

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA

FACULTAD DE ZOOTECNIA Y ECOLOGÍA

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO



**DESARROLLO DE UN ADITIVO ACTIVADOR DE LA FERMENTACIÓN
RUMINAL CON *PICHIA GUILLIERMONDII* (LEVICA-27)**

POR:

ING. BEXY GONZÁLEZ MORA

TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIA

ÁREA MAYOR: NUTRICIÓN ANIMAL

CHIHUAHUA, CHIH., MÉXICO

ENERO DE 2022



Desarrollo de un aditivo activador de la fermentación ruminal con *Pichia guilliermondii* (LEVICA-27). Tesis presentada por Bexy González Mora como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias, ha sido aprobada y aceptada por:

Ph.D. Carlos Ortega Ochoa
Director de la Facultad de Zootecnia y Ecología

D.Ph. Agustín Corral Luna
Secretario de Investigación y Posgrado

Ph.D. Iván Adrián García Galicia
Coordinador Académico

D.Ph. Yamicela Castillo Castillo
Presidente

Enero 14 - 2022.

Fecha

Comité:
Co-Directora:
Dra. Yoandra Marrero Rodríguez
Ph.D. Oscar Ruiz Barrera
D.Ph. Joel Domínguez Viveros
D.Ph. Francisco Castillo Rangel

© Derechos Reservados
AUTOR: BEXY GONZÁLEZ
MORA
DIRECCIÓN: PERIFÉRICO
FRANCISCO R. ALMADA
KM.1, CHIHUAHUA, CHIH.,
MÉXICO C.P. 31453
ENERO 2022

AGRADECIMIENTOS

A mis padres cuyo apoyo ha sido invaluable durante toda la etapa de estudiante. Sin ustedes nunca hubiera podido llegar hasta aquí.

A mi esposo por su comprensión y tolerancia infinita. Este logro sin dudas te pertenece, has luchado tanto como yo para alcanzar mis metas. Te amo y te amaré siempre.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo financiero para realizar mis estudios de maestría.

A mis asesoras Yamy y Yoa, por todos los conocimientos brindados, la dedicación y paciencia para esclarecer mis dudas. Gracias por permitirme realizar este trabajo junto a ustedes.

A Dailyn Sosa por ser mi consejera de excelencia. Gracias por el apoyo profesional, emocional y asesoría constante.

A los integrantes de mi Comité por sus valiosos comentarios y sugerencias que hicieron posible un mejor proyecto de tesis.

A Oscar, Yamy y Cristian por ser la familia que me acogió en México sin conocerme y hacerme sentir como en mi propio hogar. Nunca terminaré de agradecerles todo lo que hacen cada día por mí.

A las chicas del grupo de Alimentos y Aditivos, Yuya, Dailyn, Arazay, Yanelys, Elaine y Nery. Gracias por estar siempre pendientes de mí, por todos los conocimientos transmitidos y por el apoyo emocional en cada día de pandemia.

Al resto de investigadores, técnicos y administrativos del Instituto de Ciencia Animal (ICA), por inculcarme el amor por la ciencia y darme la oportunidad de estudiar en México.

Al personal docente y administrativo de la Facultad de Zootecnia y Ecología por su apoyo y contribución a mi superación profesional.

Al resto de mi familia y amigos de Cuba y de Chihuahua por cada broma y mensaje de aliento que convirtieron estos dos años en apenas un instante.

¡¡¡A todos, muchas gracias!!!

DEDICATORIA

A mis padres, a mi hermana y mi esposo por ser la razón de mis logros y fuente inspiradora de mis pasos.

CURRICULUM VITAE

La autora nació el 16 de noviembre de 1994 en San José de las Lajas, La Habana, Cuba.

2012-2017	Estudios de Ingeniería en la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Tecnológica de La Habana (CUJAE)
2017	Obtención del título de Ingeniero Químico
2018 – 2020	Reserva Científica en el Instituto de Ciencia Animal (ICA). Línea de investigación: Obtención y caracterización de alimentos y aditivos para la producción animal
2020 – 2022	Estudiante de Maestría en Ciencias en Producción Animal en la Facultad de Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua
2020 – Actualidad	Aspirante a Investigador en el grupo de Alimentos y Aditivos del Instituto de Ciencia Animal

RESUMEN

DESARROLLO DE UN ADITIVO ACTIVADOR DE LA FERMENTACIÓN RUMINAL CON *PICHIA GUILLIERMONDII* (LEVICA-27)

POR:

ING. BEXY GONZÁLEZ MORA

Maestría en Ciencias en Producción Animal

Secretaría de Investigación y Posgrado

Facultad de Zootecnia y Ecología

Universidad Autónoma de Chihuahua

Presidente: Ph. D. Yamicela Castillo Castillo

El presente trabajo tuvo como objetivo obtener un aditivo microbiano activador de la fermentación ruminal con la cepa de levadura *Pichia guilliermondii* (LEVICA-27). Se evaluaron siete medios de cultivo para el crecimiento de la levadura a las 24 h de fermentación comparados con caldo YPG como control y se seleccionó el mejor medio según sus ventajas técnico-económicas. Subsecuentemente, se realizó la cinética de crecimiento en el medio seleccionado y se ajustó un modelo no lineal para describir el comportamiento de LEVICA-27 durante 28 h. Posteriormente, se estudió el efecto de la levadura en la fermentación ruminal *in vitro* del rastrojo de maíz y se determinó pH, N-NH₃, indicadores de degradación de la fibra (% FDN y % FDA), digestibilidad (% DIVMS, % DIVFDN y % DIVFDA) y concentración de ácidos grasos volátiles. A las 24 h, no se encontraron diferencias entre los medios estudiados y el control ($P > 0.05$). En la cinética de crecimiento se observó que LEVICA-27 tuvo su máxima concentración en el medio con melaza y urea (7.63 log ufc/mL). Respecto a la fermentación ruminal *in vitro*,

la adición de LEVICA-27 no tuvo efecto en el pH ruminal, concentración de amoníaco, ni en los indicadores de digestibilidad ($P > 0.05$). Sin embargo, a las 12 horas, la inclusión de LEVICA-27 aumentó ($P < 0.05$) la concentración molar de AGV's totales, acético y propiónico en líquido ruminal y disminuyó ($P < 0.05$) la proporción C2:C3. Se concluye que LEVICA-27 tiene probablemente un efecto estimulador de la fermentación ruminal entre las 6 y 12 horas, resultado que debe tenerse en cuenta en futuros estudios *in vivo* con esta cepa.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF THE YEAST *PICHIA GUILLIERMONDII* AS A RUMINAL FERMENTATION ACTIVATOR

BY:

BEXY GONZÁLEZ MORA

The present work aimed to obtain a microbial additive activator of ruminal fermentation with the yeast strain *Pichia guilliermondii* (LEVICA-27). Seven culture media were evaluated for yeast growth at 24 h of fermentation compared with YPG broth as a control and the best culture medium was chosen according to its technical-economic advantages. Subsequently, the growth kinetics study was performed in this selected media and a non-linear model was adjusted to describe the behavior of LEVICA-27 during 28 h. In addition, the effect of yeast on the *in vitro* ruminal fermentation of corn stubble was studied and pH, N-NH₃, fiber degradation indicators (% FDN and % FDA), digestibility (% DIVMS, % DIVFDN and % DIVFDA) and concentration of volatile fatty acids were performed. At 24 h, no differences were found between the studied media and the control ($P > 0.05$). In relation to growth kinetics it was observed that LEVICA-27 had its maximum concentration in the medium with molasses and urea (7.63 log cfu / mL). In relation to the *in vitro* ruminal fermentation parameters, addition of LEVICA-27 had no effect on the ruminal pH, the concentration of N-NH₃, or the digestibility indicators ($P > 0.05$). However, at 12 hours, the inclusion of LEVICA-27 increased ($P < 0.05$) the molar concentration of total AGV's, acetic and propionic in ruminal fluid and decreased ($P < 0.05$) the C2:C3 ratio. It is concluded that LEVICA-27 seems to have a stimulating effect on ruminal fermentation between 6 and 12 hours,

a result that should be taken into account in future *in vivo* studies with this strain.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT.....	ix
LISTA DE CUADROS.....	xiii
LISTA DE GRÁFICAS.....	xiv
INTRODUCCIÓN.....	1
REVISIÓN DE LITERATURA	4
Microbios De Alimentación Directa (DFM).....	4
Microorganismos más Empleados en la Alimentación de Rumiantes .	4
Las Levaduras Como Mejorasoras de la Fermentación Ruminal.....	5
Mecanismo de Acción de las Levaduras en el Rumen.....	11
Desarrollo de Aditivos Microbianos en Latinoamérica.....	12
Obtención de Aditivos Microbianos a Base de Levaduras	16
Cinética de Crecimiento de Microorganismos	16
Fase de adaptación (A).....	17
Fase exponencial o logarítmica (C).	17
Fase estacionaria (E).....	17
Fase de muerte (F).....	19
Medios de Cultivo Para el Crecimiento de Levaduras.....	19
MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
Ensayo 1: Evaluación de Diferentes Medios de Cultivo Para el Crecimiento de LEVICA-27 a las 24 Horas	23
Descripción del área de estudio.....	23

Tratamientos experimentales.....	23
Procedimiento experimental.	23
Análisis estadístico.	25
Ensayo 2: Cinética de Crecimiento de LEVICA-27 en un Medio con Melaza y Caldo YPG	26
Descripción del área de estudio.....	26
Tratamientos experimentales.....	26
Procedimiento experimental.	26
Análisis estadístico.	27
Ensayo 3: Efecto del Cultivo de LEVICA-27 en la Fermentación Ruminal <i>in vitro</i> del Rastrojo de Maíz.....	27
Descripción del área de estudio.....	27
Tratamientos experimentales.....	27
Procedimiento experimental.	28
Análisis estadístico.	31
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
Diseño de un Medio de Cultivo Económico para el Crecimiento de LEVICA-27	32
Cinética de Crecimiento de LEVICA-27 en un Medio con Melaza y Caldo YPG	37
Efecto del Cultivo de LEVICA-27 en la Fermentación Ruminal <i>in Vitro</i> del Rastrojo de Maíz	39
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	50
LITERATURA CITADA	51

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Efecto de algunos microorganismos en la alimentación de rumiantes.....	6
2	Composición de los medios de cultivo (M1, M2, M3, M4, M5, M6 y M7) evaluados para el crecimiento de <i>Pichia guilliermondii</i> (LEVICA-27)	24
3	Composición química del rastrojo de maíz utilizado como sustrato en la fermentación ruminal <i>in vitro</i>	29
4	Efecto del cultivo de <i>Pichia guilliermondii</i> (LEVICA-27) en la fermentación ruminal <i>in vitro</i> del rastrojo de maíz.....	40
5	Efecto del cultivo de <i>Pichia guilliermondii</i> (LEVICA-27) durante la fermentación ruminal <i>in vitro</i> en la producción de ácidos grasos volátiles	46

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica		Página
1	Curva de crecimiento de los microorganismos.....	18
2	Tasa de crecimiento (hora 24 - hora 0) de <i>Pichia guilliermondii</i> (LEVICA-27) cultivada a 30 °C y 110 rpm en los medios M1, M2, M3, M4, M5, M6 y M7. EE = 0.06; P = 0.07	33
3	Cinética de crecimiento de <i>Pichia guilliermondii</i> (LEVICA-27) en los medios M1 ($R^2=0.99$) y M2 ($R^2=0.99$) cultivada a 30 °C y 110 rpm	38

INTRODUCCIÓN

Desde inicios del presente siglo los nutricionistas manejan el concepto de manipulación de la fermentación ruminal (Galindo y Marrero, 2005) con el objetivo de lograr beneficios en el metabolismo de nutrientes en el rumen y de esta forma, incrementar la productividad de los animales (Durmic *et al.*, 2014; Henry *et al.*, 2015; Vallejo-Hernández *et al.*, 2018).

La eliminación por la Unión Europea del empleo de antibióticos promotores del crecimiento en la producción animal, constituye uno de los principales retos a nivel científico para aquellos que se dedican a la búsqueda de alimentos para los animales. Esto a su vez, crea ventanas de oportunidades para encontrar aditivos alimenticios alternativos más seguros (Hong *et al.*, 2005). Tal es el caso de los microbios de alimentación directa (DFM por sus siglas en inglés), los cuales están constituidos por microorganismos viables beneficiosos y que cada día se estudian con mayor énfasis como nuevas vías que mejoran el rendimiento y la salud de los animales rumiantes que los consumen (Krehbiel *et al.*, 2003).

Entre estos DFM, las levaduras constituyen una de las alternativas para mejorar la producción de rumiantes, debido a su capacidad para estimular el crecimiento microbiano benéfico en el rumen fundamentalmente bacterias y hongos celulolíticos, estabilizar el pH ruminal (Tripathi y Karim, 2011; Elghandour *et al.*, 2014a), disminuir la producción de metano (Elghandour *et al.*, 2014a; Elghandour *et al.*, 2014b; Elghandour *et al.*, 2015), mejorar los patrones de fermentación, reducir las concentraciones de patógenos y por consiguiente incrementar la producción de carne y leche (Durmic *et al.*, 2014).

Sin embargo, los resultados varían según la especie animal, cepa, dosis y modo de aplicación de la levadura, ya que existen algunas cepas con acción específica y otras multifuncionales (Fajardo *et al.*, 2016).

En investigaciones con animales se emplean levaduras comerciales o cultivadas en el laboratorio. Aunque las investigaciones sobre el uso de levaduras como aditivos para rumiantes son diversas, en la literatura científica no existe información suficiente sobre la producción de las mismas. Esto es debido a que se encuentran patentadas y en ocasiones asociados a grupos de investigación, por lo que para la producción de este tipo de aditivos se debe diseñar la tecnología que garantice su producción y eficacia.

Los aspectos más importantes son la correcta selección de la (s) cepa (s), la composición del medio de cultivo que cubra los requerimientos de la cepa, las condiciones de fermentación que permitan obtener una alta concentración celular durante el proceso tecnológico (De Angelis *et al.*, 2006), así como su posterior evaluación en estudios de fermentación ruminal y comportamiento animal que permitan comprobar su efecto. En Cuba, a escala industrial no se produce este tipo de aditivos aún cuando muchos investigadores trabajan la temática y cuentan con colecciones de bacterias, hongos y levaduras como *Pichia guilliermondii* (LEVICA-27) con este potencial (Marrero *et al.*, 2020a; Marrero *et al.*, 2020b). Además, los costos elevados de estos aditivos en el mercado complejizan las posibilidades de su empleo en el sector ganadero cubano.

Por lo expuesto anteriormente, se planteó la siguiente hipótesis: La producción del aditivo microbiano con LEVICA-27 garantiza un producto eficaz que mejora la fermentación ruminal.

Se definió como objetivo general: Obtener un aditivo microbiano activador de la fermentación ruminal con LEVICA-27. Para dar cumplimiento al objetivo general se propusieron como objetivos específicos:

- Diseñar un medio de cultivo económico para el crecimiento de LEVICA-27.
- Demostrar *in vitro* la eficacia del activador ruminal desarrollado con LEVICA-27.

REVISIÓN DE LITERATURA

Microbios De Alimentación Directa (DFM)

La Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de Estados Unidos definió el término "microbios de alimentación directa" como suplementos alimenticios que contienen microorganismos vivos que incluyen bacterias, hongos y levaduras (Krehbiel *et al.*, 2003; Kenney, 2013). Este tipo de suplementos se utilizan cada vez más por los productores ganaderos como una alternativa que mejora el rendimiento y la salud de los animales (Elghandour *et al.*, 2015). Se utilizan muchas terminologías para clasificar estos aditivos o suplementos a base de microorganismos para rumiantes (Kmet *et al.*, 1993; Galindo y Marrero, 2005; Leicester *et al.*, 2016). De hecho, los términos probióticos, activadores ruminales y DFM se utilizan esporádicamente como sinónimos.

