



**COLEGIO DE POSTGRADUADOS
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS
AGRÍCOLAS**

CAMPUS TABASCO

**PROGRAMA DE PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL
TRÓPICO**

**EFFECTO DE LOS NIVELES DE UREA EN LA CAÑA FERMENTADA
CON PULIDURA DE ARROZ (SACCHAPULIDO)**

ADRIANA DEL CARMEN CARAVEO RICÁRDEZ

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
ELGRADO DE:**

MAESTRA EN CIENCIAS

H. Cárdenas, Tabasco, Diciembre del 2008

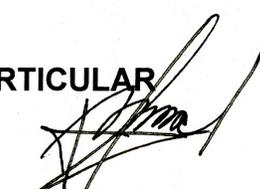
La presente tesis, titulada: **EFFECTO DE LOS NIVELES DE UREA EN LA CAÑA FERMENTADA CON PULIDURA DE ARROZ (SACCHAPULIDO)**, realizada por la alumna: **Adriana del Carmen Caraveo Ricárdez**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

EN PRODUCCION AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



DR. JESÚS ALBERTO RAMOS JUÁREZ

ASESOR:



DR. ARABEL ELÍAS IGLESIAS

ASESOR:



DR. EMILIO MANUEL ARANDA IBÁÑEZ

ASESOR:



DR. GERMÁN DAVID MENDOZA MARTÍNEZ

ASESOR:



DR. JUAN MANUEL ZALDIVAR CRUZ

H. Cárdenas, Tabasco, 11 de Diciembre del 2008

PULIDURA DE ARROZ (SACCHAPULIDO)

Adriana del Carmen Caraveo Ricárdez, MC.

Colegio de Postgraduados, 2007

RESUMEN

Con el objetivo de encontrar el nivel de urea más adecuado, desde el punto de vista biológico y económico, que incremente la proteína verdadera (PV) en la fermentación en estado sólido (FES) del Sacchapulido, se realizó un experimento de tipo factorial (5 x 2), el primer factor llamado tratamientos (T) consistió de 5 niveles de urea (0, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0% para T1, T2, T3, T4 y T5, respectivamente), y el segundo factor consistió en dos tiempos de fermentación (0 y 24 h). Se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo en parcelas divididas en tiempo con 6 repeticiones por tratamientos. El tallo de la caña se cosechó 24 h antes, se molió y se mezcló con 20% de pulidura de arroz, 4% pasta de soya, 0.3% de sulfato de amonio, 0.5% de minerales y urea, según tratamientos. Se pesó 200 g de muestra y se homogenizó, de estos, se utilizó 100 g para determinar los parámetros bromatológicos y fermentativos al inicio de la fermentación (0 h) y los 100 g restantes se depositó en frascos Roux y se dejó fermentar durante 24 h. El pH fue afectado ($P < 0.01$) por el tiempo de fermentación y los niveles de urea ($P < 0.05$), disminuyó a las 24 h, y alcanzó los mayores valores con la adición del 1.0, 1.5 y 2.0% de urea, sin diferencias entre ellos. El ácido láctico fue afectado por los niveles de urea ($P < 0.001$), el incremento se obtuvo con la inclusión de 1.5 y 2.0%, sin diferencias entre ellos. La de MS disminuyó ($P < 0.001$) las 24 h y no fue afectada por los niveles de urea. La PB se incrementó ($P < 0.001$) a las 24 h y fue afectado ($P < 0.001$) por los niveles de urea, el mayor valor se obtuvo con la adición del 2% de urea (18%). La FDN y FDA se incrementaron ($P < 0.01$) a las 24 h y no fueron afectadas por los niveles de urea. Hubo interacción significativa para la PV ($P < 0.01$), Con el 0 % de urea, no hubo diferencias entre 0 y 24 h, y al adicionar urea, se obtuvieron valores mayores a las 24 h, con la adición de 1.0, 1.5 y 2.0% de urea, sin diferencias entre ellos. Se concluye que en la fermentación en estado sólido del Sacchapulido se le debe incluir 1% de urea.

Palabras claves: Caña fermentada, Sacchapulido, niveles de urea.

