



---

**ESTUDIO DEL NEJAYOTE COMO MEDIO DE CRECIMIENTO DE PROBIÓTICOS  
Y PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINAS**

**STUDY OF NEJAYOTE AS CULTURE MEDIUM FOR PROBIOTICS AND  
PRODUCTION OF BACTERIOCINS**

G. Ramírez-Romero, M. Reyes-Velazquez y A. Cruz-Guerrero\*

Departamento de Biotecnología Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa., Av. San Rafael Atlixco No. 186  
Col. Vicentina, México D.F. 09340, México.

Recibido 26 de Agosto de 2013; Aceptado 28 de Septiembre de 2013

---

**Resumen**

En este trabajo se evaluó el potencial del nejayote (agua residual de la nixtamalización del maíz) como medio de cultivo para bacterias probióticas y producción de bacteriocinas. Se caracterizaron nejayotes de tres molinos obteniéndose: azúcares reductores 0.166-0.818 g/L, azúcares totales 23.57-63.41 g/L y proteína 5.66-12.92 g/L. La fermentación del nejayote se realizó empleando: *Lactobacillus casei* IMAU60214, *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Lactobacillus helveticus* IMAU70129. Se observó un consumo de azúcares reductores del 60-65%, de azúcares totales 6-30% y de proteína 1-15%. Con los sobrenadantes de las fermentaciones se comprobó la producción de bacteriocinas utilizando como microorganismos indicadores *Listeria innocua* ATCC33090 y *Escherichia coli* K-12, las mayores inhibiciones de crecimiento se obtuvieron con los sobrenadantes de las fermentaciones de *L. casei* IMAU60214 y *L. helveticus* IMAU70129; la máxima inhibición para *Listeria innocua* fue del 14% y para *Escherichia coli* K-12 del 10%. La presencia de bacteriocinas se corroboró con la adición de proteinasa K. Dado que las bacteriocinas producidas inhibieron a *L. innocua* (Gram +) y a *E. coli* (Gram -) se puede decir que probablemente tienen un amplio espectro de inhibición. Con los resultados obtenidos se puede concluir que el nejayote es apto para la producción de probióticos y bacteriocinas.

*Palabras clave:* bacteriocina, nejayote, bacterias ácido lácticas.

---

**Abstract**

In the present work, the nejayote (nixtamalization residue from maize) as a culture medium for probiotic bacteria and production of bacteriocins was evaluated. Nejayotes obtained from three mills were characterized: reducing sugars 0.166-0.818 g/L, total sugars 23.57-63.41 g/L and protein 5.66-12.92 g/L. The fermentation was performed at 37°C for 48 h by: *Lactobacillus casei* IMAU60214, *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus helveticus* IMAU70129. Consumption of reducing sugars from 60-65%, total sugars from 6-30% and protein from 1-15% were observed. Furthermore, bacteriocin production was evaluated with the supernatants of fermentation. The greatest inhibition by the presence of bacteriocins was obtained with the supernatants of fermentation of *Lactobacillus casei* IMAU60214, and *Lactobacillus helveticus* IMAU70129. The highest inhibition was 14% for *Listeria innocua* ATCC33090 and 10% for *Escherichia coli* K-12. Bacteriocins presence was confirmed with addition of proteinase K. Since bacteriocins produced inhibited to *L. innocua* (Gram +) and *E. coli* (Gram -) can be said that they probably have a wide spectrum of inhibition. In conclusion, nejayote can be used for the production of probiotics and bacteriocins but need further investigation to optimize the production of bacteriocins.

*Keywords:* bacteriocin, nejayote, probiotic.

---

\*Autora para la correspondencia. E-mail: aec@xanum.uam.mx  
Tel: (55) 58 04 47 20; Fax: (55) 58 04 47 12