Kmet *et al.* (1993) propusieron una definición de probióticos para rumiantes como "cultivos vivos de microorganismos que se agregan intencionalmente en el rumen para mejorar la salud o la nutrición animal".

Algunos autores manejan el concepto de "activadores ruminales" como productos que pueden modificar la fermentación ruminal y mejorar el aprovechamiento de nutrientes presentes en los alimentos que consumen los rumiantes (Carro y Ranilla, 2002; Díaz *et al.*, 2005; Díaz *et al.*, 2009; Díaz *et al.*, 2011; Mercadante *et al.*, 2015).

Microorganismos más Empleados en la Alimentación de Rumiantes

Los rumiantes dependen principalmente de la degradación microbiana de los alimentos en el rumen. Los microorganismos beneficiosos que habitan en este órgano son los encargados de suministrar proteínas, vitaminas y

ácidos orgánicos de cadena corta para el animal hospedero (Pinloche *et al.*, 2013).

Por esta razón, es importante la manipulación de la fermentación ruminal a través de la administración de aditivos microbianos que contribuyan con la estabilización de la microbiota intestinal, mejoren el desarrollo del microbiota ruminal adulta, la digestión y el flujo de nitrógeno hacia las partes más bajas del sistema digestivo e incrementen la producción de carne y leche (Uyeno *et al.*, 2015).

Con este fin, se emplean diferentes cepas de los géneros *Lactobacillus sp.*, *Clostridium sp.*, *Bifidobacterias sp.*, *Streptococcus sp.*, *Enterococcus sp.*, *Megasphaera sp.*, *Saccharomyces sp.* y *Aspergillus sp.* (Ortiz *et al.*, 2008; Seo *et al.*, 2010; Cortés-Sánchez *et al.*, 2014; Hasan *et al.*, 2014; García-Hernández *et al.*, 2016). En ocasiones, los resultados de investigaciones arrojaron que combinaciones de cepas aumentan los beneficios respecto a cepas individuales (Collado *et al.*, 2007). En el Cuadro 1 se muestran algunos de los efectos que producen los aditivos microbianos en diferentes especies de rumiantes.

Las Levaduras Como Mejoras de la Fermentación Ruminal

Los beneficios de las levaduras en la fermentación ruminal se asocian con incrementos en las poblaciones de bacterias ruminales y protozoos (Nocek y Kautz, 2006; Bach *et al.*, 2007; Thrune *et al.*, 2009; Roos *et al.*, 2010; Ferraretto *et al.*, 2012) y en consecuencia se obtienen mejoras en el consumo de alimento, digestibilidad, salud y comportamiento productivo de los animales (Pinloche *et al.*, 2013).

Cuadro 1. Efecto de algunos microorganismos en la alimentación de animales rumiantes

Microorganismos	Animal	Efecto	Referencia
Probiótico de especies múltiples	Ganado joven	Incremento de 82 kg a 87 kg de peso vivo.	(Bayatkouhsar <i>et al.</i> , 2013)
Cultivo de levadura	Vaquillas Holstein	Disminución del tiempo de formación de espuma de 32 a 12 minutos con Diamond V ante malestar digestivo.	(Moya <i>et al.</i> , 2009)
<i>Enterococcus faecium</i>	Vacas	Producción de 2.3 kg más de leche/animal día.	(Nocek y Kautz, 2006)
<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus subtilis</i>	Vacas Holstein	Incrementos de 2 %, 4.4 % y 3.8 % en la digestibilidad de MS, FDN y FDA respectivamente. Aumentó de 115 a 137 mmol/L la concentración total de AGV's.	(Qiao <i>et al.</i> , 2010)
<i>Bacillus cereus</i> <i>Saccharomyces boulardii</i>	Ovejas	Aumento de la inmunidad humoral, con incrementos de seroconversiones de 3.5 a 5.2.	(Roos <i>et al.</i> , 2010)
<i>Aspergillus oryzae</i>	Becerras	Incremento de las poblaciones de bacterias celulolíticas de 10^6 a 10^8 ufc/ g de MS.	(Beharka <i>et al.</i> , 1991)

Kebreab y Dijkstra (2009) demostraron que las levaduras estimulan las poblaciones de bacterias y hongos celulolíticos en el rumen y aumentan su actividad enzimática. Muchos estudios han comprobado este efecto cuando se emplean dietas con alto contenido de forraje (Tang *et al.*, 2008; Barragán *et al.*, 2009; Chaucheyras-Durand *et al.*, 2015). También se informa que las levaduras liberan vitaminas y otros factores de crecimiento (ácidos orgánicos, vitaminas B y aminoácidos) que son esenciales para el crecimiento de estas poblaciones ruminales (Ruiz *et al.*, 2016; Anjum *et al.*, 2018; Farghaly y Hamdon, 2018).

Al agregar levaduras vivas a la dieta de vacas lecheras, Jiang *et al.* (2017) observaron incrementos en algunas poblaciones de bacterias celulolíticas (*Ruminococcus sp.* y *Fibrobacter succinogenes*) y amilolíticas (*Ruminobacter sp.*, *Bifidobacterium sp.* y *Selenomonas ruminantium*).

Los cambios en el microbiota ruminal, también se ven reflejados en indicadores de digestibilidad ruminal. Haddad y Goussous (2005) reportaron que la adición de un cultivo de levadura en la dieta de corderos incrementó la digestibilidad de materia seca, materia orgánica, proteína cruda y fibra detergente neutro. Chung *et al.* (2011) demostraron que las levaduras proporcionan un ambiente ruminal menos ácido y de este modo, beneficiaron el crecimiento de bacterias celulolíticas y la digestibilidad de la fibra. Las levaduras también tienen la capacidad de alterar el proceso de fermentación en el rumen de forma tal que reducen la formación de metano (Chung *et al.*, 2011).

No todas las cepas de levaduras son capaces de estimular a las bacterias ruminales. Los porcentajes de digestibilidad de la MS, FDN y FDA

al añadir cepas de levaduras comerciales o en fase experimental, se estudiaron por Leicester *et al.* (2016), Ferriere (2017) y Suntara (2020) quienes utilizaron sustratos fibrosos como paja de arroz, heno de alfalfa y rastrojo de maíz. Ninguno de estos autores encontró diferencias en dichas variables cuando se añadieron las levaduras en diferentes dosis.

En la literatura existen inconsistencias con respecto al efecto que ejercen las levaduras en el pH del rumen. Algunos autores comprobaron que diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* pueden aumentar el pH o disminuir su variabilidad en dietas altas en concentrado, al parecer por estimulación de las poblaciones que consumen lactato (Chaucheyras-Durand y Fonty, 2008). En general, cuando se utilizan dietas altas en fibra no se encuentran respuestas en el pH y este se encuentra cercano a la neutralidad.

En dietas con una relación 50: 50 de forraje y concentrado Díaz *et al.* (2017) y Anjum *et al.* (2018) no encontraron efecto de la adición de *Saccharomyces cerevisiae* en el pH ruminal durante estudios *in vitro* e *in vivo*. Por otra parte, Chaucheyras *et al.* (1996) demostraron que en condiciones *in vitro* las células de *Saccharomyces cerevisiae* fueron capaces de superar en número a las células de *Streptococcus bovis* cuando compiten por la utilización de azúcares, lo que trae como consecuencia menor producción de lactato por esta especie bacteriana.

Con dietas elevadas en concentrado hay evidencia de que no siempre las levaduras contribuyen con la estabilización del pH. En este sentido, Jiao *et al.* (2017) al añadir levaduras activas (encapsuladas y no encapsuladas) en vaquillas que consumían una dieta alta en concentrado y que presentaban una ligera acidosis, no encontraron cambios en el pH ruminal.

El efecto de las levaduras en la concentración de N-NH₃ también ha sido estudiado con resultados diversos. En teoría, la presencia de levaduras en el rumen reduce la concentración de amonio como consecuencia del incremento en la síntesis de proteína microbiana (Oeztuerk *et al.*, 2005). Este resultado fue comprobado por Anjum *et al.* (2018) quienes afirmaron que la adición de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* disminuyó la concentración de amoniaco durante la fermentación ruminal de búfalos que consumían ensilaje de maíz a voluntad y un concentrado.

Sin embargo, Vallejo-Hernández *et al.* (2018) no encontraron efecto de la adición de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* en los niveles de N-NH₃ durante la fermentación ruminal en estudios realizados con cabras, borregos y novillos.

Por otra parte, Oeztuerk (2009) observó que el aumento en la concentración de N-NH₃ en fermentadores producido por un cultivo de levaduras vivas de *Saccharomyces cerevisiae* fue mayor que el causado por los mismos cultivos esterilizados en autoclave; concluyó que la diferencia se asoció con una estimulación de la actividad proteolítica de las bacterias del rumen mediante el cultivo de levaduras vivas. Este autor también encontró concentraciones mayores de amoniaco ante la presencia de diferentes dosis de levaduras vivas en dos sistemas de fermentación *in vitro* y atribuye el resultado a la degradación microbiana de las células de levadura debido a su alto contenido de proteínas. De hecho, la concentración diaria de N-NH₃ fue de 220 y 263 mg para el control y el tratamiento con levaduras respectivamente. La diferencia entre tratamientos (43 mg de N-NH₃) es consistente con los 41.5 mg de N suministrados diariamente por el cultivo de

levadura (1 mL de levadura contenía 8.3 mg de N). Esta hipótesis también fue respaldada por las mayores proporciones de isovalerato y valerato en los fermentadores con levaduras en comparación con los del grupo control, ya que ambos ácidos grasos volátiles son producidos principalmente a partir de la degradación de aminoácidos por los microorganismos del rumen (Oeztuerk, 2009).

Los ácidos grasos volátiles (AGV's) representan el principal aporte de energía metabolizable para los rumiantes, por lo que un aumento en su producción es favorable para el animal. Esto depende de la dieta, la actividad microbiana, el pH del rumen y la frecuencia de ingestión de alimentos. En su mayoría, las raciones a base de forraje producen menor cantidad de AGV's, en comparación con aquellas basadas en concentrados (Oeztuerk *et al.*, 2005).

Las levaduras han sido evaluadas como activadores ruminales que incrementan la producción de AGV's, sin embargo, los resultados obtenidos no son consistentes dada la diversidad en las unidades experimentales. En un estudio *in vitro*, Miller-Webster *et al.* (2002) evaluaron dos cultivos de levaduras (0.2 g/L, cultivo de levadura Diamond V XP® y 0.2 g/L, cultivo de levadura A-Max®) y ambos aumentaron la concentración de propionato y redujeron la relación acetato/propionato.

En un estudio similar, Oeztuerk (2009) reportó incrementos en la producción diaria de AGV's totales de 31.89 mmol a 34.44 mmol/día, cuando utilizaron un cultivo de levadura Yea-Sacc 1026® en estudios *in vitro*; la relación acetato: propionato disminuyó de 2.77 a 2.65. Por su parte, Ruiz *et al.* (2016) al emplear una cepa de levadura (*Candida norvegensis*) en la

fermentación ruminal *in vitro* con paja de avena también encontraron estimulación en la producción de AGV's después de 8 horas de incubación.

Los autores atribuyen este efecto a que las paredes celulares de levadura, que representan aproximadamente el 20 % del peso de las células, están compuestas principalmente de glucanos β -1,3, β -1,6 y quitina, estructuras que forman sustratos apropiados para estimular la fermentación ruminal microbiana, independientemente del estado de la levadura.

En otros estudios *in vivo*, realizados por Marrero *et al.* (2006) y Moya *et al.* (2009) no reportaron cambios en la producción de AGV's cuando se utilizaron levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y de otras especies en vacas y vaquillas que consumieron dietas basadas en forraje y una dieta de transición, respectivamente.

Es necesario tener en cuenta que los efectos de las levaduras pueden ser variables, dependiendo de varios factores relacionados con el animal (especie, etapa fisiológica, consumo) y/o con la dieta (composición, modo de distribución). Además, la concentración de células viables, el tipo de levadura y la dosis también son de gran importancia en esta variabilidad (Fajardo *et al.*, 2016).

Mecanismo de Acción de las Levaduras en el Rumen

Existen muchas teorías para explicar el mecanismo a través del cual las levaduras ejercen efecto benéfico en el animal. Uno de los modos de acción propuestos es que las células mediante su respiración aeróbica eliminan las pequeñas cantidades de oxígeno (1%) que ingresa al rumen junto a la ingesta de alimentos, lo que facilita la anaerobiosis para el crecimiento de bacterias y hongos celulolíticos (Newbold y Wallace, 1996; Seo *et al.*, 2010).

Por otra parte, los cultivos de levadura proporcionan vitaminas, glucanos, mananoproteínas y ácidos orgánicos. Estos compuestos constituyen factores de crecimiento para las poblaciones que digieren la fibra y consumen ácido láctico en el rumen (Oeztuerk *et al.*, 2005).

Un efecto adicional es que los cultivos de levadura son ricos en ácidos orgánicos (principalmente ácido málico) que estimulan el crecimiento de *Selenomonas ruminantium*. Esta bacteria ruminal consume el ácido láctico producido en el rumen y por lo tanto, contribuye a la estabilización del pH en este órgano, lo que favorece el crecimiento de microorganismos celulolíticos (Callaway y Martin, 1997; Elghandour *et al.*, 2014a; Elghandour *et al.*, 2014b).

Las levaduras también producen cambios en las poblaciones bacterianas por competencia y estimulan el crecimiento y la actividad de las poblaciones acetogénicas que compiten con los metanógenos mediante el uso del hidrógeno metabólico. Esto disminuye las pérdidas de energía en el animal producto del metano formado en el rumen y disminuye el efecto negativo de este gas en el medio ambiente (Fajardo *et al.*, 2016).

Desarrollo de Aditivos Microbianos en Latinoamérica

En varias instituciones de América Latina se desarrollan investigaciones para la obtención de aditivos microbianos (probióticos y activadores ruminales) y los resultados indican mejoras en indicadores de salud y productividad de diferentes especies. La mayoría de los estudios están encaminados a demostrar *in vitro*, los beneficios de estos aditivos en condiciones fisiológicas del tracto digestivo donde se evalúan indicadores como la tolerancia a pH bajo, resistencia a elevadas temperaturas, viabilidad celular frente a sales biliares, susceptibilidad frente a antimicrobianos entre

otros factores con excelentes resultados (Bocourt *et al.*, 2004; Pérez *et al.*, 2005; Marrero *et al.*, 2016). Para estas pruebas, los aditivos se obtienen mediante fermentaciones sumergidas a pequeñas escalas donde se utilizan medios comerciales como el MRS para bacterias ácido lácticas, caldo extracto de malta y caldo YPG para levaduras y hongos.

En Colombia se ha trabajado en la obtención de un aditivo probiótico con *Lactobacillus plantarum* donde se obtuvieron concentraciones entre 10^8 y 10^{13} ufc/150 μ L en un medio de cultivo denominado PRO con sacarosa, leche de soya, leche en polvo y salvado de trigo. La cepa demostró viabilidad bajo condiciones fisiológicas del tracto gastrointestinal *in vitro*, resistió temperaturas máximas de 45 °C y diferentes concentraciones de sales biliares incluyendo la bovina (Jurado-Gómez *et al.*, 2016).

