Universidad de Valencia. España.
- Gooneratne, S. R., W. T. Buckley y D. A. Christensen. 1989. Review of copper deficiency and metabolism in ruminants. *Can J Anim Sci.* 69:819-845.
- Grace, N. D. 1973. Effect of high dietary Mn levels on the growth rate and the level of minerals elements in the plasma and soft tissues of sheep. *New Zeal J. Agric. Res.* 16:177-180.

- Gupta, S., B. Earley y M. A. Crowe. 2007. Effect of 12-hour road transportation on physiological, immunological and hematological parameters in bull housed at different space allowances. *Vet. J.* 173:605-616.
- Gutiérrez P. F. J. 2007. Efecto de la manzanina 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. Lindegren. 1953. A method for determining the weight of an individual yeast cell. *Appl. Microbiol.* 1:153-156.
- Halliwell, B. 1992. Especies Reactivas de Oxígeno en los Seres Vivos: Procedencia, Bioquímica y Papel Patógeno en el Hombre. En: Cristal, R. G. y J. R. Ramon, 1992. Sistema GSH. Glutación: Eje de la Defensa Antioxidante. Excerpta Médica. Medical Communications B. V., Amsterdam. Reino de los Países Bajos.
- Halliwell, B. y M. Whiteman. 2004. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and cell culture: how should you do it and what do the results mean. *Br. J. Pharmacol.* 142:231-255.
- Hambridge, K. M., C. E. Casey y N. F. Krebs. 1986. Zinc. In trace elements in human and animal nutrition. 5th ed. Walter Mertz. Academic Press. Inc., Londres. Reino Unido.
- 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.
- Hernández, G. C. 2008. Cinética de fermentación *in vitro*, comportamiento productivo y características de la canal de ovinos engordada con y sin manzanina. Tesis de maestría. Facultad de Zootecnia y Ecología. Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua. México.
- 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).
- Huerta, J. M., M. E. C. Ortega y M. P. Cobos. 2005. Estrés oxidativo y el uso de antioxidantes en animales domésticos. *Revista de Ciencia y Tecnología de America.* 30:728-734.
- INAFED. 2010. Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal. <http://www.inafed.gob.mx/work/templates/enciclo/chihuahua/>. Consultado en Septiembre 10, 2014.
- Ingladew, 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, M. y C. M. Grieve. 1976. Effects of zinc, copper and manganese supplementation of high-concentrate ratio non gastrointestinal absorption of copper and manganese in Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 59:1764-1768.

- 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 wall content on performance of Holstein cows. *J. Dairy. Sci.* 88: 244-254.
- James, S. J., M. Swendseid y T. Makinodan. 1987. Macrophage-mediated depression of T-cell proliferation in zinc-deficient mice. *J. Nutr.* 117:1982-1988.
- Jenkins, K. J. y M. Hidiroglou. 1991. Tolerance of the preruminant calf for excess manganese or zinc in milk replacer. *J. Dairy Sci.* 74:1047-1053.
- Jensen, G. S., K. M. Patterson y I. Yoon. 2008. Nutritional yeast culture has specific anti-microbial properties without affecting healthy flora. Preliminary results. *Anim. Feed Sci. Technol.* 17:247-252.
- Jiménez, A., E. Planells, P. Aranda, M. Sánchez-Viñas y J. Llopis. 1997. Changes in bioavailability and tissue distribution of copper caused by magnesium deficiency in rats. *J. Agric. Food Chem.* 45:4023-4027.
- 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).
- 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.
- 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).
- Lema, M., L. Williams y D. R. Rao. 2001. Reduction of fecal shedding of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in lambs by feeding microbial feed supplement. *Small Rumin. Res.* 39:31-39.
- Li, J., D. F. Li, J. J. Xing, Z. B. Cheng y C. H. Lai. 2006. Effects of beta-glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae* on growth performance, and immunological and somatotropic responses of pigs challenged with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *J. Anim. Sci.* 84:2374-2381.
- 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 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.
- Magalhães, V. J. A., F. Susca, F. S. Lima, A. F. Branco, I. Yoon y J. E. P. Santos. 2008. Effect of feeding yeast culture on performance, health, and immunocompetence of dairy calves. *J. Dairy Sci.* 91:1497-1509.
- Makino, T. y K. Takahara. 1981. Direct determination of plasma copper and zinc in infants by atomic absorption with discrete nebulization. *Clin. Chem.* 27:1445-1447.
- 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 D. J. Nisbet. 1992. Effect of direct fed microbials on rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.* 75:1736.
- McDonald, P., R. A. Edwards, J. F. D. Greenhalgh, y C. A. Morgan. 2002. *Animal Nutrition*. 6th edition. Pearson Education. U.S.A.
- McDowell, L. R. 2003. *Minerals in Animal and Human Nutrition*, 2a ed. Elsevier Science B. V., Amsterdam, The Netherlands. Reino de los Países Bajos.
- McDowell, L. R. y J. D. Arthington. 2005. *Minerales para Ruminantes en Pastoreo en Regiones Tropicales*. 4ta. ed. Dep. Zoot. Universidad de Florida. Gainesville. IFAS. E. U. A.
- Menke, K. H. y H. Steingass. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Anim. Research Develop.* 28:7-55.
- Menke, K. H., L. Raab, A. Salewski, H. Steingass, D. Fritz y W. Schneider. 1979. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. *J. Agric. Sci. Camb.* 93:217-222.
- Mertz, W. y G. K. Davis. 1987. Copper. In: Mertz W, editor. *Trace Elements in Human and Animal Nutrition*. Vol I. 5th ed. Philadelphia: Academic Press. E. U. A.
- 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).