EFFECT OF THE LEVELS OF UREA IN SUGAR CANE FERMENTED WITH POLISHED RICE (SACCHAPULIDO)

**Adriana del Carmen Caraveo Ricárdez, MC.
Colegio de Postgraduados, 2007**

ABSTRACT

With the objective of finding the most appropriate level of urea, from the biological and economical point of view that increases the true protein in the fermentation in solid state (FSS) of the Sacchapulido, the experiment was carried out as a factorial type (5 x 2). The first factor to be considered was treatments (T) that consisted of 5 levels of urea. The second factor consisted in two time periods of fermentation (0 and 24 h). A design was used totally at random with an arrangement in parcels divided in time with 6 repetitions for treatments. The shaft of the cane was harvested 24 hours before it was milled and it was mixed with 20% polished rice, 4% soya paste, 0.3% of ammonium sulfate, 0.5% of minerals and urea, according to the treatments. 200 g of the sample were weighed and homogenized. Of these, 100 g were used to determine the bromatological and fermentative parameters at the beginning of fermentation (0 h). The 100 remaining g were deposited in Roux flasks and were allowed to ferment for 24 hours. The pH was affected ($P < 0.01$) during the time of fermentation and with the levels of urea ($P < 0.05$). It diminished after 24 hours and reached the greatest values with the addition of the 1.0, 1.5 and 2.0% of urea, without differences among them. The concentration of lactic acid was also affected by the levels of urea ($P < 0.001$). The biggest values were obtained with the inclusion of 1.5 and 2.0%, without differences among them. The quantity of MS diminished ($P < 0.001$) in 2.2 units percentiles after 24 hours and was not affected by the levels of urea. The PB increased ($P < 0.001$) by 0.8 units percentiles after 24 hours and was affected ($P < 0.001$) by the levels of urea. The greatest value was obtained with the addition of 2% of urea (18%). The FDN and FDA increased ($P < 0.01$) after 24 hours and were not affected by the levels of urea. There was significant interaction for the PV ($P < 0.01$), when comparing the times of fermentation. In the treatment without urea, there were no differences between 0 and 24 hours. When urea was added, in all the treatments, the greatest values were obtained after 24 hours; the biggest values were reached with the addition of 1.0, 1.5 and 2.0% of urea, without differences among them. One can conclude that in fermentation of Sacchapulido in the solid state, 1% of urea should be included.

Key words: Fermented cane, Sacchapulido, levels of urea

Dedico esta tesis:

A Dios, por otorgarme el don de la vida.

A mi madre, María Esther Ricárdez Canto, por su fortaleza y valentía para hacer frente a las situaciones difíciles de la vida y por enseñarme un valor indispensable en la vida: honestidad.

A mis hermanas(o): Ma. Elena, Vicente, José Isidro, Rosy, Claudia y Conchy, por el cariño y apoyo brindado, en especial a Rosy por ser como eres.

A mi esposo: por el amor, la paciencia y el apoyo brindado en cada uno de los momentos que lo he necesitado, gracias.

A mi niño Adrián Antonio, por ser el regalo más valioso y maravilloso que se me ha proporcionado en la vida y por contagiarme de su alegría y me llena de energías día a día.

A mi amigo (a) s por compartir este camino lleno de retos y momentos agradables.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada para mi formación académica.

Al colegio de Posgraduados por haberme dado la oportunidad de haber hecho uso de sus instalaciones.

Agradecimiento al Fondo Mixto de Fomento a la Investigación Científica y Tecnológica CONACYT – Gobierno del Estado de Tabasco por el apoyo al proyecto “Intensificación en la producción de alimentos para animales a través de procesos biotecnológicos que protejan al medio ambiente” Clave TAB-2007-C09-74746, del cual forma parte esta investigación.

A cada uno de los doctores que integraron mi Consejo Particular:

Al Dr. Germán D. Mendoza Martínez, por aceptar ser parte de mi consejo.

Al Dr. Emilio M. Aranda Ibáñez por su apoyo y por su contribución en el trabajo.

Al Dr. Arabel Elías Iglesias, por sus sabidurías y sobre todo por compartir sus conocimientos.

Al Dr. Juan Manuel Zaldivar Cruz, por su optimismo y jovialidad que siempre lo caracteriza.

En especial al Dr. Jesús Alberto Ramos Juárez por su paciencia, enseñanza y apoyo.

A la Dra. Consuelo del Carmen Bautista Muñoz y al MC Francisco Izquierdo, por su enseñanza y contribución en el trabajo.

Y a todos aquellos profesores que intervinieron en mi formación profesional, y a los cuales no menciono por el temor de omitir a alguno, gracias.