En México se estudió la fermentación ruminal *in vitro* con la inclusión de levaduras no *Saccharomyces* aisladas en condiciones y dietas diferentes (Castillo *et al.*, 2009; Castillo *et al.*, 2016). En particular, *Candida norvegensis* (Levazoot 15) demostró su potencial para estimular el crecimiento de poblaciones microbianas ruminales como los hongos celulolíticos de 5.2 a 6.15 log ufc/mL, incrementar las concentraciones de ácido acético, propiónico y butírico en 8.5, 1.9 y 0.9 mmol respectivamente, durante las primeras 12 horas de fermentación; y la digestibilidad *in vitro* de materia seca en dietas ricas en fibra de 46 a 56 % en 24 horas (Angulo *et al.*, 2013; Castillo *et al.*, 2016; Ruiz *et al.*, 2016).

En Cuba se realizaron estudios con cepas de *Lactobacillus sp.*, *Bacillus sp.*, *Aspergillus oryzae* y levaduras pertenecientes a colecciones nacionales o aisladas del tracto gastrointestinal de animales y otros ambientes (Sosa *et al.*,

2010; Marrero *et al.*, 2016; Gracia *et al.*, 2018). Además, se evaluaron levaduras de diferentes especies que hoy forman parte del Banco de Microorganismos de Interés para la Producción Animal (BAMIPA) registrado en la Sociedad Cubana de Colecciones Microbianas y otros Materiales Biológicos, la Federación Latinoamericana de Colecciones de Cultivos (FELACC) y en la Federación Mundial de Colecciones de Cultivos (WFCC; Sosa *et al.*, 2017).

Los mayores avances en la obtención y producción de aditivos de este tipo, se han logrado con cepas probióticas destinadas a la alimentación de humanos y animales no rumiantes. Tal es el caso de investigaciones realizadas con *Lactobacillus pentosus* LB-31, donde se diseñó un nuevo medio de cultivo no convencional, así como el proceso de obtención escalable, económicamente factible y que mantiene la eficacia probiótica en indicadores morfo-fisiológicos y de bioquímica sanguínea de pollos de engorda (resultados que forman parte de una solicitud de patente del Instituto de Ciencia Animal).

Como activadores de la fermentación ruminal se evaluaron levaduras de diferentes especies y la cepa *Aspegillus oryzae* H/6.28.1. Con este último se estudiaron diferentes dosis de inclusión y su efecto en la producción de gas, AGV's, digestibilidad de la materia seca, amoníaco y pH ruminal. Se demostró que la dosis óptima para el uso del aditivo es de 200 µL en 80 mL de medio de incubación o 2 g/ animal día (Sosa *et al.*, 2010; Sosa *et al.*, 2021); sin embargo, aún está por definirse las condiciones óptimas para el cultivo de la cepa.

Dentro de los estudios con levaduras se demostró el efecto estimulador de una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* en la fermentación ruminal (Marrero *et al.*, 2006; Galindo *et al.*, 2010). Esta especie es la única empleada en productos comerciales autorizados para su uso como probióticos en animales rumiantes (Diamond V®, Levucell®, SelenoSource AF 2000®, Yea-Sacc®). A pesar de esto, no se conocen las condiciones para su producción ni la composición de los medios de cultivo empleados en la fabricación.

Además de *Saccharomyces cerevisiae*, se evaluaron otras especies como *Candida tropicalis*, *Issatchenkia orientalis* y *Pichia guilliermondii* (Marrero *et al.*, 2015a; Marrero *et al.*, 2020b) que estimularon en 20 % o más la producción de gas *in vitro* a partir de sustratos fibrosos. Galindo *et al.* (2010) encontraron reducción del 72 % de la producción de metano cuando utilizaron la cepa *Candida tropicalis* (LEVICA-25) en la fermentación ruminal *in vitro* con un sustrato fibroso (*Cynodon nlemfuensis*). En estudios preliminares realizados con 12 cepas diferentes de levadura, LEVICA-27 mostró las mayores ventajas para su inclusión en dietas fibrosas para animales rumiantes.

Con esta cepa se obtuvo el mayor volumen de gas acumulado (50 mL) y cuando se evaluaron diferentes dosis de su empleo (5 y 10 mg MS/ mL) la producción de gas fue de 20 y 25 mL respectivamente, superior al grupo control (8 mL; Marrero *et al.*, 2014; Marrero *et al.*, 2020b). Por esta razón, es necesario el desarrollo del proceso tecnológico que permita la obtención a escalas productivas de un aditivo con LEVICA-27 y su posterior introducción en los sistemas ganaderos.

En trabajos conjuntos entre Cuba y México, Marrero *et al.*, (2015a) evaluaron las cepas LEVICA-25 y Levazoot 15 pertenecientes a las colecciones cubana y mexicana respectivamente. Se demostró que ambas cepas activan la fermentación ruminal en presencia de sustratos fibrosos como la paja de avena y el heno de alfalfa. Con este último sustrato, Levazoot 15 incrementó la producción de gas en un 21.43 %, más que LEVICA-25.

Obtención de Aditivos Microbianos a Base de Levaduras

La mayoría de los estudios relacionados con la obtención de aditivos microbianos están relacionados con el aislamiento y evaluación de nuevas cepas. Sin embargo, falta por definir los procesos para su producción a mayores escalas. Fortalecer este tipo de investigación en el sector ganadero resulta de gran interés desde el punto de vista económico y productivo.

Las levaduras se reproducen en medios muy variados y se cultivan mediante procesos fermentativos, generalmente cultivos sumergidos. Los cultivos sumergidos prevalecen por encima de otros sistemas convencionales de fermentación para la obtención de aditivos microbianos (Zapata *et al.*, 2007). Esto se debe a que permiten el control de las condiciones de cultivo según la cepa o cepas de interés; así como la reducción del tiempo y los costos para la obtención del producto final. El mantenimiento de buenas condiciones de cultivo garantiza una adecuada velocidad de crecimiento, por medio del aprovechamiento de sustratos económicos (Carrillo *et al.*, 2010).

Cinética de Crecimiento de Microorganismos

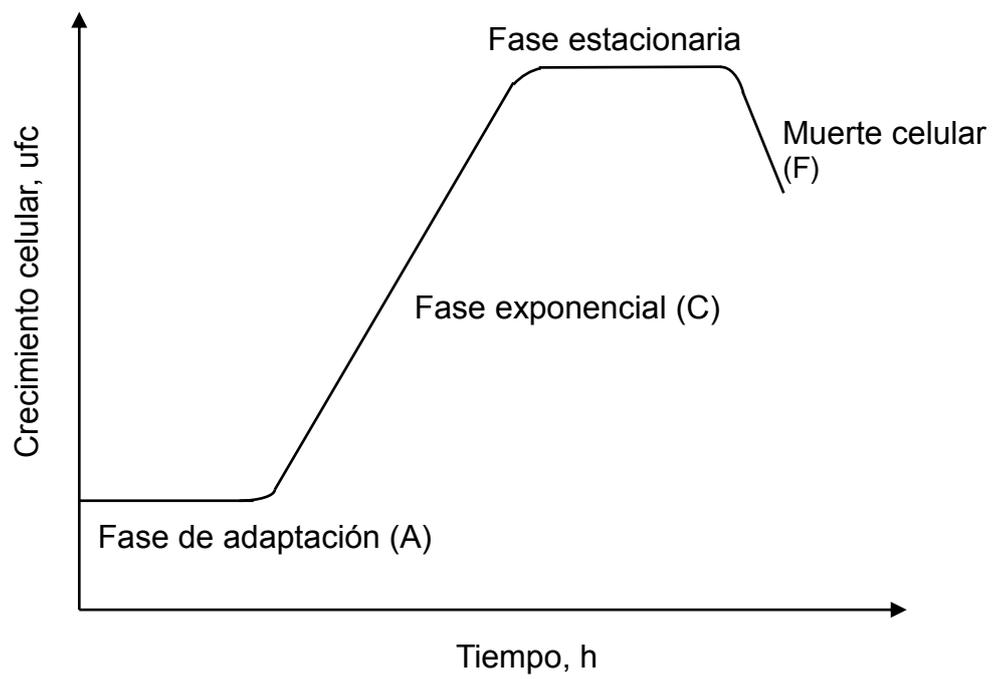
Las variaciones que se presentan en las concentraciones de sustrato, productos de la fermentación y biomasa durante el crecimiento microbiano, se nombra como “cinética de fermentación” (Doran, 2013).

El crecimiento microbiano presenta diferentes fases que se muestran en la Gráfica 1. En la mayoría de la literatura científica solo se toman en cuenta cuatro fases del crecimiento ya que el resto son etapas de transición y no tienen relevancia en el proceso fermentativo (Doran, 2013). Por tanto, las fases más importantes del crecimiento de los microorganismos se consideran las que se describen a continuación:

Fase de adaptación (A). Cuando los microorganismos se transfieren de un medio a otro, no hay inicialmente un incremento en el número de células. Durante esta fase los microorganismos toman un tiempo para adaptarse al nuevo ambiente y en ocasiones, se sintetizan enzimas o componentes estructurales (Sánchez, 2003). No es una fase productiva y debe ser lo más corta posible.

Fase exponencial o logarítmica (C). En esta fase aumenta el número de células, la velocidad específica de crecimiento es constante y la máxima posible para las condiciones de cultivo. El crecimiento de la masa celular puede describirse cuantitativamente en función de la duplicación de la biomasa por unidad de tiempo. Este modelo de crecimiento obedece a un modelo exponencial (Rodríguez *et al.*, 2011).

Fase estacionaria (E). Los nutrientes comienzan a agotarse, se acumulan compuestos de desecho que resultan tóxicos para la célula y el pH se desestabiliza. Puede existir crecimiento microbiano lento como consecuencia de la liberación de sustrato precedente de la ruptura celular, sin embargo no se percibe debido a que se igualan las velocidades de crecimiento y muerte celular (Sánchez, 2003).



Gráfica 1. Curva de crecimiento de los microorganismos.

Fase de muerte (F). Ocurre la lisis masiva de las células como consecuencia del agotamiento total de nutrientes en el medio de cultivo. Esta fase es irrelevante en la fermentación por lo que generalmente, se detiene el proceso antes de su presencia (Crueger y Crueger, 1993).

A continuación, se describen las ecuaciones 1, 2 y 3 para estudiar y cuantificar los parámetros de esta cinética: velocidad específica de crecimiento (μ) y velocidades de consumo de sustrato (q_s) y formación de producto (q_p) (Ortiz *et al.*, 2008).

Velocidad específica de crecimiento:
$$\mu = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt} \quad (1)$$

Velocidad específica de consumo de sustrato:
$$q_s = -\frac{1}{x} \frac{dS}{dt} \quad (2)$$

Velocidad específica de formación de producto:
$$q_p = \frac{1}{x} \frac{dP}{dt} \quad (3)$$

La velocidad específica de crecimiento varía con la especie y cepa de microorganismo, así como con las condiciones medio ambientales, físicas y químicas. En general, el tiempo para que se duplique la biomasa depende de la complejidad del organismo. En promedio, los tiempos de duplicación de hongos y levaduras son mayores que los de bacterias (Owen, 1991).

Este se puede determinar según la ecuación 4:

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu_{m\acute{a}x}} \quad (4)$$

Medios de Cultivo Para el Crecimiento de Levaduras

Un aspecto importante para obtener altas concentraciones de biomasa microbiana es diseñar un medio de cultivo que cubra los requerimientos nutricionales de los microorganismos. Según su composición, los medios de cultivo se dividen en dos grupos: medios químicamente definidos o

comerciales y medios de cultivo de composición indeterminada o complejos (Rodriguez *et al.*, 2011).

Los medios de cultivo convencionales se utilizan en pequeñas cantidades en los estudios de laboratorio. Sin embargo, los altos precios que tienen en el mercado impiden su uso a escalas productivas. Rodrigues *et al.* (2006) considera que el costo del medio de cultivo representa el 30 % aproximadamente del costo total de la fermentación.

Por lo anterior, diferentes investigaciones tienen como objetivo encontrar fuentes de carbono, nitrógeno y minerales de bajo costo para producir biomasa a escalas superiores, donde los subproductos agroindustriales juegan un papel importante (Santos *et al.*, 2015; Aguilar *et al.*, 2015; Buitrago *et al.*, 2017; Hernández *et al.*, 2018). Se conoce que las levaduras pueden utilizar gran variedad de fuentes de carbono económicas incluidos los desechos agroindustriales como el suero lácteo, salvado de trigo, melaza de caña de azúcar y rastrojo de maíz (Huang *et al.*, 2013).

Las melazas se consideran uno de los sustratos más utilizados, debido a que se generan grandes volúmenes y tienen bajo costo. Contienen del 50-55 % de sacarosa, 30-35 % de glucosa y fructosa y 15-20 % de ácidos orgánicos, pigmentos, aminoácidos, compuestos fenólicos y sales inorgánicas (Durango, 2007).

Sin embargo, los resultados con el empleo de estos medios varían según la cepa de levadura que se utilice, sobre todo en la concentración de biomasa que se obtiene con cada una de ellas. Por ejemplo, Karatay y Donmez (2010) demostraron el potencial de las cepas de levaduras *Candida lipolytica*, *Candida tropicalis* y *Rhodotorula mucilaginosa* para producir

biomasa y lípidos al usar melaza. Se probaron concentraciones variadas de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ (0.5, 1.0 y 1.5 g /L) y melaza (6 %, 8 %, 10 %) para encontrar las cantidades óptimas de carbono y nitrógeno para la producción de lípidos celulares. Encontraron que el contenido máximo de lípidos asociado a las mayores producciones de biomasa se logró en el medio que contenía una solución de melaza al 8 % y 1.0 g /L de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ a pH = 5 y cuatro días de incubación.

Por otra parte, Wang *et al.* (2012) y Roepcke *et al.* (2011) emplearon medios de cultivo para el crecimiento de *Pichia guilliermondii* que contenían melaza, urea como fuente de nitrógeno y otras sales minerales, encontrando concentraciones elevadas de biomasa celular (10 g/L).

Durango (2007) realizó modificaciones a un medio de cultivo convencional denominado YM (extracto de malta, extracto de levadura, peptona y dextrosa) donde incrementó la concentración de dextrosa de 10 a 30 g/L y en un segundo caso, sustituyó este último componente por 30 g/L de melaza. Estos estudios se realizaron con el propósito de obtener un preparado con *Saccharomyces cerevisiae* destinado a la alimentación animal y en los tres medios se obtuvieron concentraciones de 10^9 ufc/mL. También la autora determinó el peso seco de la biomasa y aquí los resultados sí tuvieron variación cuando se utilizó melaza en el medio de cultivo, obteniéndose 20 g/L de biomasa seca mientras que, en los otros dos medios la biomasa producida fue de 5 g/L. Es importante mencionar que los medios no convencionales aumentan la cantidad de impurezas en los cultivos celulares y esto pudiera ocasionar una sobreestimación en el peso de la biomasa.

Concentraciones más bajas se encontraron recientemente por Lakshmidevi *et al.* (2021) quienes evaluaron un medio de bajo costo con melaza para el crecimiento de *Rhodotorula glutinis* y *Rhodosporidium toruloides* y lo compararon con otro medio convencional que contenía extracto de levadura y glucosa (GYM). *Rhodotorula glutinis* tuvo una concentración de 0.50 g/L en el medio con melaza, superior a la que se obtuvo en el medio convencional (0.38 g/L). Sin embargo, con *Rhodosporidium toruloides* el crecimiento no tuvo variación entre los dos medios. Como se aprecia, en todos los casos, se obtuvieron concentraciones de biomasa similares o superiores a las que se obtienen en los medios de cultivo convencionales con la misma cepa.

Existen otros medios de cultivo más complejos que los descritos hasta el momento que también se han estudiado con el objetivo de evaluar los requerimientos de carbono, nitrógeno y factores de crecimiento para levaduras. Tal es el caso del medio NRF empleado por Angulo *et al.* (2019) y Marrero *et al.* (2015b) para evaluar el comportamiento de *Candida norvegensis* y *Pichia guilliermondii* ante diferentes fuentes de carbono (glucosa, sacarosa, lactosa) y nitrógeno (caseína, triptona, urea). Sin embargo, en estas investigaciones se reportan valores bajos de biomasa (0.02 mg para *Candida norvegensis* y 10^7 células/mL para *Pichia guilliermondii*) y los autores lo asocian al empleo de pequeños porcentajes de inoculación.