## 1 Introducción

El nejayote, agua residual de la nixtamalización del maíz, se considera como altamente contaminante debido a: su alta demanda biológica de oxígeno (2692-7875 mg O<sub>2</sub>/L), alta demanda química de oxígeno (10200-22000 mg O<sub>2</sub>/L) y pH básico (10.5-11.2). Algunos autores reportan que la pérdida de sólidos en el nejayote, depende de las operaciones comerciales de tortilla, encontrándose una variación que va de 8.5 hasta 12.5% (Rosentrater, 2006; Gutiérrez-Uribe y col., 2010). En otras investigaciones se determinó que la pérdida de sólidos en el efluente varía de 5.5 a 10.8%. Se ha encontrado que aproximadamente el 50% de los sólidos del nejayote están suspendidos; estos contienen 64% de polisacáridos, 20% de almidón y 1.4% de proteína. El otro 50% está compuesto de sólidos solubles a base de proteínas, azúcares, vitaminas y fitoquímicos ricos en polifenoles y carotenoides (Gutiérrez-Uribe y col., 2010). Martínez-Bustos y col. (2001) caracterizaron los azúcares presentes en el nejayote y observaron que la arabinosa, xilosa, galactosa y el ácido glucorónico están presentes en concentraciones de 0.54, 64.23, 1.10 y 8.60 g/Kg maíz, respectivamente. De acuerdo con Ochoa y Viniestra-González (2009), por cada kilogramo de maíz procesado se producen entre 2 y 3 litros de nejayote dependiendo del proceso. Por lo tanto, dada la concentración de azúcares disueltos en el nejayote este puede ser una fuente potencial de sustratos para la elaboración de productos de valor agregado como la producción de probióticos y bacteriocinas.

Los probióticos se han definido como organismos vivos que al ingerirse afectan benéficamente al huésped (Rodgers, 2008), ya que al modificar la microbiota intestinal, influyen en la salud a través de la producción de vitaminas, ácidos grasos de cadena corta y bacteriocinas (González-Olivares y col., 2011). Las bacteriocinas son producidas por diferentes bacterias probióticas y pueden servir como barreras antimicrobianas y ayudar a reducir los niveles de microorganismos patógenos. Existen muchas bacteriocinas y cada una tiene espectros de inhibición particulares, esta característica es aprovechada para la manipulación de las poblaciones bacterianas a nivel del tracto digestivo con el fin de excluir patógenos, mejorar la digestibilidad e incrementar la actividad inmunológica (Cintas y col., 2001; García y col., 2010).

El objetivo de este trabajo fue verificar el crecimiento de probióticos en nejayote de diferentes

molinos y detectar la presencia de bacteriocinas sintetizadas durante la fermentación.

## 2 Materiales y métodos

### 2.1 Microorganismos

Se emplearon tres cepas de bacterias ácido lácticas: *Lactobacillus casei* IMAU60214, *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Lactobacillus helveticus* IMAU70129 previamente aisladas de productos lácteos comerciales en el departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana. Se emplearon como microorganismos indicadores de actividad de bacteriocina *Escherichia coli* K-12 y *Listeria innocua* ATCC 33090. Las bacterias ácido lácticas se conservaron en agar MRS a 4°C, *Escherichia coli* K-12 y *Listeria innocua* se conservaron en agar nutritivo a 4°C.

### 2.2 Acondicionamiento del nejayote

El nejayote utilizado fue colectado de tres molinos diferentes (1, 2 y 3) ubicados en la Ciudad de México, se tomaron tres muestras en diferentes días en cada uno (A, B y C). El nejayote fue filtrado con gasa para eliminar la mayor cantidad de sólidos suspendidos, se midió el pH (potenciómetro pH120, Conductronic, México) y se ajustó a 5 mediante la adición de HCL 1N. Posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm durante 30 minutos (Centrifuga Beckman J2-MI, E.U.A.), finalmente se recuperó el sobrenadante para su uso posterior como medio de cultivo.

### 2.3 Caracterización del nejayote

En el nejayote se cuantificaron los azúcares reductores mediante la técnica de ácido dinitrosalicílico (Miller, 1959). Los carbohidratos totales por la técnica de fenol-sulfúrico (Dubois y col., 1956). Y la proteína por la técnica de Lowry (1951).

### 2.4 Condiciones de fermentación

Las fermentaciones se realizaron en botellas serológicas de 100 mL y se colocaron 50 mL de nejayote los cuales se esterilizaron durante 15 min a 121°C. Se inocularon con: *L. casei* IMAU60214, *L. rhamnosus* GG y *L. helveticus* IMAU70129 y se incubaron a 37°C durante 48 horas (Incubadora Felisa-TC4M, México). Se monitoreó el crecimiento mediante turbidimetría a 650 nm (Espectrofotómetro,

Shimadzu UV-1601, Japón). El nejayote fermentado se centrifugó a 10,000 rpm durante 30 minutos (Centrifuga Beckman J2-MI, E.U.A.), el sobrenadante fue almacenado a -20°C para posteriormente cuantificar la actividad de bacteriocina.