CONTENIDO

	PAG.
1 INTRODUCCION -----	1
2. REVISION DE LITERATURA -----	3
2.1.- La caña de azúcar y su potencial de producción animal -----	3
2.2.- Importancia de la diversificación en el uso de la caña -----	5
2.3.- La biotecnología en la producción de alimentos -----	6
2.4.- Antecedentes de Fermentación -----	8
2.5.- Definiciones de la Fermentación en Estado Sólido -----	9
2.6.- Factores que intervienen en el proceso de la FES -----	10
2.7.- Fermentación en estado sólido de la caña de azúcar. -----	12
2.8.- Alimentos para animales obtenidos por FES a partir de la caña de azúcar y otros subproductos y residuos agrícola -----	12
3. MATERIALES Y METODOS -----	17
3.1 Localización geográfica del área de estudio -----	17
3.2 Tratamientos (T) y diseño experimental -----	18
3.3 Procedimiento experimental -----	18
3.4 Métodos de muestreo -----	19
3.5 Indicadores Fermentativos. -----	19
3.6 Indicadores Bromatológicos -----	20
4. RESULTADOS -----	21
5.1 Efectos del tiempo de fermentación y niveles de urea en los parámetros bromatológicos del Sacchapulido. -----	21
5.1.1. Efectos del tiempo de fermentación y niveles de urea en el contenido de materia seca (MS). -----	21
5.1.2. Efectos del tiempo de fermentación y niveles de urea en el contenido de proteína bruta (PB). -----	21
5.1.3. Efectos del tiempo de fermentación y niveles de urea en el fraccionamiento de la fibra en el Sacchapulido. -----	22

5.1.4. Efectos del tiempo de fermentación y niveles de urea en el contenido de proteína verdadera (PV). -----	23
5.1.5. Efectos del tiempo de fermentación y niveles de urea en el contenido de nitrógeno no proteínico (NNP) x 6.25. -----	24
5.1.6. Efectos del tiempo de fermentación y niveles de urea en la relación PV/PB*100. -----	25
5.2. Efectos del tiempo de fermentación y niveles de urea en los parámetros fermentativos del Sacchapulido. -----	27
5.2.1. Efectos del tiempo de fermentación y niveles de urea en el pH. ----	27
5.2.2. Efectos del tiempo de fermentación y niveles de urea en la concentración del amoniaco. -----	28
5.2.3. Efectos de niveles de urea en la concentración de ácido láctico a las 24 h de fermentación-----	29
6. DISCUSION -----	30
7. CONCLUSIONES. -----	35
6. LITERATURA CITADA -----	36
7.ANEXO -----	43

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Distribución de los tratamientos. -----	18
Cuadro 2. Porcentaje de los ingredientes mezclado en el Sacchapulido con diferentes niveles de urea. -----	19
Cuadro 3. Efectos del tiempo de fermentación y niveles de urea en el contenido de materia seca y proteína bruta en el Sacchapulido. -----	21
Cuadro 4. Efectos del tiempo de fermentación y niveles de urea en las fracciones de la fibra del Sacchapulido. -----	22
Cuadro 5. Efectos de niveles de urea en el contenido de proteína verdadera del Sacchapulido a las 0 y 24 h de fermentación -----	24
Cuadro 6. Efectos de niveles de urea en el contenido de (NNP) x 6.25 del Sacchapulido a las 0 y 24 h de fermentación.-----	25
Cuadro 7. Efectos de niveles de urea en la relación PV/PB*100 del Sacchapulido a las 0 y 24 h de fermentación. -----	26
Cuadro 8. Efectos del tiempo de fermentación y niveles de urea en el pH.-	27
Cuadro 9. Efectos de niveles de urea en la concentración de amoniacó en el Sacchapulido a las 0 y 24 h de fermentación. -----	29
Cuadro 10. Efectos de niveles de urea en la concentración de ácido láctico en el Sacchapulido a las 24 h de fermentación. -----	29

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Ubicación geográfica del área de estudio. -----	17
Figura 2.	Efectos del tiempo de fermentación en el contenido de proteína verdadera del Sacchapulido. -----	23
Figura 3.	Efectos del tiempo de fermentación en el contenido de NNP x 6.25 en el Sacchapulido -----	25
Figura 4.	Efectos del tiempo de fermentación en la relación PV/PB*100 del Sacchapulido.-----	26
Figura 5.	Efectos del tiempo de fermentación en la concentración de amoniaco en el Sacchapulido. -----	28

Abreviaturas utilizadas

CC: Contenido celular

FDA: Fibra detergente ácido

FDN: Fibra neutro detergente

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación

FES: Fermentación en estado sólido

h: Hora

INEGI: Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática.