Dado lo anterior, es necesario encontrar los componentes adecuados en el medio de cultivo que garanticen el mayor crecimiento de la cepa en estudio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ensayo 1: Evaluación de Diferentes Medios de Cultivo Para el Crecimiento de LEVICA-27 a las 24 Horas

Descripción del área de estudio. Los estudios se realizaron en el Laboratorio de Producción de Alimentos de la Unidad Central de Laboratorios (UCELAB) del Instituto de Ciencia Animal (ICA) ubicado en la Carretera Central km 47 ½ municipio San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba (latitud 22° 58' 5" norte; longitud 82° 9' 21" oeste; altitud 135 msnm).

Tratamientos experimentales. Se evaluaron siete medios de cultivo cuya composición se muestra en el Cuadro 2. Estos corresponden con los tratamientos experimentales y se utilizó como medio control caldo YPG (extracto de levadura 10 g/L, peptona 10 g/L y glucosa 20 g/L). Previamente se consultó el efecto de diferentes componentes que usualmente se reportan para el crecimiento de levaduras (Choi *et al.*, 2002; Shin *et al.*, 2002; Stehlik-Tomas *et al.*, 2004; Sánchez *et al.*, 2007; Roepcke *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012; Marrero *et al.*, 2015b; Ferrer-Romero *et al.*, 2019).

Procedimiento experimental. Se utilizó la cepa *Pichia guilliermondii* (LEVICA-27) y se activó mediante dos subcultivos en caldo YPG a 110 rpm, 30 °C y 24 horas de incubación. A partir del cultivo activo se obtuvo el inóculo en iguales condiciones. Se inocularon 45 mL al 10 % (v/v, en matraces de 100 mL) de los medios de cultivo correspondientes a los tratamientos experimentales. Se tuvieron tres repeticiones de cada tratamiento. Los matraces se colocaron en una incubadora orbital a 30 °C y 110 rpm durante 24 horas. Al terminar la incubación se agitaron los frascos y se tomó 1 mL de la muestra homogénea.

Cuadro 2. Composición de los medios de cultivo (M1, M2, M3, M4, M5, M6 y M7) evaluados para el crecimiento de *Pichia guilliermondii* (LEVICA-27)

Concentración de nutrientes, g/L	M1 (Control)	M2	M3	M4	M5	M6	M7
Melaza de caña de azúcar	-	20	20	20	20	20	20
Extracto de levadura	10	-	-	-	-	-	-
Peptona	10	-	-	-	-	-	-
Glucosa	20	-	-	-	-	-	-
Urea	-	10	10	10	10	10	10
KH ₂ PO ₄	-	-	5	5	5	5	5
MgSO ₄	-	-	1.5	1.5	1.5	1.5	-
FeCl ₃ ·6H ₂ O	-	-	0.15	0.15	0.15	-	-
CuSO ₄	-	-	0.1	0.1	-	-	-
MnSO ₄ ·H ₂ O	-	-	0.06	-	-	-	-

A estas muestras se le realizaron diluciones seriadas con solución salina (0.85 %, p/v) como diluyente y se sembraron en placas Petri con agar Sabouraud (Biolife®, Milán, Italia) para determinar por conteo visual las unidades formadoras de colonia por mililitro (ufc/mL).

Análisis estadístico. Se utilizó un diseño completamente al azar que contempló el efecto de tratamiento (M1, M2, M3, M4, M5, M6 y M7). Cuando se detectó diferencia ($P < 0.05$) las medias se separaron mediante contrastes ortogonales (M1 con el resto de los medios de cultivo). La variable estudiada se transformó a escala logarítmica para cumplir con los supuestos teóricos del análisis de varianza. Para el análisis de los datos se utilizó como variable respuesta el incremento de la biomasa a las 24 horas de fermentación (hora 24 – hora 0) con el objetivo de eliminar el efecto del tiempo debido a la carencia de relevancia en este ensayo. El análisis de varianza y la prueba de contraste ortogonal se realizó utilizando el PROC GLM y la opción CONTRAST respectivamente del programa estadístico SAS v9.3 (SAS, 2011).

La ecuación del modelo que se ajustó fue la siguiente (ecuación 5):

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + \varepsilon_{ijk} \quad (5)$$

donde Y_{ijk} = variable dependiente; μ = media global; T_i = efecto del tratamiento ($i = 1,2$) y ε_{ijk} = error experimental.

Una vez que se obtuvo el medio de cultivo sobresaliente desde el punto de vista técnico y económico para el crecimiento de LEVICA-27 se realizó un segundo ensayo.

Ensayo 2: Cinética de Crecimiento de LEVICA-27 en un Medio con Melaza y Caldo YPG

Descripción del área de estudio. Los estudios se realizaron en el Laboratorio de Producción de Alimentos de la Unidad Central de Laboratorios (UCELAB) del Instituto de Ciencia Animal (ICA) ubicado en la Carretera Central km 47 ½ municipio San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba (latitud 22° 58' 5" norte; longitud 82° 9' 21" oeste; altitud 135 msnm).

Tratamientos experimentales. Los tratamientos evaluados fueron M1 y M2 (cuadro 2). Se realizó la cinética de crecimiento de la levadura en estos dos medios de cultivo con tres repeticiones en cada horario de muestreo (0, 2, 3, 4, 8, 12, 16, 20, 24 y 28 h) y se determinó la concentración celular en ufc/mL como indicador del crecimiento.

Procedimiento experimental. Se utilizó la cepa *Pichia guilliermondii* (LEVICA-27) la cual se activó mediante dos subcultivos en caldo YPG a 110 rpm, 30 °C y 24 h de incubación. A partir del cultivo activo se obtuvo el inóculo en condiciones iguales. Se inocularon 45 mL al 10 % (v/v, en matraces de 100 mL) de los dos medios de cultivo correspondientes a los tratamientos experimentales. La concentración inicial de LEVICA-27 en cada cultivo fue de 10⁶ ufc/mL. Estos se incubaron en un agitador orbital a 30 °C y 110 rpm.

En cada horario de muestreo se tomó 1 mL de la muestra homogénea de cada matraz. A estas muestras se le realizaron diluciones seriadas con solución salina (0.85 %, p/v) como diluyente y se sembraron en placas Petri con agar Sabouraud (Biolife®, Milán, Italia) para determinar por conteo visual las ufc/mL. A partir de este último indicador se determinó la máxima concentración de biomasa en cada medio de cultivo.

Análisis estadístico. Se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2x10 teniendo en cuenta los factores medio de cultivo y tiempo. La variable estudiada (ufc/mL) se transformó a escala logarítmica para cumplir con los supuestos teóricos del análisis de varianza. Para cada cinética de fermentación (ufc/mL vs. tiempo) se ajustó un modelo no lineal (Gompertz), representado en la ecuación 6 (Aguilar *et al.*, 2015). Para ello se utilizó el PROC NLIN de SAS v9.3 (SAS, 2011).

$$\log \frac{\text{ufc}}{\text{mL}} = Ae^{-be^{-kt}} \quad (6)$$

Donde los parámetros A, b y k del modelo corresponden con la máxima concentración celular, velocidad de crecimiento relativo (ufc/mL-h) y tiempo para alcanzar la velocidad de crecimiento específica máxima (h) respectivamente. Además, se realizó una prueba de t de Student para comparar las medias correspondientes a la máxima concentración de biomasa (parámetro A del modelo).

Ensayo 3: Efecto del Cultivo de LEVICA-27 en la Fermentación Ruminal *in vitro* del Rastrojo de Maíz.

Descripción del área de estudio. El trabajo se realizó en el Laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua (UACH) ubicada en el Periférico Francisco R. Almada km 1.0 en la ciudad de Chihuahua, Chih., México (latitud 28° 35' 10.9'' norte; longitud 106° 6' 26.6'' oeste; altitud 1440 msnm).

Tratamientos experimentales. Se evaluaron 2 tratamientos: A) Líquido de rumen filtrado + sustrato de rastrojo de maíz + medio de cultivo sin levaduras y B) Líquido de rumen filtrado + sustrato de rastrojo de maíz + medio de cultivo inoculado con la levadura; en 4 horarios de muestreo (0, 6, 12 y 24

horas). Se realizaron 4 repeticiones por tratamiento.

Procedimiento experimental. El ensayo se realizó bajo condiciones *in vitro* y se empleó la técnica de incubación en botellas de fermentación de 250 mL de capacidad con volumen efectivo de 150 mL. El rastrojo de maíz utilizado como sustrato se secó previamente a temperatura ambiente (27 °C) bajo el sol y se molió a través de una malla de 1.0 mm. La composición química se determinó de acuerdo a la AOAC (2005; Cuadro 3).

Posteriormente, se pesaron 0.5 g de sustrato en bolsas Ankom® FN°57 con un tamaño de poro de 25 µm y cada bolsa se colocó dentro de los frascos de 250 mL que se utilizaron para las incubaciones. El líquido ruminal se extrajo de dos vacas donantes con peso promedio de 250 kg, las cuales se estabularon en corraletas individuales y se alimentaron durante siete días con una dieta a base de rastrojo de maíz previo a la toma de líquido ruminal. A los animales se le proporcionó agua a libre acceso. La extracción de líquido ruminal se realizó a través de sonda esofágica antes del primer ofrecimiento de alimento (9:00 a.m). El líquido ruminal se filtró a través de muselina y se usó para preparar el medio de fermentación, el cual contenía líquido ruminal y solución amortiguadora (McDougall, 1948), en proporción 2:1.

Previo a la incubación, en cada frasco se vertieron 120 mL del medio de fermentación y se añadieron los tratamientos experimentales (30 mL de cultivo de LEVICA-27 o medio de cultivo fresco; Ruiz *et al.*, 2016). Todo el procedimiento se realizó bajo atmósfera anaerobia.

Cuadro 3. Composición química del rastrojo de maíz utilizado como sustrato en la fermentación ruminal *in vitro*

Nutriente	% MS
FDA	37.75
Cenizas	8.35
FDN	67.2
Proteína	5.90
Fibra Cruda	31.07
Materia Seca	91.44
Azúcares Totales	13.34

Para obtener el cultivo de levaduras se activó la cepa mediante dos subcultivos en caldo extracto de malta a 110 rpm, 30 °C y 24 horas de incubación. A partir del cultivo activo se obtuvo el inóculo en condiciones iguales. Se inocularon 400 mL del medio M2 al 10 % (v/v, en matraz de 1 L) y se incubó nuevamente a 30 °C con agitación mecánica de 110 rpm durante 16 horas (tiempo de máximo crecimiento de la levadura). De este último cultivo se añadieron 30 mL en los frascos correspondientes para la fermentación ruminal *in vitro*. El cultivo de LEVICA-27 tuvo una concentración final de 10^8 ufc/mL. Por último, los frascos de fermentación se incubaron a 39 °C y 110 rpm en una incubadora Orbital Shaker (New Brunswick Model Innova 4000, Nijmegen, Netherlands). En cada horario de muestreo se retiraron aleatoriamente cuatro frascos de cada tratamiento.

Variables evaluadas. Se midió el pH (Hannah Instruments, Model HI 9017, Arvore-Vila do Conde, Portugal) y se determinó la concentración de N-NH₃ (Broderick y Kang, 1980) mediante espectrofotometría uv visible (Varioskan Flash Thermo Scientific v4.00.53).

Además, se obtuvo la concentración molar de AGV's por cromatografía de gases con detección de ionización de flama. Para ello, se empleó un cromatógrafo de gases Claurus 400® (Perkin Elmer) con una columna Varian capillary CP-wax58 (FFAP) CB (15 m x 0.53 mm, 0.5 µm). La temperatura inicial del horno fue de 115 °C, la cual se mantuvo por un minuto, luego se elevó 10 °C por minuto hasta alcanzar 190 °C. En este método se dieron tres minutos isotérmicos, el gas acarreador fue helio a presión constante de 3 psi (Castillo *et al.*, 2017).

El volumen inyectado de muestra fue 0.6 μ L la cual se acondicionó previamente con ácido meta-fosfórico según el procedimiento descrito por Galyean (1980).

También se determinaron los porcentajes de la fibra detergente neutro (FDN) y de la fibra detergente ácido (FDA) según Van Soest (1991), así como la digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS), de la FDN (DIVFDN) y de la FDA (DIVFDA). Para ello, al término de cada tiempo de incubación, las bolsas Ankom[®] FN[°]57 se retiraron de los frascos, se lavaron con agua fría y se procesaron en el analizador de fibra Ankom[®] 2000. En él, se sometieron los residuos de la incubación a un análisis para la determinación de la fibra detergente neutro y ácido de acuerdo al procedimiento recomendado por el fabricante para el incubador DaisyII[®] (ANKOM Technology, Fairport, New York, USA).

Análisis estadístico. Se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2x4. Se realizó análisis de varianza con el procedimiento GLM del SAS v9.3 (SAS, 2011). El modelo ajustado incluyó los efectos del tratamiento, tiempo de fermentación y la interacción entre estos dos factores. La ecuación del modelo que se ajustó fue la siguiente (ecuación 7):

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + H_j + TH_{ij} + \varepsilon_{ijk} \quad (7)$$

donde Y_{ijk} = la variable dependiente; μ = media global; T_i = efecto del tratamiento ($i = 1, 2$); H_j = efecto del tiempo ($j = 1, 2, 3, 4$); TH_{ij} = efecto de la interacción y ε_{ijk} = error experimental.

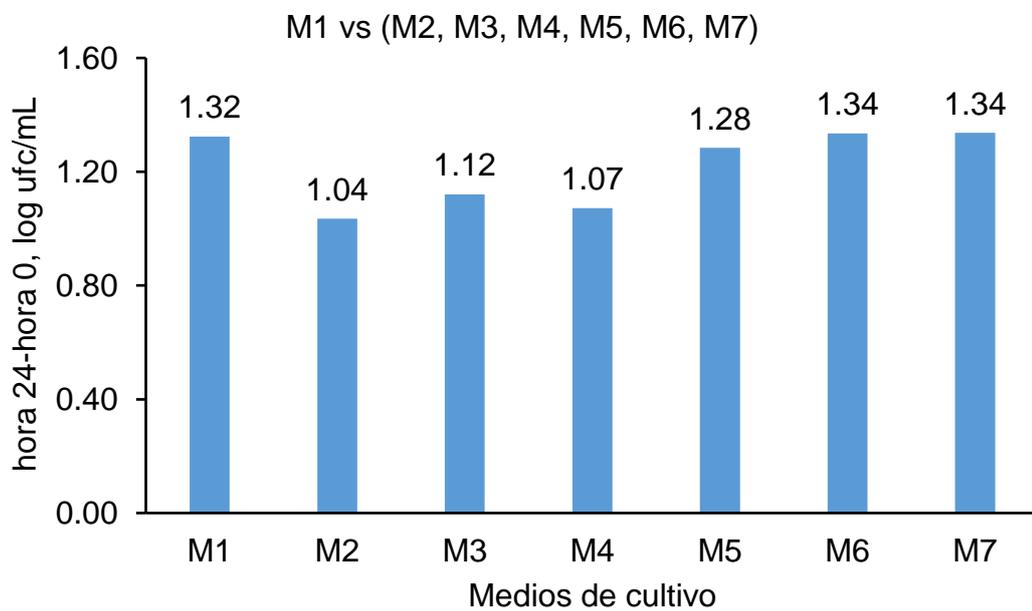
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Diseño de un Medio de Cultivo Económico para el Crecimiento de LEVICA-27

Los cultivos iniciales de LEVICA-27 en los siete medios de cultivo estudiados tuvieron una concentración de 10^6 ufc/mL. Luego de 24 horas de fermentación, se obtuvieron concentraciones alrededor de 10^7 ufc/mL lo que evidencia el crecimiento de la cepa. En la Gráfica 2 se muestra el incremento de las concentraciones celulares a la hora 24 para los medios de cultivo evaluados.