### 2.5 Actividad de bacteriocina

Para determinar la presencia de bacteriocinas en los nejayotes fermentados por las distintas bacterias ácido lácticas se utilizó la técnica modificada de Papagianni y col. (2006). A los sobrenadantes de las fermentaciones se les ajustó el pH a 7 con NaOH 1N, para eliminar el efecto inhibitorio atribuido a los ácidos orgánicos. Posteriormente para eliminar el peróxido de hidrógeno se adicionó catalasa a una concentración de 0.1 mg/mL (3809 unidades/mg, Sigma-Aldrich, E.U.A.) y se incubó a 25°C durante 90 minutos, a continuación se inactivó la enzima a 60°C durante 10 minutos.

Se utilizaron como microorganismos indicadores *E. coli* K-12 y *L. innocua* ATCC 33090, estos microorganismos se cultivaron por separado, en caldo nutritivo (*E. coli*) y en caldo infusión de cerebro y corazón (*L. innocua*) durante 24 horas a 37°C. Posteriormente 1 mL de cada uno de los cultivos se transfirió a un matraz que contenía 50 mL de medio fresco y se incubaron por 3 h a 37°C a 150 rpm para obtener células en fase de crecimiento logarítmica. Los tubos donde se realizó la prueba contenían 0.5 mL del sobrenadante de la fermentación a analizar o bien nejayote estéril (control) y 2 mL de caldo de cultivo con el microorganismo indicador a una absorbancia inicial de 0.12. Se midió la absorbancia a 650 nm después de 3 h de incubación a 37°C. El porcentaje de células inhibidas se determinó mediante la Ec. 1.

$$\text{Inhibición de crecimiento (\%)} = 100 - \left( \frac{DOp}{DOc} \right) \times 100 \quad (1)$$

### 2.6 Comprobación de la presencia de bacteriocinas

Se adicionó proteinasa K a una concentración de 0.1 mg/mL (6.1 unidades/mg, Sigma-Aldrich, E.U.A.) para hidrolizar las bacteriocinas presentes en los sobrenadantes de las fermentaciones, y se incubó a 37°C durante 90 minutos, la inactivación de la enzima se llevó a 60°C durante 10 minutos. Las muestras fueron evaluadas después del tratamiento para determinar la actividad de bacteriocina con la técnica mencionada.

### 2.7 Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado y los datos experimentales se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA), se hizo la comparación de medias por el método de Tukey con un nivel de significancia de 0.05. Se utilizó el programa SPSS Statistics 18.0 (1993-2007 Polar Engineering and Consulting).

## 3 Resultados y discusión

### 3.1 Caracterización del nejayote

Después de la colecta y acondicionamiento de los nejayotes de diferentes molinos se llevó a cabo la cuantificación de azúcares reductores, de azúcares totales y de proteína. En la Tabla 1 se puede observar que los nejayotes se encuentran dentro de los intervalos: en azúcares reductores de 0.166 a 0.818 g/L, la proteína de 5.66-12.92 g/L y los azúcares totales de 23.57-63.41 g/L. Niño-Medina y col. (2009) reportaron una concentración de azúcares totales de 90.5 g/L y de proteína de 4.5 g/L, mientras que Velasco-Martínez y col. (1997) reportaron una concentración de proteína de 72 g/L en base seca, resultados similares a los encontrados en este trabajo. Por otra parte Ruiz-Gutiérrez y col. (2010) reportaron una concentración de 600 g/L de azúcares totales, esta variación puede deberse a que dichos autores estudiaron nejayote obtenido en el laboratorio y en nuestro caso fue colectado de molinos de nixtamal en los cuales se realiza la nixtamalización tradicional y cambia de un molino a otro en variables importantes como: tipo de maíz, cantidad de maíz por tina de reposo, agua utilizada durante el proceso (acarreo y lavado del nixtamal), cantidad de cal, tiempo de cocción y reposo.

### 3.2 Crecimiento de probióticos

En la Fig. 1 se compara el crecimiento obtenido de *L. casei* IMAU60214, *L. rhamnosus* GG y *L. helveticus* IMAU70129 en las diferentes muestras de nejayote, y se puede apreciar que independientemente del nejayote estudiado, crecieron todas las bacterias probióticas. Con los resultados obtenidos se puede decir que los microorganismos están adquiriendo del nejayote las fuentes de carbono y nitrógeno necesarias para crecer. Lo cual se verificó con el consumo de azúcares reductores (60-65%), carbohidratos totales (6-30%) y proteína (1-15%) como se reporta en la Tabla 2. A partir de esto se observó, poco consumo

de la fuente de nitrógeno y que la fuente de carbono no se aprovechó en su totalidad. Esto hace suponer que, si se hidrolizan los carbohidratos presentes en el

nejayote se podría obtener un mayor aprovechamiento tanto de la fuente de carbono como de la de nitrógeno y por lo tanto se obtendría un crecimiento más eficiente.