- Mujibi, F. D. N., S. S. Moore, D. J. Nkrumah, Z. Wang y J. A. Basarab. 2010. Season of testing and its effect on feed intake and efficiency on growing beef cattle. *J. Anim. Sci.* 88: 3789-3799.
- Murphy, E. A., J. M. Davis, A. S. Brown, M. D. Carmichael, A. Ghaffar y E. P. Mayer. 2007. Oat β -glucan effects on neutrophil respiratory burst activity following exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* 39:639-644.
- Murray, R. K., D. K. Granner, P. A. Mayes y V. W. Rodwell. 2000. *Harper's Biochemistry*. 25th ed. p 135, 223. McGraw Hill Health Professional Division, New York. E. U. A.
- Newbold, C. J. y L. M. Rode. 2006. Dietary Additives to Control Methanogenesis in the Rumen. Pages 138-147 in *Greenhouse Gases and Animal Agriculture: An update*. Elsevier, Amsterdam. The Netherlands. Reino de los Paises Bajos.
- Newbold, C. J., R. J. Wallace y F. M. McIntosh. 1996. Mode of action of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a feed additive for ruminants. *British J. Nutr.* 76:249-251.
- 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.
- Nocek, J. E., M. G. Holt y J. Oppy. 2011. Effects of supplementation with yeast culture and enzymatically hydrolyzed yeast on performance of early lactation dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 94:4046-4056.
- NRC. 1996. *Nutrient Requirements of Beef Cattle*. 7th ed. National Academy Press, Washington, DC. E. U. A.
- 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.
- Ofek, I., D. Mirelman y N. Sharon. 1977. Adherence of *Escherichia coli* to human mucosal cells mediated by mannose receptors. *Nature*. 265:623-625.
- Peñaloza, 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.
- Piomelli, S., V. Jansen y F. Dancis. 1973. The hemolytic anemia of magnesium deficiency in adult rats. *Blood*. 41:451-459.
- Planells, E., P. Aranda, A. Lerma y J. Llopis. 1994. Changes in bioavailability and tissue distribution of zinc caused by magnesium deficiency in rats. *Brit. J. Nutr.* 72:315-323.
- Prior, R. L. y G. Cao. 1999. *In vivo* total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radic Biol Med.* 27:1173-1181.