No se encontraron diferencias ($P > 0.05$) entre los medios estudiados (M2, M3, M4, M5, M6 y M7) cuando se comparan con M1. Por lo que los medios de cultivo con fuentes no convencionales, permitieron el mismo crecimiento de la levadura que el medio convencional (M1) y este último puede sustituirse por los demás sin afectar el crecimiento de la cepa.

Wang *et al.* (2012) y Roepcke *et al.* (2011) emplearon medios de cultivo para el crecimiento de *Pichia guilliermondii* similares a M3, M4, M5 y M6 y encontraron concentraciones elevadas de biomasa (10 g/L). Este valor es 5 veces mayor al obtenido con LEVICA-27 (2.57 g/L) en melaza y urea (resultados no publicados). De acuerdo con estos resultados, se esperaba obtener mayor concentración de biomasa en estos medios de cultivo. Sin embargo, no hubo diferencia ($P > 0.05$) entre el crecimiento obtenido con el medio control (M1) y el resto de los medios evaluados, a pesar de que contenían fuentes minerales que estimulan el crecimiento celular. Este resultado inesperado pudiera relacionarse con otras variables del proceso de fermentación que se controlaron por los autores mencionados anteriormente.



Gráfica 2. Tasa de crecimiento (hora 24 - hora 0) de *Pichia guilliermondii* (LEVICA-27) cultivada a 30 °C y 110 rpm en los medios M1, M2, M3, M4, M5, M6 y M7. EE = 0.06; P = 0.07.

Tal es el caso de la concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo, la velocidad de agitación y el pH (Páez *et al.*, 2013).

Choi *et al.* (2002) determinaron la concentración de biomasa de cuatro cepas de levadura (*Candida utilis*, *Pichia stipitis*, *Kluyveromyces marxianus*, y *Saccharomyces cerevisiae*) en un medio con jugo de vegetales chinos y obtuvieron resultados entre 6 y 10 g/L. En este estudio se utilizaron variables de operación diferentes a las del presente trabajo. Los autores cultivaron las levaduras con un pH ajustado a 5.8 y velocidad de agitación de 200 rpm.

Además de las variables de operación, los modos de fermentación también juegan un papel importante en la obtención de elevadas concentraciones de biomasa. Shin *et al.* (2002) evaluaron el crecimiento de *Issatchenkia orientalis* DY252 en medios con glucosa y fructosa a temperaturas de 32 y 39 °C. Para ello, emplearon un cultivo por lotes (batch) y uno con alimentación incrementada (fed-batch). A 39 °C la viabilidad celular disminuyó en más del 50 % con respecto a los valores obtenidos con la temperatura de 32 °C y con alimentación incrementada el rendimiento celular aumentó un 10 % con respecto al cultivo por lotes. Por lo que es importante estudiar en investigaciones futuras estas variables que también influyen en el crecimiento de las levaduras para optimizar la producción a escalas mayores.

Tomando en cuenta los componentes de los medios de este experimento, se puede decir que LEVICA-27 utilizó tanto la glucosa y extracto de levadura presentes en el medio M1, como los azúcares presentes en la melaza (sacarosa fundamentalmente) y la urea como fuentes de carbono y nitrógeno respectivamente. En estudios similares donde se empleó el medio complejo NRF (Fluido no ruminal modificado por Elías, 1971) variando la

fuelle de carbono para determinar los requerimientos de una cepa de *Candida norvegensis*, se demostró que la misma utilizaba mayormente la glucosa como fuente de carbono con respecto a sacarosa y lactosa (Angulo *et al.*, 2019). Este mismo medio de cultivo fue evaluado por Marrero *et al.* (2015b) para el crecimiento de LEVICA-27 y encontraron que el mayor crecimiento (10^7 ufc/mL) se obtiene a las 48 h cuando se emplea sacarosa, resultado que coincide con lo obtenido en este trabajo con un medio de cultivo más simple. Esto demuestra la especificidad de cada especie de levadura, en cuanto a la utilización de fuentes de carbohidratos.

Además de ser la melaza una fuente de carbono por excelencia para el crecimiento de microorganismos, posee minerales como calcio, magnesio, hierro, potasio, zinc y otros factores de crecimiento (niacina, riboflavina, ácido pantoténico) en su composición que también favorecen el crecimiento celular y pudiera ser la razón por la cual LEVICA-27 no incrementó su crecimiento al añadir otras fuentes de estos mismos minerales.

Madigan *et al.* (1997) reconocen que las levaduras necesitan vitaminas y minerales para su desarrollo. Sin embargo, la magnitud de los requerimientos puede variar de una cepa a otra, de manera que no hay un comportamiento homogéneo en cuanto a los requerimientos de minerales o factores de crecimiento en las levaduras.

En el caso de LEVICA-27, la melaza de caña de azúcar aportó los minerales necesarios para obtener un crecimiento similar al que se obtuvo con el medio comercial M1. La posibilidad de prescindir de estos componentes permite simplificar el medio de cultivo, obteniéndose una producción de biomasa aceptable.

Con respecto a la fuente de nitrógeno, las levaduras utilizan este compuesto para la síntesis de proteína unicelular y las fuentes más empleadas son amoníaco, urea y aminoácidos. En este ensayo se utilizó urea por ser la fuente de nitrógeno más económica a nivel mundial y su empleo no afectó el crecimiento de LEVICA-27. De acuerdo con estos resultados, Marrero *et al.* (2015b) al estudiar diferentes fuentes de nitrógeno para el crecimiento de esta cepa encontró que los mayores valores de densidad óptica se obtuvieron con el empleo de caseína, urea y triptona, valores que duplican los obtenidos en presencia del sulfato de amonio. Sin embargo, otros autores demostraron que *Candida norvegensis* no hidroliza la urea y consume mejor triptona o caseína (Cárdenas, 2000; Angulo, 2012).

Teniendo en cuenta la ausencia de diferencia de los medios evaluados con respecto al medio convencional, se seleccionó el medio M2 para ser empleado en el crecimiento de LEVICA-27. Para su elección se tuvieron en cuenta algunas consideraciones: el medio M2 además de permitir el crecimiento de LEVICA-27 en concentraciones similares al control, tiene la menor cantidad de componentes; solo contiene melaza y urea que son fuentes de nutrientes económicas para el crecimiento de levaduras y su costo representa aproximadamente el 0.26 % del costo del medio convencional.

Además del aspecto económico, el empleo de medios de cultivo simples es muy importante para la producción de biomasa a niveles industriales. Esto se debe a la disminución del tiempo que se emplea en su preparación durante el proceso tecnológico. En resumen, la simplicidad del medio M2 le permite ser el más adecuado desde el punto de vista técnico-

económico. Esta ventaja facilita la producción de la levadura a escalas superiores donde no sea factible el empleo de medios convencionales.

Cinética de Crecimiento de LEVICA-27 en un Medio con Melaza y Caldo YPG

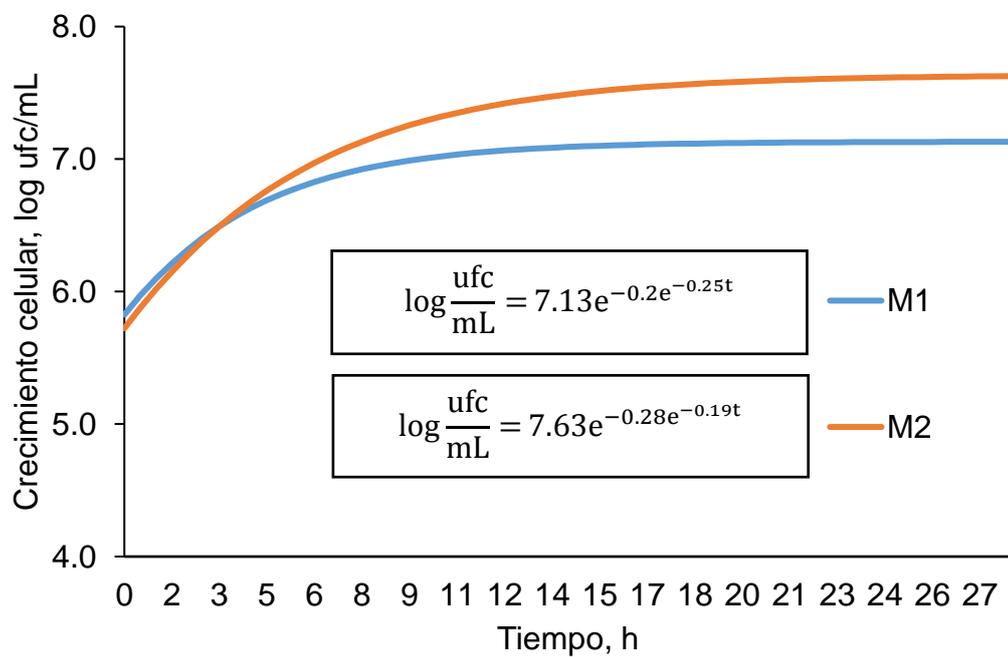
Derivado del acápite anterior, se estudió con más detalle el crecimiento de LEVICA-27 en el medio de cultivo M2. En la Gráfica 3 se muestra la cinética de crecimiento de LEVICA-27 en los medios M2 y M1 mediante el ajuste del modelo de Gompertz. Las ecuaciones 8 y 9 corresponden a los ajustes de dicho modelo para los medios M1 y M2 respectivamente.

$$\log \frac{\text{ufc}}{\text{mL}} = 7.13e^{-0.2e^{-0.25t}} \quad (8)$$

$$\log \frac{\text{ufc}}{\text{mL}} = 7.63e^{-0.28e^{-0.19t}} \quad (9)$$

En este caso solo se analizó el parámetro A del modelo que corresponde con la máxima concentración de biomasa. Como se observa este parámetro tiene un valor de 7.13 log ufc/mL para el medio M1 y 7.63 log ufc/mL para el medio M2. En este último se obtuvo una mayor concentración celular que la obtenida en el medio control ($t_{\text{cal}} = 9.72$; $t_{\text{crít}} = 1.69$).

A diferencia del primer ensayo, en el presente experimento se obtuvo una concentración celular en el medio M2 superior a M1. De ahí la importancia de determinar en cada horario el crecimiento de los microorganismos debido a la presencia de diferentes fases del crecimiento donde resulta interesante conocer la duración de la fase exponencial y detener la fermentación al final de esta.



Gráfica 3. Cinética de crecimiento de *Pichia guilliermondii* (LEVICA-27) en los medios M1 ($R^2=0.99$) y M2 ($R^2=0.99$) cultivada a 30 °C y 110 rpm.

Se asume que la fase exponencial del crecimiento de LEVICA-27 en los medios M1 y M2 ocurre antes de las 24 horas de fermentación, por lo que en este estudio se determinó a través de la modelación del crecimiento de la levadura el valor máximo de concentración; los cuales son resultados similares (7.81 log ufc/mL; alrededor de las 16 horas de fermentación) a los encontrados por Aguilar *et al.*, (2015) quienes utilizaron el modelo Gompertz modificado para evaluar el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada en un medio con melaza y suero lácteo.

Con los resultados presentados hasta el momento se puede plantear que el medio M2 constituye la opción más adecuada para la producción de LEVICA-27 como aditivo para la alimentación animal.

Efecto del Cultivo de LEVICA-27 en la Fermentación Ruminal *in Vitro* del Rastrojo de Maíz

En el Cuadro 4 se muestran los resultados de la fermentación ruminal *in vitro* del rastrojo de maíz con la adición de la LEVICA-27 en su medio de cultivo. Como se observa, no hubo efecto ($P > 0.05$) de la inclusión de la levadura para las variables pH, N-NH₃, % FDN, %FDA, % DIVMS, % DIVFDN y % DIVFDA; pero sí hubo diferencia ($P < 0.05$) en los tiempos de incubación para las variables mencionadas.

En el pH no se encontró interacción entre los tratamientos y el tiempo de medición ($P > 0.05$), ni efecto del tratamiento ($P > 0.05$), pero sí entre los diferentes tiempos de medición ($P < 0.05$). Como se puede observar, el pH se mantuvo en valores cercanos a la neutralidad durante todo el experimento (6.7- 6.9), los cuales se consideran dentro del rango fisiológico del pH del líquido ruminal (Oeztuerk *et al.*, 2005).

Cuadro 4. Efecto del cultivo de *Pichia guilliermondii* (LEVICA-27) en la fermentación ruminal *in vitro* del rastrojo de maíz

Variables	Tratamientos		EE	Probabilidad (P)		
	Control	Levica 27		Tto	Tiempo	Tto x tiempo
pH						
0	6.88 ^a	6.91 ^a	0.05	0.1	<0.0001*	0.68
6	6.70 ^b	6.73 ^b				
12	6.87 ^a	6.92 ^a				
24	6.94 ^a	6.94 ^a				
N-NH3 (mmol/mL)						
0	15.74 ^a	7.81 ^a	4.18	0.82	<0.0001*	0.91
6	30.50 ^b	33.42 ^b				
12	107.46 ^c	98.07 ^c				
24	113.97 ^d	119.78 ^d				
% FDN						
6	64.26 ^a	63.18 ^a	3.08	0.17	0.005*	0.68
12	63.75 ^{ab}	60.40 ^{ab}				
24	58.57 ^b	57.66 ^b				
% FDA						
6	35.59	34.88	2.05	0.71	0.12	0.85
12	35.57	34.98				
24	33.14	33.50				
% DIVMS						
6	36.79 ^a	37.88 ^a	3.09	0.17	0.005*	0.68
12	37.33 ^{ab}	40.67 ^{ab}				
24	42.49 ^b	43.40 ^b				
% DIVFDN						
6	26.41 ^a	27.94 ^a	2.73	0.24	0.02*	0.93
12	28.28 ^{ab}	29.99 ^{ab}				
24	30.98 ^b	31.76 ^b				
% DIVFDA						
6	12.96 ^a	15.05 ^a	3.75	0.16	0.01*	0.92
12	15.69 ^{ab}	18.66 ^{ab}				
24	19.73 ^b	21.26 ^b				

*Medias diferentes para la variable tiempo con $P < 0.05$

Estos valores coinciden con el pH que se registra cuando se suministran sustratos fibrosos de baja calidad como el que se empleó en este ensayo y coinciden con los resultados reportados por Marrero *et al.* (2006) y Ruiz *et al.* (2016) cuando estudiaron el efecto de diferentes especies de levaduras en la fermentación ruminal *in vitro* de sustratos fibrosos.

La falta de diferencia observada en los resultados de pH, puede ser debido a que cuando se utilizan dietas altas en fibra, una de las poblaciones microbianas que se establecen en el rumen son las bacterias metanogénicas, las cuales utilizan el hidrógeno (H₂) y el dióxido de carbono (CO₂) para la formación de metano. La utilización de estos gases por parte de dichas bacterias, sobre todo el H₂, contribuye a la estabilización del pH ruminal (Galindo *et al.*, 2010).

Los efectos de los cultivos de levaduras en el pH ruminal que se reportan en la literatura son variables, dependiendo sobre todo de las condiciones experimentales (Moya *et al.*, 2009). Dentro de los principales factores que afectan estos resultados se encuentran la composición de las dietas evaluadas (Díaz *et al.*, 2017; Anjum *et al.*, 2018; Vallejo-Hernández *et al.*, 2018; Cherdthong *et al.*, 2019) y la especie de levadura que se utiliza (Ruiz *et al.*, 2016).