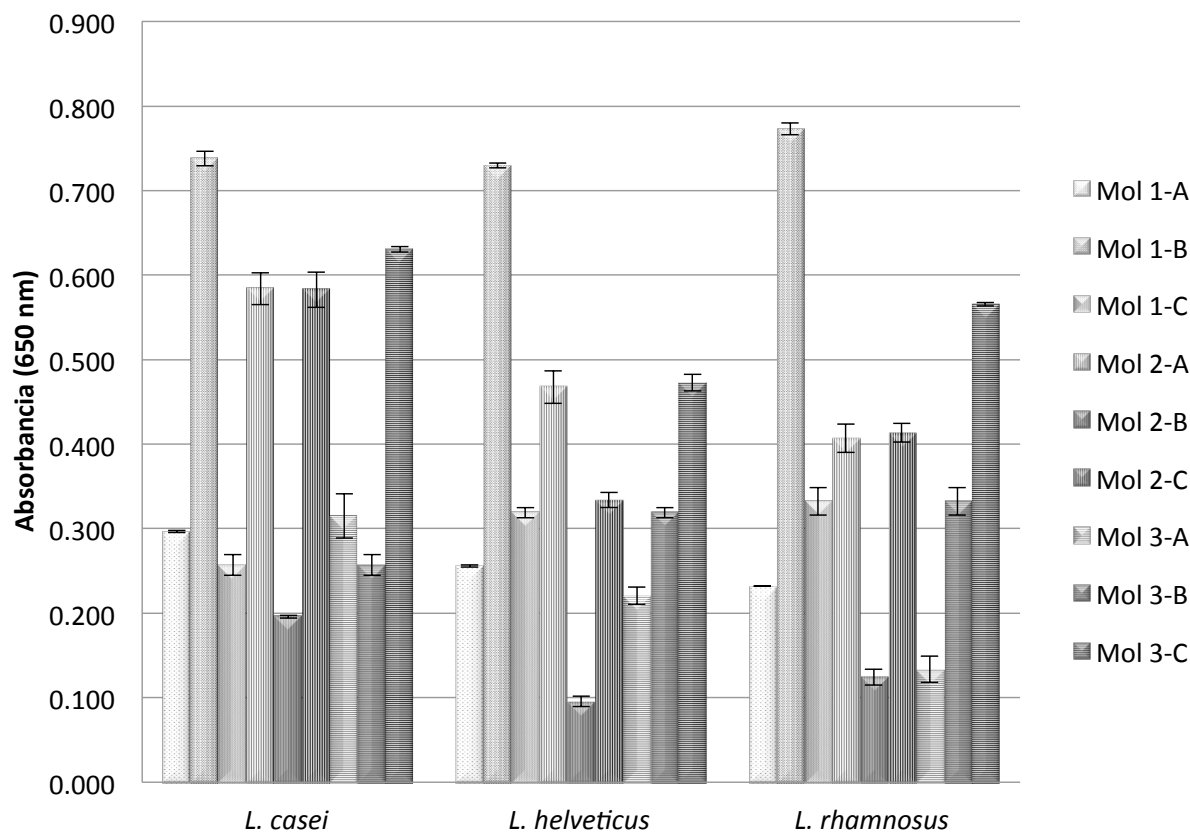


Fig. 1. Crecimiento de *Lactobacillus casei* IMAU60214, *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Lactobacillus helveticus* IMAU70129 en muestras de nejayote.

Tabla 1. Contenido de azúcares reductores, proteína y carbohidratos totales en nejayote de diferentes molinos.