- 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.
- Quiroz-Rocha, G. F. y J. Bouda. 2001. Fisiopatología de las deficiencias de cobre en rumiantes y su diagnóstico. *Vet. Méx.* 32:289-296.
- 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.
- Reed, G. y T. Nagodawithana. 1991. *Yeast Technology*. 2a ed. AVI, Van Nostrand Reinhold Publ. New York. E. U. A.
- Reeves, P. G., N. V. C. Ralston, J. P. Idso y H. Lukaski. 2004. Contrasting and cooperative effects of copper and iron deficiencies in male rats fed different concentrations of manganese and different sources of sulfur amino acids in an AIN-93G-based diet. *J. Nutr.* 134:416-425.
- 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.
- Robinson, P. H. 1997. Effect of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on adaptation of cows to diets postpartum. *J. Dairy. Sci.* 80:1119-1125.
- Rodostitis, O. M., C. C. Gay, D. C. Blood y K. W. Hinchliff. 2000. *Veterinary Medicine*, 9th ed. Harcourt Publisher, Londres. Reino Unido.
- 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, R. H. E. 2008. Obtención de Manzanarina a Partir de Subproductos de Manzana y su Efecto Sobre la Salud de Borregos en Engorda. Disertación Doctoral. Facultad de Zootecnia y Ecología. Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua. Chih. Mex.
- 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-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. Cubana de Cien. Agríc, 44:23-26.
- Romero, P. M. H., L. F. Uribe-Velásquez y V. J. A. Sánchez. 2011. Biomarcadores de estrés como indicadores de bienestar animal en ganado de carne. Biosalud. 10:71-87.
- Rook, G. A. y L. R. Burnet. 2005. Microbes, immunoregulation and the gut. Gut. 54:317-320.
- Rose, A. H. 1987a. Yeast culture a microorganism for all especies a theoretical look at its mode of action. Proceedings. Alltech's third annual symposium. Biotechnology in the Feed Industry. Nicholasville, 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.
- Sánchez, B., C. G. De Los Reyes-Gavilán, A. Margolles y M. Gueimonde. 2009. Probiotic fermented milks: Present and future. Int. J. Dairy Technol. 62:472-483.
- Sanchez-Morito, N., E. Planells, P. Aranda y J. Llopis. 1999. Magnesium-Manganese Interactions Caused by Magnesium Deficiency in Rats. J. Am. Coll. Nutr. 18:475-480.
- 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.
- Solaiman, S. G., T. J. Craig Jr., G. Reddy y C. E. Shoemaker. 2007. Effect of high levels of Cu supplement on growth performance, rumen fermentation, and immune responses in goats kids. Small Rumin. Res. 69:115-123.
- Sorg, O. 2004. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality?. C. R. Biol. 327:649-662.
- Spears, J. W. 2000. Micronutrients and immune function in cattle. Proc. Nutr. Soc. 59:587-594.
- Spears, J. W. 2003. Trace mineral bioavailability ruminants. J. Nutr. 133:1506-1509.
- Spolders, M. S. Öhlschläger, J. Rehage y G. Flachowsky. 2010. Inter- and intra-individual differences in serum copper and zinc concentrations after feeding different amounts of copper and zinc over two lactations. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 94:162-173.

- Steel, R. G. D. y J. H. Torrie. 1997. Bioestadística. Principios y Procedimientos. 2a ed. McGraw-Hill. México.
- Stephens, T. P., G. H. Longeragan, E. Karunasena y M. M. Brashears. 2007. Reduction of *Escherichia coli* O157 and *Salmonella* in feces and on hides of feedlot cattle using various doses of a direct-fed microbial. J. Food Prot. 70:2386-2391.
- Suttle, N. F. y C. H. McMurray. 1983. Use of erythrocyte copper-zinc superoxide dismutase activity and hair or free concentrations in the diagnosis of hypocuprosis in ruminants. Res. Vet. Sci. 35:47-52.
- Tanaka, M., Y. Kamiya, T. Suzuki, M. Kamiya y Y. Nakai. 2008. Relationship between milk production and plasma concentrations of oxidative stress markers during hot season in primiparous cows. J. Anim. Sci. 79:481-486.
- Tang, S. X., G. O. Tayo, Z. L. Tan, Z. H. Sun y L. X. Shen. 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. Applied Biochemistry and Biotechnology. 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.
- Tremellen, K. 2008. Oxidative stress and male infertility-A clinical perspective. Hum. Reprod. Update. 14:243-258.
- 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. J. Cub. Sci. Agri. 36:359-364.
- van der Peet-Schwering, C. M. C., A. J. M. Jansman, H. Smidt y I. Yoon. 2007. Effects of yeast culture on performance, gut integrity, and blood cell composition of weanling pigs. J. Anim. Sci. 85:3099-3109.
- 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.
- Walker, N., M. Cintora, H. Durand y LeTreut. 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 rumnants. 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).
- 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, 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).
- Wikse, S. E., D. Herd, R. Field y P. Holland. 1992. Diagnosis of copper deficiency in cattle. J. Anim. Vet. Med. Assoc. 200:1625-1629.
- 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.
- 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.
- Worapol, A., K. Watee y B. Thongchai. 2011. Effects of shade on physiological changes, oxidative stress and total antioxidant power in Thai Brahman cattle. Int. J. Biometeorol. 55:741-748.
- Yoon, I. K. y M. D. Stern. 1996. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* cultures on ruminal fermentation in dairy cows. J. Dairy Sci. 79:411-417.
- Young, B. A. 1983. Ruminant cold stress: Effect on production. Can. J. Anim. Sci. 57:1601-1607.
- Young, B. A., B. Walker, A. E. Dixon y V. A. Walker. 1989. Physiological Adaptation to the Environment. J. Anim. Sci. 67:2426-2432.
- Yurttas, H. C., H. W. Schafer y J. J. Warthesen. 2000. Antioxidant activity of nontocopherol hazelnut (*Corylus spp.*) phenolics. J. Food Sci. 65:276-280.

More Books!



yes I want morebooks!

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

Buy your books online at
www.get-morebooks.com

¡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.es

OmniScriptum Marketing DEU GmbH
Bahnhofstr. 28
D - 66111 Saarbrücken
Telefax: +49 681 93 81 567-9

info@omniscryptum.com
www.omniscryptum.com

OMNIScriptum