Autores como Chaucheyras-Durand y Fonty (2008) demostraron que las levaduras principalmente pueden aumentar el pH ruminal o disminuir su variabilidad cuando se utilizan dietas altas en concentrado, debido a una disminución en la concentración de lactato, atribuido a las interacciones que se establecen entre las células de levadura y las bacterias que metabolizan el lactato (Chaucheyras-Durand *et al.*, 2008).

Chaucheyras *et al.* (1996) demostraron que en condiciones *in vitro* las células de *Saccharomyces cerevisiae* fueron capaces de superar en número a las células de *Streptococcus bovis* cuando compiten por la utilización de azúcares, lo que trae como consecuencia menor producción de lactato por esta especie bacteriana.

En cuanto a los niveles de N-NH₃ (Cuadro 4), la concentración molar fue variando a través del tiempo ($P < 0.05$), sin embargo, no se observaron diferencias ($P > 0.05$) con la adición de la levadura. Se obtuvieron valores entre 7 y 119 mmol/mL, los cuales se consideran elevados al compararlos con otros estudios similares donde esta concentración oscila entre 5 y 12 mmol/mL en dietas fibrosas (Guedes *et al.*, 2008; Ruiz *et al.*, 2016). Esta diferencia está dada por la presencia de urea en el medio de cultivo utilizado para el crecimiento de LEVICA-27 que se añadió como inóculo en las botellas de fermentación ruminal *in vitro*. De acuerdo con estos resultados, Vallejo-Hernández *et al.* (2018) no encontraron efecto de la adición de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* en los niveles de N-NH₃ durante la fermentación ruminal al emplear una ración totalmente mezclada (TMR) en estudios realizados con cabras, borregos y novillos. Pero los niveles de amoníaco encontrados en este estudio también resultaron elevados (66 mmol/mL) debido a que la dieta utilizada contenía 40 g de urea por kg de MS. Por otra parte, Díaz *et al.* (2017) reportaron incrementos en la concentración de amoníaco al añadir un hidrolizado de levaduras en líquido ruminal utilizando una relación 50:50 de forraje y concentrado como sustrato.

Sin embargo, Anjum *et al.* (2018) afirman que la adición de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* disminuye la concentración de este compuesto durante la fermentación ruminal de búfalos.

Se esperaba que con la adición del cultivo de LEVICA-27, los porcentajes de FDN y FDA disminuyeran y los porcentajes de DIVMS, DIVFDN y DIVFDA aumentaran, sin embargo, no hubo variación. De acuerdo con estos resultados, Ferriere (2017) no encontró efecto de dos levaduras comerciales (Ganadero PLUS® y LEVUCCELL SC-10®) cuando estudió los porcentajes de digestibilidad de la FDN y FDA (43.88 % y 39.84 % respectivamente) durante 72 horas de fermentación *in vitro* con heno de alfalfa como sustrato, coincidiendo también con lo reportado por Suntara (2020) quien no encontró diferencias en la digestibilidad aparente de la MS, FDN y FDA al añadir dos cepas de levaduras (*Pichia kudriavzevii* y *Candida tropicalis*) en la fermentación ruminal *in vitro* con un ensilaje de paja de arroz.

Usando como sustrato rastrojo de maíz, Angeles *et al.* (1999) y Crosby *et al.* (2011) tampoco encontraron mejoras en la fermentación ruminal al añadir cepas de levaduras comerciales (*Saccharomyces cerevisiae*) en dosis crecientes de 0.015 hasta 7 g/día y los resultados de digestibilidad oscilan entre 55-64 % DMS; 57-61 % DFDN y 25.28 % DFDA.

Por otra parte, algunos estudios demostraron mejoras en los indicadores de digestibilidad de la MS y la FDN cuando se evaluaron dietas fibrosas, debido fundamentalmente a que incrementaron el número de bacterias y hongos celulolíticos y su actividad fibrolítica (Tang *et al.*, 2008; Barragán *et al.*, 2009; Chaucheyras-Durand *et al.*, 2015; Ruiz *et al.*, 2016; Anjum *et al.*, 2018; Farghaly y Hamdon, 2018).

El efecto de cultivos de levaduras en la digestibilidad de la MS, FDA y FDN ha sido inconsistente tanto en estudios *in vitro*, como en estudios *in vivo* en becerros y en vacas lecheras. Estas inconsistencias se relacionan entre otros factores a la especie de levadura estudiada (Ando *et al.*, 2006; Marrero *et al.*, 2015; Castillo *et al.*, 2016), y al tipo de dieta que se utilice (Chaucheyras-Durand *et al.*, 2015). Con respecto a cómo influye el tipo de dieta, Roa *et al.* (1997) señalaron que la calidad del forraje interfiere en la digestión de la fibra cuando se evalúa la adición de cultivos de levaduras, refiriendo que las mejores respuestas se obtienen con forrajes de mejor calidad.

Por el contrario, Castillo *et al.* (2016) encontraron que la adición de un cultivo de *Candida norvegensis* aumentó la producción de gas que está estrechamente relacionada con la digestibilidad de componentes fibrosos, tanto cuando utilizaron como sustrato heno de alfalfa, como cuando utilizaron paja de avena. En este estudio también se observó influencia de la especie de levadura, ya que el cultivo de *Candida norvegensis* incrementó la producción de gas con respecto a *Saccharomyces cerevisiae*. En correspondencia a lo encontrado por estos últimos autores, Dawson y Tricarico (2002) sugieren que las preparaciones de levaduras son menos eficaces cuando los animales se alimentan con dietas bien equilibradas que favorecen la estabilidad de la población microbiana gastrointestinal y que es probable que se tengan resultados prometedores con dietas altas en forrajes.

Dawson y Hopkins (1991) señalaron que no todas cepas de levaduras son capaces de estimular a las bacterias ruminales ya que, de un total de 50 cepas evaluadas, solo 7 cepas fueron capaces de estimular el crecimiento de bacterias que digieren fibra.

En el Cuadro 5 se muestra el comportamiento de la concentración de los AGV's. En este caso, hubo interacción ($P < 0.05$) del tratamiento con horario de muestreo para la concentración molar de cada AGV y la relación C2:C3. La inclusión de LEVICA-27 aumentó la concentración molar ($P < 0.05$) de los AGV's totales, acético y propiónico en líquido ruminal y disminuyó la proporción C2:C3 ($P < 0.05$) solamente a las 12 horas de fermentación. La proporción óptima de AGV's en el rumen tiene una concentración de acetato de 65 a 70 %, propionato de 20 a 25 % y butirato de 10 a 15 % (Cherdthong *et al.*, 2019), cuyos valores se encuentran en correspondencia con los porcentajes obtenidos en este trabajo donde los promedios de AGV's son de 66.1, 20.5 y 13.2 % de acetato, propionato y butirato respectivamente.

Los resultados encontrados en la literatura con respecto a la concentración molar de AGV's totales o individuales también son inconsistentes (Miller-Webster *et al.*, 2002; Oetztuerk, 2009; Chaucheyras-Durand *et al.*, 2015; Cherdthong *et al.*, 2019). Resultados similares a los encontrados en el presente trabajo fueron reportados por Oetztuerk *et al.* (2005) y Kowalik *et al.* (2012).

En correspondencia a nuestros resultados, Ruiz *et al.* (2016) cuando estudiaron el efecto de un cultivo de *Candida norvegensis* en la fermentación ruminal *in vitro* de la paja de avena, reportaron que la concentración molar de acético, propiónico y butírico aumentó con respecto al control solo entre las 8 y 12 horas. Estos resultados donde la inclusión de cultivos de levaduras en dietas fibrosas aumenta la concentración molar de AGV's totales, acético y propiónico entre las 8 y 12 h puede ser debido a que estos cultivos tienden a disminuir la fase de retraso (lag time; Lila *et al.* 2004; Tang *et al.* 2008) que

Cuadro 5. Efecto del cultivo de *Pichia guilliermondii* (LEVICA-27) durante la fermentación ruminal *in vitro* en la producción de ácidos grasos volátiles

	Tratamientos		EE	P
	Control	LEVICA- 27		
Acético, mmol/mL				
0h	5.9 ^a	5.9 ^a	0.50	0.03*
6h	6.7 ^a	7.6 ^a		
12h	8.8 ^a	12.2 ^b		
24h	18.6 ^c	18.0 ^c		
Propiónico, mmol/mL				
0h	1.1 ^a	1.1 ^a	0.07	<0.0001*
6h	2.3 ^b	2.5 ^b		
12h	2.1 ^b	4.2 ^c		
24h	6.1 ^d	6.3 ^d		
Butírico, mmol/mL				
0h	0.5 ^a	0.5 ^a	0.31	0.0008*
6h	1.6 ^{ab}	1.7 ^{ab}		
12h	1.5 ^{ab}	2.8 ^b		
24h	10.9 ^d	7.2 ^d		
AGV's totales, mmol/mL				
0h	7.4 ^a	7.4 ^a	0.59	0.0005*
6h	10.7 ^{ab}	11.7 ^b		
12h	12.5 ^b	19.2 ^c		
24h	35.5 ^d	31.4 ^d		
C2: C3				
0h	5.3 ^a	5.3 ^a	0.22	0.01*
6h	2.9 ^c	3.0 ^c		
12h	4.1 ^b	2.9 ^c		
24h	3.1 ^c	2.9 ^c		

* Medias con letras distintas indican diferencias significativas a $P < 0.05$

como es conocido, es la fase de inactividad y entre menos dure esta fase, más rápido comienza la actividad de las bacterias ruminales incrementando las tasas de digestión, pero no el incremento en la extensión de la digestión por parte estos microorganismos (Lila *et al.*, 2004). En este sentido, de que las levaduras tienen sus mayores efectos en las primeras horas de fermentación, Callaway y Martin (1997) al estudiar el efecto de una levadura en la desaparición de celulosa, encontraron que los mejores resultados fueron en las primeras 24 h y no hubo efecto después de 48 h.

Contrario a lo encontrado en nuestro trabajo, Marrero *et al.* (2006), no reportaron efecto en la concentración molar de AGV's totales cuando evaluaron diferentes cepas de levaduras en la fermentación ruminal de vacas que consumieron dietas fibrosas. Similar a este último estudio Moya *et al.* (2009) tampoco observaron diferencias con la inclusión de un cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* en la concentración molar de AGV's ni en la relación C2:C3 en vaquillas Holstein consumiendo una dieta de transición.

La disminución de la relación C2:C3 del tratamiento con levadura con respecto al control encontrada en este estudio ($P < 0.05$) se explica por la mayor concentración molar de propionato del tratamiento con levadura, lo que trae como consecuencia cambios en la proporción molar de AGV's en el rumen. Resultados similares a este estudio donde se encontraron mayores concentraciones de propionato fueron reportados por Lila *et al.*, (2004) y Ruiz *et al.*, (2016). Lila *et al.*, (2004) refieren que uno de los principales efectos de los cultivos de levaduras es incrementar la concentración de propionato a expensas de la concentración de acetato.

Esto podría deberse a las fracciones peptídicas de las células de levadura que estimulan el crecimiento de *Megasphaera elsdenii*, el principal microorganismo consumidor de lactato en el rumen y lo utiliza para producir propionato a través de la vía del acrilato (Cherdthong *et al.*, 2019). Además, los cultivos de levadura proporcionan vitaminas (tiamina), glucanos, mananoproteínas y ácidos orgánicos que estimulan el crecimiento de microorganismos que digieren la fibra y consumen ácido láctico (Oeztuerk *et al.*, 2005).

Los resultados sugieren que LEVICA-27 podría mejorar la utilización de la energía de los alimentos con fines de producción, debido al incremento del potencial gluconeogénico de la dieta a partir de la mayor proporción de propionato. Es bien sabido que el propionato es el único AGV que contribuye a la gluconeogénesis hepática, además de ser el más eficiente energéticamente porque su producción se relaciona indirectamente con los metanógenos por el uso del hidrógeno metabólico (Miller-Webster *et al.*, 2002; Guedes *et al.*, 2008).

El efecto estimulador que tienen los cultivos de levaduras en la mayor producción de AGV's totales e individuales cuando se utilizan dietas fibrosas, puede estar explicado por sus propios mecanismos de acción, ya que se ha demostrado que las levaduras vivas consumen el oxígeno que entra al rumen a través de los alimentos, rumia o la salivación y esto trae consigo mejores condiciones de anaerobiosis, lo que facilita el crecimiento de la mayoría de los microorganismos anaeróbicos como bacterias y hongos celulolíticos (Seo *et al.*, 2010; Newbold y Wallace, 1996). Una disminución del potencial redox en corderos, ovejas y vacas fueron reportados por Chaucheyras-Durand *et al.*

(2012) cuando incluyeron levaduras vivas en la alimentación de estos animales.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El medio de cultivo seleccionado constituye una opción adecuada para la producción de LEVICA-27, pues además de obtenerse mejores parámetros de crecimiento que en el medio control, incluye menos componentes en su preparación lo que ofrece ventajas económicas y operacionales para la obtención del aditivo y su posterior evaluación en estudios *in vivo* relacionados con la nutrición de animales rumiantes.

La adición de LEVICA-27 en la fermentación ruminal *in vitro* con un sustrato fibroso de baja calidad no tuvo efecto en el pH ruminal, concentración de N-NH₃, ni en indicadores de degradabilidad de la fibra y digestibilidades de la MS, FDN y FDA. Sin embargo, a las 12 horas de fermentación, la producción total de AGV's, así como las cantidades molares de ácido acético y propiónico fueron mayores cuando se utilizó la levadura.

Por esta razón, se puede decir que LEVICA-27 parece tener un efecto estimulador de la fermentación ruminal entre las 6 y 12 horas. Este resultado debe tenerse en cuenta para posteriores estudios *in vivo* donde se suministren las levaduras dos veces al día (cada 12 horas) y comprobar nuevamente este efecto.

Se recomienda hacer estudios con esta cepa de levadura donde se utilicen sustratos con mayor aporte de nutrientes, diferentes dosis de inclusión de la levadura y tener en cuenta para estudios *in vivo*, la adición de este aditivo microbiano dos veces al día para mantener por más tiempo el efecto de las levaduras en el rumen.

LITERATURA CITADA

- Aguilar, M. Espinoza, J. Cabanillas, I. Ávila, A. García, J. Julca, D. Tacanga, I. Zuta, y G. Linares. 2015. Evaluation of the growth kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* using a culture medium based on cane molasses and whey. *Agro. Sci.* 1:37–47. doi:10.17268/agroind.science.2015.01.04.
- Ando, S., Y. Nishiguchi, K. Hayasaka, H. Lefuji y J. Takahashi. 2006. Effects of *Candida utilis* treatment on the nutrient value of rice bran and the effect of *Candida utilis* on the degradation of forages *In vitro*. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* 19: 806-811
- Angeles, C., M. Mendoza, P. Cobos, G. Crosby y P. Castrejon. 1999. Comparison of two commercial yeast cultures (*Saccharomyces cerevisiae*) on ruminal fermentation and digestion in sheep fed on corn-stover diet. *Small Rum. Res.*, 31: 45-50.
- Angulo, C. 2012. Crecimiento y requerimientos nutricionales de la levadura *Candida norvegensis* como activador ruminal. Tesis de Doctor in Philosophia. Facultad de Zootecnia y Ecología. Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua.
- Angulo, M. C., O. Ruiz-Barrera, Y. Castillo, Y. Marrero, A. Elías, C. Arzola y D. Díaz. 2013. Dinámica de crecimiento y metabolitos producidos en la fermentación de la levadura *Candida norvegensis*. *Cuban. J. Agric. Sci.* 47: 179-182.
- Angulo, M. C., O. Ruiz, Y. Castillo, Y. Marrero, A. Elías, A., A. Estrada-Angulo, y L. Carlos-Valdez. 2019. Growth of *Candida norvegensis* (strain Levazoot 15) with different energy, nitrogen, vitamin, and micromineral sources. *Braz. J. Microbiol.* 50: 533-537.
- Anjum, M. I., S. Javaid, y M. S. Ansar. 2018. Effects of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) supplementation on intake, digestibility, rumen fermentation and milk yield in Nili-Ravi buffaloes. *Iranian. J. Vet. Res.* 19:96–100.
- AOAC, Association Official Analytical Chemists. 2005. Official methods of analysis of AOAC International. pp 486. 18a ed. Maryland, E. U. A.
- Bach, A., C. Iglesias, y M. Devant. 2007. Daily rumen pH pattern of loose-housed dairy cattle as affected by feeding pattern and live yeast supplementation. *Anim. Feed Sci. Tech.* 136: 146–153.
- Barragán, R. M., V. A. Ruiz, R. R. Ramírez, J. A. R. Serrano, y A. L. González. 2009. Efecto de la adición de un cultivo de levaduras y de la ración sobre la degradación *in vitro* y productividad de corderos Pelibuey. *Tec. Pec. en Mex.* 47:41–53.
- Bayatkouhsar, J., A. M. Tahmasebi, A. A. Naserian, R. R. Mokarram, y R.