Molino	Azúcares reductores (g/L)	Proteína (g/L)	Carbohidratos totales (g/L)
1-A	0.680 ±0.01	5.66 ±0.01	23.57 ±0.01
1-B	0.620 ±0.01	9.74 ±0.08	44.89 ±0.35
1-C	0.213 ±0.05	12.66 ±0.04	54.12 ±0.30
2-A	0.397 ±0.04	7.17 ±0.09	34.31 ±0.28
2-B	0.202 ±0.08	6.64 ±0.04	29.16 ±0.54
2-C	0.785 ±0.01	12.92 ±0.01	63.41 ±4.5
3-A	0.242 ±0.04	9.07 ±0.08	38.22 ±3.46
3-B	0.166 ±0.09	6.62 ±0.04	25.91 ±0.51
3-C	0.818 ±0.04	11.45 ±0.09	35.09 ±0.12

Tabla 2. Consumo de azúcares reductores, carbohidratos totales y proteína después de la fermentación con *Lactobacillus casei* IMAU60214 (Lc), *Lactobacillus rhamnosus* GG (Lr) y *Lactobacillus helveticus* IMAU70129 (Lh).

Molino	Azúcares Reductores (%)	Carbohidratos totales (%)	Proteína (%)
1			
1-Lc	61.95 ±0.39	8.29 ±1.26	10.416 ±0.86
1-Lh	63.56 ±0.57	9.77 ±0.73	12.242 ±0.57
1-Lr	59.86 ±0.39	29.85 ±1.81	36.439 ±0.35
2			
2-Lc	61.39 ±0.40	13.79 ±3.45	6.704 ±0.07
2-Lh	63.31 ±0.27	24.49 ±3.85	4.300 ±0.01
2-Lr	60.04 ±0.34	25.86 ±0.07	5.229 ±2.24
3			
3-Lc	62.99 ±0.01	7.94 ±1.60	14.430 ±1.13
3-Lh	63.51 ±0.15	15.40 ±0.90	2.436 ±0.04
3-Lr	65.18 ±0.04	6.96 ±2.30	0.092 ±1.13

### 3.3 Actividad de bacteriocina

Para determinar si durante la fermentación de nejayote los probióticos produjeron bacteriocinas, se evaluaron los sobrenadantes de las fermentaciones. En la Fig. 2 se puede apreciar la inhibición del crecimiento de los microorganismos indicadores *Listeria innocua* ATCC 33090 y *Escherichia coli* K-12. La mayor inhibición de *Listeria innocua* (Fig. 2A) se obtuvo con los sobrenadantes correspondiente a *L. casei* IMAU60214 y *L. helveticus* IMAU70129 (13% aproximadamente) mientras que *L. rhamnosus* GG mostró la menor inhibición (6%); lo cual se confirmó al realizar el análisis estadístico encontrándose que existen diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ ) entre la inhibición de crecimiento de *L. innocua* con los diferentes sobrenadantes.

De igual manera, la mayor inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* K-12 (Fig. 2B) se obtuvo con el sobrenadante de *L. helveticus* IMAU70129 (10%), seguido por *L. casei* IMAU60214 (8%), mientras que con el sobrenadante de *L. rhamnosus* se obtuvo la menor inhibición; lo que se confirmó al realizar el análisis estadístico en donde se encontraron diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ ) entre la inhibición de crecimiento de *E. coli* K-12 con los diferentes sobrenadantes.

Con los resultados anteriores se puede decir que en los sobrenadantes de las fermentaciones de nejayote existen compuestos con actividad antimicrobiana que pueden ser bacteriocinas.

Papagianni y col. (2006) describen en su trabajo

la inhibición obtenida con la bacteriocina nisina, para esto utilizaron 9 bacterias Gram positivas como microorganismos indicadores, encontrando que *Lactobacillus curvatus* ATCC 51436 y *Pediococcus acidilactici* ATCC 25740 fueron sensibles a concentraciones muy bajas de nisina (1UI/mL) y con una concentración de 75 UI/mL se obtuvo el 100% de inhibición. En la presente investigación se utilizaron como microorganismos indicadores a *Listeria innocua* ATCC 33090 (bacteria Gram positiva) y *Escherichia coli* K-12 (bacteria Gram negativa) y como fuente de bacteriocinas los sobrenadantes de las fermentaciones de *L. casei* IMAU60214, *L. rhamnosus* GG y *L. helveticus* IMAU70129 y como se observa en la Fig. 2 se obtuvo inhibición de los dos microorganismos indicadores, por lo que se puede decir que las bacteriocinas producidas son probablemente de amplio espectro de inhibición.

### 3.4 Comprobación de la presencia de bacteriocinas

Para saber si la inhibición de *Listeria innocua* ATCC 33090 y *Escherichia coli* K-12 se debía a la presencia de bacteriocinas producidas durante la fermentación de los probióticos, a los sobrenadantes de las diferentes fermentaciones se les adicionó proteinasa K para hidrolizar proteínas y péptidos como lo reportaron Todorov y col. (2013) que muestran que la bacteriocina producida por *Lactobacillus sakei* fue inactivada por proteinasa K, pronasa y tripsina.

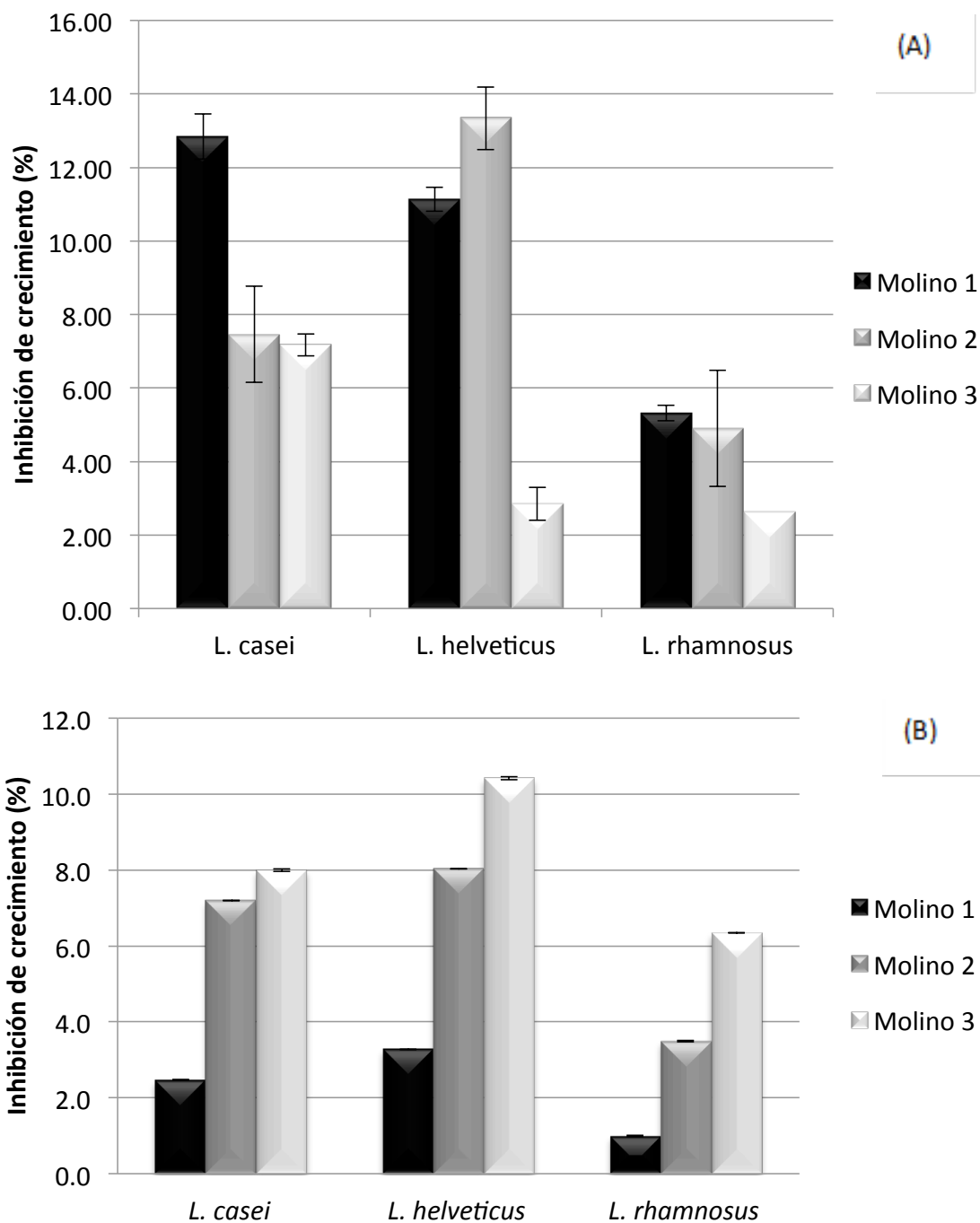


Fig. 2. Inhibición del crecimiento de *Listeria innocua* ATCC 33090 (A) y *Escherichia coli* K-12 (B) por bacteriocinas producidas durante la fermentación de las bacterias ácido lácticas.