- Valizadeh. 2013. Effects of supplementation of lactic acid bacteria on growth performance, blood metabolites and fecal coliform and lactobacilli of young dairy calves. *Ani. Feed Sci. Tech.* 186:1–11. doi:10.1016/j.anifeedsci.2013.04.015.
- Beharka, A. A., T. G. Nagaraja, y J. L. Morrill. 1991. Performance and Ruminal Function Development of Young Calves Fed Diets with *Aspergillus oryzae* Fermentation Extract. *J. Dairy Sci.* 74:4326–4336. doi:10.3168/jds.S0022-0302(91)78628-1.
- Bocourt, R., L. Savón, J. Díaz, M. A. Brizuela, P. Serrano, A. Prats, y A. Elias. 2004. Efecto de la actividad probiótica de *Lactobacillus rhamnosus* en indicadores productivos y de salud de cerdos jóvenes. *Cub. J. Agr. Sci.* 38: 79-83.
- Broderick, G. A., y J. H. Kang. 1980. Automated Simultaneous Determination of Ammonia and Total Amino Acids in Ruminal Fluid and *In Vitro* Media. *J. Dairy Sci.* 63:64–75. doi:10.3168/jds.S0022-0302(80)82888-8.
- Buitrago, J. L., L. M. Muñoz Echeverría, y L. M. Cardona Bermúdez. 2017. Estimación de la cinética de crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en suero lácteo. *Encuentro Sennova del Oriente Antioqueño* 3:97–103.
- Callaway, E. S., y S. A. Martin. 1997. Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* Culture on Ruminal Bacteria that Utilize Lactate and Digest Cellulose. *J. Dairy Sci.* 80:2035–2044. doi:10.3168/jds.S0022-0302(97)76148-4.
- Cárdenas, C.D. 2000. Levaduras del género *Candida* de procedencia clínica. Evaluación de métodos de identificación. Tesis presentada como requisito parcial de Doctor in Philosophia. Universidad de la Laguna. Canarias. Tenerife. España.
- Carrillo, L. M., M. A. Zarate, E. J. Wong Paz, y D. B. Muñiz. 2010. Producción de biomasa de *Candida utilis* (HENNEBERG) a partir de melaza. *Tecnocien.* 4:32–40.
- Carro, M.D., y M. J. Ranilla. 2002. Aditivos antibióticos promotores de crecimiento de los animales: situación actual y posibles alternativas. *Sitio Argentino de Producción Animal*. [Internet], [20 agosto 2020]. Disponible: http://www.produccionanimal.com.ar/informacion_tecnica/invernada_promotores_crecimiento.htm.
- Castillo, Y. 2009. Fermentación *in vitro* para obtener la levadura *Candida norvegensis* en mezclas de alfalfa con bagazo de manzana fermentado y sus efectos sobre la actividad microbiana. Disertación de Doctorado, de la Facultad de Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chih., Chih. México.

- Castillo C.Y., B. O. Ruiz, B. M. E. Burrola. 2016. Isolation and characterization of yeasts from fermented apple bagasse as additives for ruminant feeding. *Braz. J Microbiol.* 47:889-895.
- Castillo R. F., Villalobos V. G., Domínguez D. D., y Ortega G. J. Á. 2017. Effect of the dietary level of cull pinto beans (*Phaseolus vulgaris*) on ruminal fermentation, kinetics, and digestibility of hair lambs. *Braz. J. Anim. Sci.* 46: 405-412. doi: 10.1590/S1806-92902017000500006.
- Chaucheyras, F., G. Fonty, G. Bertin, J.M. Salmon y P. Gouet. 1996. Effects of a strain of *Saccharomyces cerevisiae* (Levucell SC), a microbial additive for ruminants, on lactate metabolism *in vitro*. *Can. J. Microbiol.* 42:927–933.
- Chaucheyras-Durand, F y G. Fonty. 2008. Effects and modes of action of live yeasts in the rumen. *Biología (Bratislava)* 61: 741-750.
- Chaucheyras-Durand, F., N. D. Walker y A. Bach. 2008. Effects of active dry yeasts on the rumen microbial ecosystem: past, present and future. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 145:5-26.
- Chaucheyras-Durand, F., E. Chevaux, C. Martin y E. Forano. 2012. Use of yeast probiotics in ruminants: effects and mechanisms of action on rumen pH, fibre degradation, and microbiota according to the diet. In *Probiotic in Animals* ed. Rigobelo, E.C. pp. 119–152, Rijeka: Intech.
- Chaucheyras-Durand F., A. Ameilbonne, A. Bichat, P. Mosoni, F. Ossa y E. Forano. 2015. Live yeasts enhance fibre degradation in the cow rumen through an increase in plant substrate colonization by fibrolytic bacteria and fungi. *J. Appl. Microb.* 120:560-570.
- Cherdthong, A., R. Prachumchai, C. Supapong, B. Khonkhaeng, M. Wanapat, S. Foiklang, N. Milintawisamai, N. Gunun, P. Gunun, P. Chanjula, y S. Polyorach. 2019. Inclusion of yeast waste as a protein source to replace soybean meal in concentrate mixture on ruminal fermentation and gas kinetics using *in vitro* gas production technique. *Ani. Prod. Sci.* 59:1682–1688. doi:10.1071/AN18491.
- Choi, M. H., G. E. Ji, K. H. Koh, Y. W. Ryu y Y. H. Park. 2002. Use of waste Chinese cabbage as a substrate for yeast biomass production. *Biores. Tech.* 83: 251-253.
- 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. doi:10.3168/jds.2010-3277.
- Collado, M. C., J. Meriluoto, y S. Salminen. 2007. Measurement of aggregation properties between probiotics and pathogens: *In vitro* evaluation of different methods. *J. Microb. Meth.* 71:71–74.

doi:10.1016/j.mimet.2007.07.005.

- Cortés-Sánchez, A. D., L. M. Guadarrama, y M. Díaz-Ramírez. 2014. Producción de biomasa a partir de *Aspergillus oryzae* en cultivo sumergido. *Biotec.* 16:11. doi:10.18633/bt.v16i3.106.
- Crosby, M. M., G. D. Mendoza, R. Bárcena, S. González y E. Aranda. 2011. Influence of *Saccharomyces cerevisiae* Dose on Ruminant Fermentation and Digestion in Sheep Fed a Corn Stover Diet *J. Applied.* 21:19. doi:10.1080/09712119.2004.9706465.
- Crueger, W. y A. Crueger. 1993. *Biotechnología: manual de microbiología industrial.* (No. 575.162 CRUb).
- Dawson, K. A. y D.M. Hopkins. 1991. Differential effects of live yeast on the cellulolytic activities of anaerobic ruminal bacteria. *J. Anim. Sci.* 69:531.
- Dawson, K.A. y J. Tricarico. 2002. The evolution of yeast cultures-20 years of research. In: *Navigating from Niche Markets to Mainstream. Proceedings of Alltech's European, Middle Eastern and African Lecture Tour*, pp 26-43.
- De Angelis, M., S. Siragusa, M. Berloco, L. Caputo, L. Settanni, G. Alfonsi, M. Amerio, A. Grandi, A. Ragni, y M. Gobbetti. 2006. Selection of potential probiotic lactobacilli from pig feces to be used as additives in pelleted feeding. *Res. Microbiol.* 157:792-801. doi:10.1016/j.resmic.2006.05.003.
- Díaz, A., E. Castillo, P. Martín., y J. L. Hernández. 2005. Comportamiento productivo de añejos Cebú en pastoreo de asociación de glycine (*Neonotonia wightii*) y pasto natural, suplementados con un activador de la fermentación ruminal. *Cuban J. Agr. Sci.* 39:287-291.
- Díaz, A., E. Castillo, P. Martín., y J. L. Hernández. 2009. Ceba de toros mestizos lecheros, en silvopastoreo con leucaena, acceso a banco de biomasa y suplemento activador del rumen. *Cuban J. Agr. Sci.* 43: 235-238.
- Díaz, A., E. Castillo, P. Martín, y J. L. Hernández. 2011. Preceba de machos bovinos mestizos lecheros en pastoreo con leguminosas herbáceas, banco de biomasa y suplemento activador del rumen. *Cub. J. Agr. Sci* 45:25-28.
- Díaz, A., M. J. Ranilla, C. Saro, M. L. Tejido, y M. D. Carro. 2017. Influence of increasing doses of a yeast hydrolyzate obtained from sugarcane processing on *in vitro* rumen fermentation of two different diets and bacterial diversity in batch cultures and Rusitec fermenters. *Anim. Feed Sci. Technol.* doi:10.1016/j.anifeedsci.2017.08.011.
- Doran, P. 2013. *Bioprocess Engineering Principles*, 2a Ed. Editorial Academic

Press. New York. EE. UU.

- Durmic, Z., P. J. Moate, R. Eckard, D. K. Revell, R. Williams, y P. E. Vercoe. 2014. *In vitro* screening of selected feed additives, plant essential oils and plant extracts for rumen methane mitigation. *J. Sci. Food Agric.* 94:1191–1196. doi:10.1002/jsfa.6396.
- Elghandour, M. M., V. Chagoyán, A. Z. Salem, A. E. Kholif, J. S. Castañeda, L. M. Camacho, y M. A. Cerrillo-Soto. 2014a. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* at direct addition or pre-incubation on *in vitro* gas production kinetics and degradability of four fibrous feeds. *Ital. J. Anim. Sci.* 13:295–301. doi:10.4081/ijas.2014.3075.
- Elghandour, M. M., J. C. Vázquez, A. Z. Salem, A. E. Kholif, J. S. Martínez Castañeda, L. M. Camacho, y G. Buendía. 2014b. *In Vitro* fermentative capacity of equine fecal inocula of 9 fibrous forages in the presence of different doses of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Equine Vet. Sci.* 34:619–625. doi:10.1016/j.jevs.2013.11.013.
- Elghandour, M. M., A. Z. Salem, J. S. Castañeda, L. M. Camacho, A. E. Kholif, y J. C. Chagoyán. 2015. Direct-fed microbes: A tool for improving the utilization of low quality roughages in ruminants. *J. Integr. Agric.* 14:526–533. doi:10.1016/S2095-3119(14)60834-0.
- Elías, A. 1971. The rumen bacteria of animals fed on a high-molasses-urea-diet. Tesis doctoral. University of Aberdeen. Aberdeen, United Kingdom.
- Fajardo, S., F. R. García-Galvan, V. Barranco, J. C. Galvan, y S. F. Batlle. 2016. Role of Pectin in Food Processing and Food Packaging. *Intech, (tourism)*, 13. <https://doi.org/10.5772/57353>
- Farghaly, M. M., y H. A. Hamdon. 2018. Effects of live yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) supplementation on nutrient digestibility, rumen fermentation and rumen microbial population count in sheep. *Egyptian. J. Ani. Prod.* 55:51–56.
- Ferraretto, L. F., R. D. Shaver, y S. J. Bertics. 2012. Effect of dietary supplementation with live-cell yeast at two dosages on lactation performance, ruminal fermentation, and total-tract nutrient digestibility in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95:4017–4028. doi:10.3168/jds.2011-5190.
- Ferrer-Romero, J. C., S. M. Mas-Diego, Y. Beltrán-Delgado, Y. Rodríguez-Quiala, y H. J. Morris Quevedo. 2019. Optimización del medio de cultivo para la producción de biomasa y compuestos fenólicos por *Pleurotus ostreatus* en fase sumergida utilizando la metodología de superficie de respuesta. *Chem. Tech.* 39: 1-16.
- Ferriere, Y. 2017. Evaluación del efecto de levaduras comerciales sobre la fermentación ruminal y digestibilidad de los nutrientes mediante un sistema de medición de gas *in vitro*. Tesis de Licenciatura. Escuela

Superior Politécnica de Chimborazo.

- Galindo, J. y Y. Marrero. 2005. Manipulación de la fermentación microbiana ruminal. *Cuban J. Agric. Sci.* 39: 439-450.
- Galindo, J., Y. Marrero, N. González, A. Sosa, A. L. Miranda, A. I. Aldana, O. Moreira, R. Bocourt, D. Delgado, V. Torres, L. Sarduy, y A. Noda. 2010. Efecto de preparados con levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y LEVICA-25 viables en los metanógenos y metanogénesis ruminal *in vitro*.
- Galyean, M. L. 1980. Analysis of volatile fatty acids in rumen fluid. En *Laboratory procedures in animal nutrition research*, pages 161-162. Animal Nutrition Laboratory. Department of Animal and Food Science. Texas Tech. University. Lubbock
- García-Hernández, Y., T. Pérez-Sánchez, R. Boucourt, J. L. Balcázar, J. R. Nicoli, J. Moreira-Silva, Z. Rodríguez, H. Fuertes, O. Nuñez, N. Albelo, y N. Halaihel. 2016. Isolation, characterization and evaluation of probiotic lactic acid bacteria for potential use in animal production. *Res. Vet. Sci.* 108: 125–132. doi:10.1016/j.rvsc.2016.08.009.
- Guedes, C. M., D. Goncalves, M.A.M. Rodrigues, y A. Dias-da-Silva. 2008. Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* yeast on ruminal fermentation and fibre degradation of maize silages in cows. *Anim. Feed Sci. Tech.* 145: 27–40.
- Haddad, S. G., y S. N. Goussous. 2005. Effect of yeast culture supplementation on nutrient intake, digestibility and growth performance of Awassi lambs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 118: 343–348. doi:10.1016/j.anifeedsci.2004.10.003.
- Hasan, S., M. Hossain, A. Miah, y M. Bhuiyan. 2014. Influences of Prebiotic on Growth Performance and Hemato-Biochemical Parameters in Broiler During Heat Stress. *Bangladesh J. Vet. Med.* 12: 121–125. doi:10.3329/bjvm.v12i2.21273.
- Henry, D. D., F. M. Ciriaco, y M. Kohmann. 2015. Effects of chitosan on nutrient digestibility, CH₄ emissions, and *in vitro* fermentation in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 93:3539–3550. doi:10.2527/jas2014-8844.
- Hernández, Y. G., D. S. Cossio, Y. L. García, P. J. C., L. G. Fernández y Y. M. Sánchez. 2018. Evaluación de un medio de cultivo para *Lactobacillus pentosus* LB-31, promotor del crecimiento animal. *Anuario Ciencia de la Universidad Agraria de La Habana (UNAH)* 15: 1-10.
- Hong, H. A., H. D. Le, y S. M. Cutting. 2005. The use of bacterial spore formers as probiotics. *Microbiol. Rev.* 29:813–835. doi:10.1016/j.femsre.2004.12.001.