Como se puede observar en la Fig. 3 el crecimiento obtenido de los microorganismos indicadores después de la prueba no varío significativamente ( $p < 0.05$ ), tanto en el control (nejayote sin fermentar) como en los sobrenadantes de fermentación, con

lo cual se confirma que, la inhibición de los microorganismos indicadores es causada por las bacteriocinas producidas por los lactobacilos crecidos en nejayote.

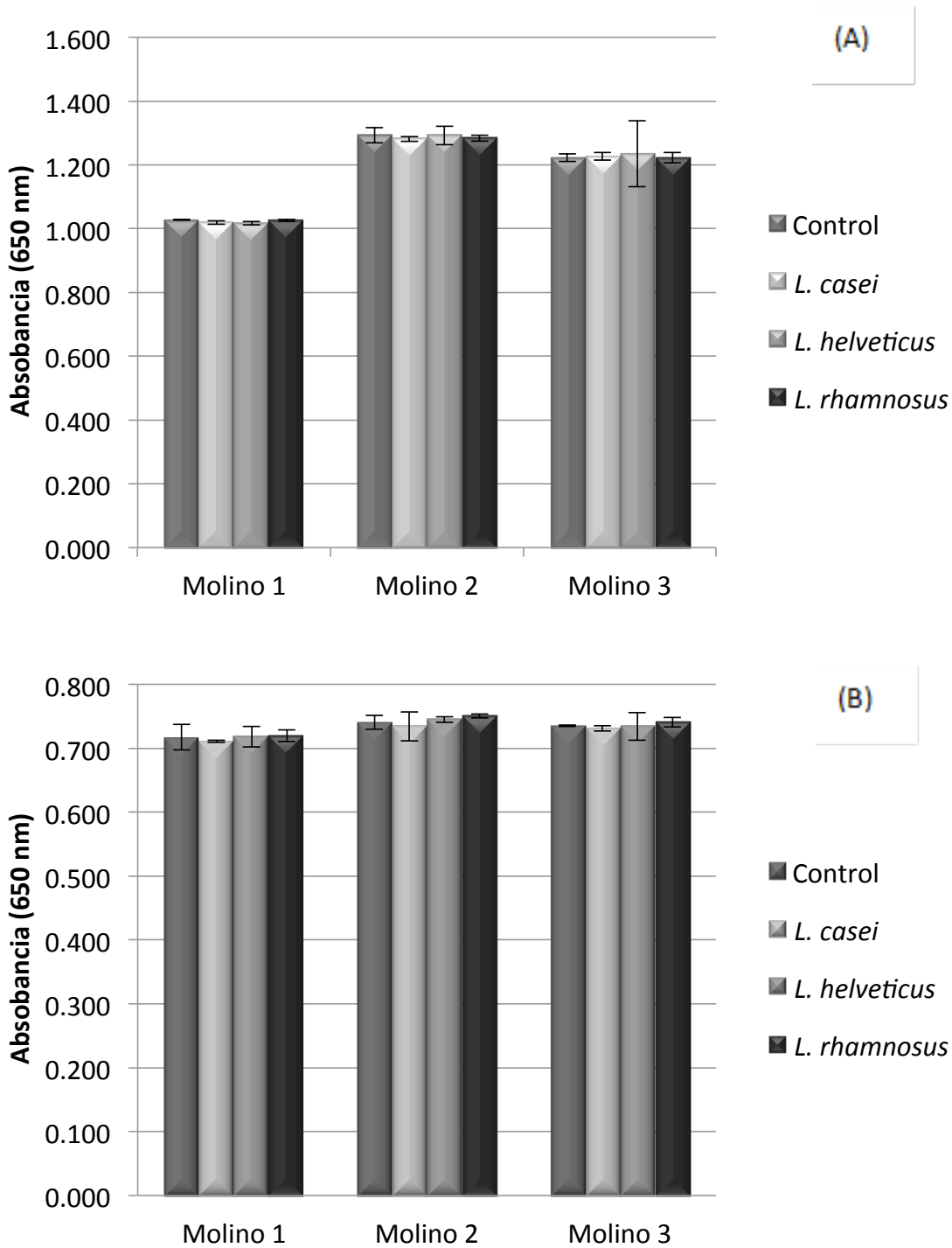


Fig. 3. Crecimiento de *Listeria innocua* ATCC 33090 (A) y *Escherichia coli* K-12 (B) en los sobrenadantes de fermentación de los lactobacilos tratados con proteinasa K.

### Conclusiones

Se lograron crecer las bacterias probióticas en nejayote de diferentes molinos con lo cual se

comprueba que el nejayote sirve como medio de cultivo. Se logró corroborar que la inhibición obtenida en los microorganismos indicadores (*Listeria*

*innocua* y *Escherichia coli*) se atribuye a la presencia de bacteriocinas, en donde las mayores inhibiciones se obtuvieron con los sobrenadantes de las fermentaciones de *L. casei* IMAU60214, y *L. helveticus* IMAU70129. Es necesario ampliar la investigación para optimizar el crecimiento de los probióticos y conocer la acción de las bacteriocinas contra microorganismos patógenos presentes en alimentos.

## Nomenclatura

DOp densidad óptica de prueba a las 3 horas

DOc densidad óptica del control a las 3 horas

## Referencias

- Cintas, L.M., Casaus, M.P., Herranz, C., Nes, I.F. y Hernández P.E. (2001). Review: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Food Science and Technology International* 7, 281-305.
- Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J., Rebers, P. y Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28, 350-356.
- García, P., Rodríguez, L., Rodríguez, A. y Martínez, B. (2010). Food biopreservation: promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins. *Trends in Food Science & Technology* 21, 373-382.
- González-Olivares, L. G., Jiménez-Guzmán, J., Cruz-Guerrero, A., Rodríguez-Serrano, G., Gómez-Ruiz, L. y García-Garibay, M. (2011). Bioactive peptides released by lactic acid bacteria in commercial fermented milks. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 10, 179-188.
- Gutiérrez-Urbe, J.A., Rojas-García, C., García-Lara, S. y Serna-Saldivar, S.O. (2010). Phytochemical analysis of wastewater (nejayote) obtained after lime-cooking of different types of maize kernels processed into masa for tortillas. *Journal of Cereal Science* 52, 410-416.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., y Randall, J.R. (1951). The protein measurement with the Folin Phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265-275.
- Martínez-Bustos, F., Martínez-Flores, H.E., Sanmartín-Martínez, E., Sánchez-Sinencio, F., Chang, Y.K., Barrera-Arellano, D. y Rios, E. (2001). Effect of the components of maize on the quality of masa and tortillas during the traditional nixtamalization process. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81, 1455-1462.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31, 426-428.
- Niño-Medina, G., Carvajal-Millán, E., Lizardi, J., Rascon-Chu, A., Marquez-Escalante, J.A., Gardea, A., Martínez-López, A.L., y Guerrero, V. (2009). Maize processing waste water arabinoxylans: Gelling capability and cross-linking content. *Food Chemistry* 115, 1286-1290.
- Ochoa, A. y Viniegra-González, G. (2009). *Temas Selectos de la Cadena Maíz-Tortilla*. México, D.F. Impresiones y Diseños de la Universidad Autónoma Metropolitana. 114.
- Papagianni, M., Avramidis, N., Filioussis, Dasiou, D. y Ambrosiadis I. (2006). Determination of bacteriocin activity with bioassays carried out on solid and liquid substrates: assessing the factor "indicator microorganism". *Microbial Cell Factories* 5, 1-14.
- Rodgers, S. (2008). Novel applications of live bacteria in food services: probiotics and protective cultures. *Trends in Food Science & Technology* 19, 188-197.
- Rosentrater, K.A. (2006). A review of corn masa processing residues: Generation, properties, and potential utilization. *Waste Management* 26, 284-292.
- Ruiz-Gutiérrez, M.G., Quintero-Ramos, A., Meléndez-Pizarro, C.O., Lardizábal-Gutiérrez, D., Barnard, J., Márquez-Melendez, R. y Talamás-Abbud, R. (2010). Changes in mass transfer, thermal and physicochemical properties during nixtamalization of corn with and without agitation at different temperatures. *Journal of Food Engineering* 98, 76-83.
- Todorov, S. D., Vaz-Velho, M., Melo-Franco, B. D. G. y Holzapfel, W. H. (2013). Partial characterization of bacteriocins produced by



three strains of *Lactobacillus sakei*, isolated from salpicao, a fermented meat product from North-West of Portugal. *Food Control* 30, 111-121.

Velasco-Martínez, M., Angulo, O., Vázquez-Couturier, D. L., Arroyo-Lara, A., y Monroy-Rivera, J. A. (1997). Effect of dried solids of nejayote on broiler growth. *Poultry Science* 76, 1531-1534.