- Huang, C., X. F. Chen, L. Xiong, L. L. Ma y Y. Chen. 2013. Single cell oil production from low-cost substrates: the possibility and potential of its industrialization. *Biotech. Adv.* 31: 129-139.
- Jiang, Y., I. M. Ogunade, K. G. Arriola, M. Qi, D. Vyas, C. R. Staples, y A. T. Adesogan. 2017. Effects of the dose and viability of *Saccharomyces cerevisiae*. Ruminal fermentation, performance of lactating dairy cows, and correlations between ruminal bacteria abundance and performance measures. *J. Dairy Sci.* 100:8102–8118. doi:10.3168/jds.2016-12371.
- Jiao, P. X., L. Y. Wei, N. D. Walker, F. Z. Liu, L. Y. Chen, K. A. Beauchemin, y W. Z. Yang. 2017. Comparison of non-encapsulated and encapsulated active dried yeast on ruminal pH and fermentation, and site and extent of feed digestion in beef heifers fed high-grain diets. *Anim. Feed Sci. Tech.* 228: 13-22.
- Karatay, S. y G. Donmez. 2010. Mejora de las propiedades de acumulación de lípidos de las células de levadura para la producción de biodiesel utilizando melaza. *Bioresour. Technol.* 101: 7988-7990.
- Kebreab, E., y J. Dijkstra. 2009. Impact of dietary modification on nitrogen and phosphorus flows through a livestock operation. Impact of CFI methodologies on whole-farm systems. In 30 the Western Nutrition Conference (pp. 78).
- Kenney, N. 2013. Impact of direct-fed microbials on nutrient utilization in beef cattle. Master's Thesis, college Agriculture. Animal and Food Sciences Department. University of Kentucky.
- Kmet, V., H. J. Flint, y R. J. Wallace. 1993. Probiotics and manipulation of rumen development and function. *Arch. Anim. Nut.* 44:1–10. doi:10.1080/17450399309386053.
- Kowalik, B., J. Skomial, J. J. Pająk, M. Taciak, M. Majewska, y G. Bełżecki. 2012. Population of ciliates, rumen fermentation heifers fed diets supplemented with yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) preparation. *Anim. Sci. Pap.* 30: 329-338.
- Krehbiel, C., S. R. Rust, G. Zhang, y S. Gilliland. 2003. Bacterial direct-fed microbials in ruminant diets: Performance response and mode of action. *J. Anim. Sci.* 81: E120-E132. doi:10.2527/2003.8114_suppl_2E120x.
- Lakshmidēvi, R., B. Ramakrishnan, S. K. Ratha, S. Bhaskar y S. Chinnasamy. 2021. Valorisation of molasses by oleaginous yeasts for Single Cell Oil (SCO) and carotenoids production. *Envir. Tech. Innov.* 21: 1-57.
- Leicester, H. C., P. H. Robinson, L. J. Erasmus. 2016. Effects of two yeast based direct fed microbials on performance of high producing dairy cows. *Anim. Feed Sci. Tech.* 215: 58-72.

- Lila, Z. A., N. Mohammed, T. Yasui, Y. Kurokawa, S. Kanda, y H. Itabashi. 2004. Effects of a twin strain of *Saccharomyces cerevisiae* live cells on mixed ruminal microorganism fermentation *in vitro*. J. Anim. Sci. 82:1847-1854.
- Madigan M.T., J. Martinko y J. Parker. 1997. Brock Biology of microorganisms. Eighth Edition, pp 109-148.
- Marrero, Y., J. Galindo, A. Elias, O. Moreira, y M. Cueto. 2006. Efecto de preparados biológicos con levaduras viables en la población microbiana ruminal e indicadores fermentativos en vacas que consumen dietas fibrosas. Cuban. J. Agric. Sci. 40: 339-348.
- Marrero, Y., O. Ruiz, A. Corrales, O. Jay, J. Galindo, y Y. Castillo. 2014. *In vitro* gas production of fibrous substrates with the inclusion of yeast. Cuban J. Agri. Sci. 48: 119-123.
- Marrero, Y., Y. Castillo, O. Ruiz, E. Burrola, y C. Angulo. 2015a. Feeding of yeast (*Candida spp.*) improves *in vitro* ruminal fermentation of fibrous substrates. J. Integr. Agric. 14: 514–519. doi:10.1016/S2095-3119(14)60830-3.
- Marrero, Y., C. A. Montoya, O. Ruiz, A. Elías y N. Madera. 2015b. Crecimiento de *Pichia guilliermondii* cepa Levica 27 en diferentes fuentes de energía y nitrógeno. Cuban. J. Agric. Sci. 49: 47-52.
- Marrero, Y., D. Sosa, R. Rodríguez, y Y. García. 2016. Inclusión de *Pichia guilliermondii* en diferentes medios de cultivos en la fermentación *in vitro* de *Cynodon nlemfuensis*. Cuban. J. Agric. Sci. 50: 403-409.
- Marrero, Y., J. Galindo, Y. Castillo, y O. Ruiz. 2020a. Development of yeast additives for feeding ruminants in Cuba. Cuban. J. Agric. Sci. 54: 457-469.
- Marrero, Y., R. Rodríguez, V. Torres, O. Jay, y J. Galindo. 2020b. Efecto de las levaduras en la producción de gas de *Cynodon nlemfuensis* en una incubación ruminal *in vitro*. Live. Res. Rural. Dev. 32:1-5.
- McDougall, E.I., 1948. Studies on ruminant saliva 1. The composition and output of sheep's saliva. Biochem. J. 43: 99-109.
- Mercadante, V. R. G., K. M. Waters, G. H. L. Marquezini, D. D. Henry, F. M. Ciriaco, J. D. Arthington, N. Dilorenzo, y G. C. Lamb. 2015. Effects of anti-phospholipase A2 antibody supplementation on dry matter intake feed efficiency, acute phase response, and blood differentials of steers fed forage- and grain-based diets. J. Anim. Sci. 93: 776–785. doi:10.2527/jas.2014-7958.
- 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, M. Blanch, J. I. Fandiño, L. Castillejos, y I. Yoon. 2009. Effects of dietary changes and yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on rumen microbial fermentation of Holstein heifers. *J. Anim. Sci.* 87:2874–2881. doi:10.2527/jas.2008-1446.
- Newbold, C. J., y R. J. Wallace. 1996. Mode of action of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a feed additive for ruminants. *British J. Nutr.* 76:249–261. doi:10.1079/BJN19960029.
- Nocek, J. E., y W. P. Kautz. 2006. Direct-fed microbial supplementation on ruminal digestion, health, and performance of pre- and postpartum dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 89:260–266. doi:10.3168/jds.S0022-0302(06)72090-2.
- Oeztuerk, H., B. Schroeder, M. Beyerbach, y G. Breves. 2005. Influence of living and autoclaved yeasts of *Saccharomyces boulardii* on *in vitro* ruminal microbial metabolism. *J. Dairy Sci.* 88: 2594-2600. doi:10.3168/jds.S0022-0302(05)72935-0.
- Oeztuerk, H. 2009. Effects of live and autoclaved yeast cultures on ruminal fermentation *in vitro*. *J. Anim. Feed Sci.* 18: 142-150.
- Ortiz, Á., J. Reuto, E. Fajardo, S. Sarmiento, A. Aguirre, G. Arbeláez, D. Gómez, y B. Quevedo-Hidalgo. 2008. “in vitro” evaluation of the probiotic capacity of a native strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Univ. Sci.* 13: 138-148.
- Owen. *Biotechnology de la fermentación*. 1991. Edit. Arcibia. pp 27-51. Zaragoza. España.
- Páez, R., L. Lavari, G. Audero, A. Cuatrin, N. Zaritzky, J. Reinheimer, y G. Vinderola. 2013. Study of the effects of spray-drying on the functionality of probiotic lactobacilli. *Int. J. Dairy Technol.* 66:155–161. doi:10.1111/1471-0307.12038.
- Pérez, M., R. Piad, R. Bocourt, G. Milian, E. Medina-Medina, L. Savon, L. Sarduy, y M. Laurencio. 2005. Prebiotic and Probiotic Activity of an Enzymatic Hydrolysed of Alcohol Distillery Cream in Broilers. *Cienc. y Tecnol. Aliment.* 5:42–47. doi:10.1080/11358120509487670.
- Pinloche, E., N. McEwan, J. P. Marden, C. Bayourthe, E. Auclair, y C. J. Newbold. 2013. The effects of a probiotic yeast on the bacterial diversity and population structure in the rumen of cattle. *PLoS one*, 8: e67824.
- Qiao, G. H., A. S. Shan, N. Ma, Q. Q. Ma, y Z. W. Sun. 2010. Effect of supplemental *Bacillus* cultures on rumen fermentation and milk yield in

- Chinese Holstein cows. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)*. 94: 429-436. doi:10.1111/j.1439-0396.2009.00926.x.
- Roa, V. M. L., J. R. Bárcena-Gama, S. González, S. Mendoza, G. Ortega, y E. Garcia. 1997. Effect of fiber source and a yeast culture *Saccharomyces cerevisiae* on digestion and the environment in the rumen of cattle. *Anim. Feed Sci. Technol.* 64: 327–336.
- Rodriguez, E. F., F. Orlando, y C. Agosto. 2011. Desarrollo de Probióticos para Ganaderías Productoras de Leche. (No. Doc. 24556) CO-BAC, Bogotá.
- Rodrigues, L. R., J. A. Teixeira, y R. Oliveira. 2006. Low-cost fermentative medium for biosurfactant production by probiotic bacteria. *Biochem. Eng. J.* 32:135–142. doi:10.1016/j.bej.2006.09.012.
- Roepcke, C. B. S., L. P. Vandenberghe, y C. R. Soccol. 2011. Optimized production of *Pichia guilliermondii* biomass with zinc accumulation by fermentation. *Anim. Feed. Sci. Tech.* 163: 33-42.
- Roos, T. B., V. C. Tabeleão, L. A. Dümmer, E. Schwegler, M. A. Goulart, S. V. Moura, M. N. Corrê, F. P. L. Leite, y C. Gil-Turnes. 2010. Effect of *Bacillus cereus* var. *Toyoi* and *Saccharomyces boulardii* on the immune response of sheep to vaccines. *Food Agric. Immunol.* 21: 113-118. doi:10.1080/09540100903443691.
- Ruiz O., Y. Castillo, C. Arzola. 2016. Effects of *Candida norvegensis* live cells on *in vitro* oat straw rumen fermentation. *Asian Australas. J. Anim. Sci* 9: 211–218.
- Sánchez, V. 2003. Optimización de la operación de biorreactores en el proceso de fermentación biológica . Tesis de Maestría, Universidad de los Andes. Bogotá. Colombia
- Sánchez, M. I., A. Santos, J. C. Dustet, G. Guerra, T. León, J. Argüelles, M. Ramos-Leal, A. M. Manzano, G. Casado, y B. Gómez. 2007. Estudio fisiológico de una cepa de levadura con potencialidades para el enriquecimiento proteico del bagazo de caña de azúcar. *Rev. CENIC Cienc. Biol.* 38:39-43.
- Santos, M., E. Tymczyszyn, M. Golowczyc, P. Mobili, y A. Gomez-Zavaglia. 2015. Probiotic Cell Cultivation. In: *Advances in Probiotic Technology*. p. 45–76. Argentina.
- SAS, I. 2011. User's Guide: Statistics. V9.3. Statistical Analysis System Institute, Cary, N.C. USA.
- Seo, J. K., S. W. Kim, M. H. Kim, S. D. Upadhaya, D. K. Kam, y J. K. Ha. 2010. Direct-fed microbials for ruminant animals. *Asian-Australasian. J. Anim. Sci.* 23: 1657-1667.

- Shin, H. T., Y. B. Lim, J. H. Koh, J. Y. Kim, S. Y. Baig y J. H. Lee. 2002. Growth of *Issatchenkia orientalis* in aerobic batch and fed-batch cultures. *J. Microb.* 40: 82-85.
- Sosa, A., J. Galindo, R. Bocourt, R. Rodríguez, N. Albelo, y A. Oramas. 2010. Efecto de *Aspergillus oryzae* en la fermentación ruminal de *Pennisetum purpureum* vc. Cuba CT-115 mediante la técnica de producción de gas *in vitro*. *Cuban. J. Agric. Sci.* 44: 155-159.
- Sosa, A., N. González, Y. García, Y. Marrero, E. Valiño, J. Galindo, D. Sosa, M. Alberto, D. Roque, N. Albelo, L. Colomina, y O. Moreira. 2017. Collection of microorganisms with potential as additives for animal nutrition at the Institute of Animal Science. *Cuban. J. Agric. Sci.* 51: 100-110.
- Sosa, A., Y. Marrero, N. González, N. Albelo, O. B. Moreira, J. Cairo y J. Galindo. 2021. Efecto de *Aspergillus oryzae* sobre la fermentación ruminal, el consumo de alimento y la digestibilidad de la materia seca en vacas alimentadas con dietas a base de forrajes. *Anim. Biotech.* DOI: 10.1080 / 10495398.2021.1914069
- Stehlik-Tomas, V., V. Gulan Zetić, D. Stanzer, S. Grba, y N. Vahčić. 2004. Zinc, copper and manganese enrichment in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Tech. Biotech.*, 42: 115-120.
- Suntara, C. 2020. Effects of Ruminant Crabtree-negative Yeast Ensiled Rice Straw on Feed Intake , Rumen Fermentation, and Performance in Tropical Crossbred Lactating Holstein Cows. *Scientific Rep.* 1:1–23.
- Tang, S. X., G. O. Tayo, Z. L. Tan, Z. H. Sun, L. X. Shen, C. S. Zhou, W. J. Xiao, G. P. Ren, X. F. Han, and S. B. 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.
- Throne, M., A. Bach, M. Ruiz-Moreno, M. D. Stern, y J. G. Linn. 2009. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* on ruminal pH and microbial fermentation in dairy cows. Yeast supplementation on rumen fermentation. *Livest. Sci.* 124: 261–265. doi:10.1016/j.livsci.2009.02.007.
- Tripathi, M. K., y S. A. Karim. 2011. Effect of yeast cultures supplementation on live weight change, rumen fermentation, ciliate protozoa population, microbial hydrolytic enzymes status and slaughtering performance of growing lamb. *Livest. Sci.* 135:17–25. doi:10.1016/j.livsci.2010.06.007.
- Uyeno, Y., S. Shigemori, y T. Shimosato. 2015. Minireview Effect of Probiotics/Prebiotics on Cattle Health and Productivity. *Microb. Env.* 37: 141-176. doi:10.1264/jsme2.ME14176.
- Vallejo-Hernández, L. H., M. M. Y. Elghandour, R. Greiner, Y. Uchenna, R. R. Rivas-cáceres, M. Barros-rodíguez, y Z. M. Abdelfattah. 2018.

Environmental impact of yeast and exogenous xylanase on mitigating carbon dioxide and enteric methane production in ruminants. J. Clean. Prod. 189: 40-46 doi:10.1016/j.jclepro.2018.03.310.

Van Soest, P. V. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. J. Dairy Sci. 74: 3583-3597.

Wang, G. Y., Z. Chi, B. Song, Z. P. Wang, y Z. M. Chi. 2012. High level lipid production by a novel inulinase-producing yeast *Pichia guilliermondii* Pcla22. Biores. Tech.124: 77-82.

Zapata, P., D. Rojas, C. Fernández, D. Ramírez, G. Restrepo, y V. Orjuela. 2007. Producción de biomasa y exopolisacáridos de *Grifola frondosa* bajo cultivo sumergido utilizando fuentes de carbono no convencionales. Rev. EIA 7: 137-144.