L-GDH: L-Glutamato deshidrogenasa

msnm: Metros sobre el nivel del mar

MS: Materia seca

MSF: Materia seca al final de la fermentación

MSI: Materia seca al inicio de la fermentación

NH₃: Amoníaco

NNP: Nitrógeno no proteínico

NP: Nitrógeno proteínico

NT: Nitrógeno total

PB: Proteína bruta

pH: Potencial de hidrógeno

PV: Proteína verdadera

SIAP: Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesca

T: Tratamientos

1.- INTRODUCCION

La agroindustria del azúcar es una actividad de alto impacto social, constituye una fuente importante de empleo, al igual que el proceso de producción primario (Salgado *et al.*, 2003), Según Chávez (2007), este sector atraviesa por una crisis desde hace varios años debido al bajo precio del azúcar en el mercado internacional y a la controversia del Tratado de Libre Comercio (TLC) en la exportación del azúcar Mexicana a los Estados Unidos (EU). Lo anterior, agrava el futuro de los ingenios azucareros y productores, por lo cual es necesario diversificar el uso de la caña de azúcar, mediante la implementación de sistemas alternativos, por ejemplo, en la producción de alimentos para animales a través de procesos biotecnológico de fermentación en estado sólido (FES), beneficiando social y económicamente, a otro sector productivo importante, como es la ganadería, el cual presenta índices productivos bajos.

Los pastos y forrajes, principal fuente de alimento en los trópicos, tienen deficiencias nutricionales, por lo es necesario utilizar complementos alimenticios, sin embargo, estos son costosos por estar elaborados a base de granos, exportados principalmente de EU donde actualmente los están usando en la producción de biocombustibles (Cassman *et al.*, 2007) y generalmente, no están al alcance de los pequeños productores.

Los procesos de FES han mostrado ser muy prometedora en el desarrollo de productos de alta calidad nutritiva a partir de recursos fibrosos de baja calidad. Esta tecnología ha sido utilizada en el enriquecimiento proteínico del tallo de la caña de azúcar por Elías *et al.*, (1990) y Ramos *et al.*, (2006), ya que a pesar de que la caña se ha considerado como un recurso forrajero con potencial en los trópicos (Mena, 1988), debido su alta producción de biomasa por unidad de superficie, tiene un bajo contenido de proteína, minerales y digestibilidad de la fibra (Martín, 2004), lo cual limitan su uso directo en la alimentación animal.

Durante el proceso de FES, según Elías *et al.* (1990), los carbohidratos solubles de la caña de azúcar son utilizados por los microorganismos autóctonos como fuente de energía para la conversión del nitrógeno no proteínico (NNP) de la urea en nitrógeno proteínico (NP) y los metabolitos de la actividad microbiana, se quedan en el alimento, entre ellos, vitaminas, aminoácidos, AGVs, enzimas y otros, los cuales pueden contribuir a mejorar el comportamiento de los animales,

Según Pandey *et al.* (2001), el nitrógeno proteínico (NP) puede ser una vía indirecta de medir el crecimiento microbiano en la FES y la eficiencia con la cual el nitrógeno no proteínico (NNP) de la urea se convierte en NP, varía en relación a los sustratos empleados y el manejo y el nivel de urea óptimo, dependerá del tipo de sustrato a fermentar.

Lezcano y Elías (1992) obtuvieron el mayor valor de NP con 1.5% de urea en la Saccharina, Rodríguez *et al.* (2001a) obtuvieron el mayor incremento de NP con 1% de urea en la FES de la mezcla de caña, minerales y boniato (*Ipomea batata Lam.*), Becerra *et al.* (2008), obtuvieron los mayores valores de NP con la adición del 1.5% de urea en la FES del bagazo de manzana. Ramos (2005), en dos experimentos, estudió la inclusión de diferentes fuentes de cereales en la FES de la caña de azúcar usando 0.4% y 2.0% de urea, respectivamente, el valor del NP para el Sacchapulido fue de 2.33 y 2.12%, respectivamente.

Durante muchos años se consideró que la urea era la fuente de NNP más barata, sin embargo, según la FAO (2008) el precio de los fertilizantes casi se duplicó en este año.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue:

OBJETIVO GENERAL

Encontrar el nivel de urea más adecuado, desde el punto de vista biológico y económico, que incremente la síntesis proteínica en la Fermentación en Estado Sólido del Sacchapulido.

OBJETIVO ESPECIFICO

Determinar el efecto de la inclusión de niveles de urea sobre los indicadores fermentativos, la composición bromatológica y el fraccionamiento fibroso durante la fermentación en estado sólido del Sacchapulido.

HIPÓTESIS

El nivel de urea más adecuado nos permitirá mejorar la eficiencia de conversión de nitrógeno no proteínico (NNP) a nitrógeno proteínico NP y disminuirá los costos de producción del producto fermentado.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1 La caña de azúcar y su potencial de producción animal

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) es una gramínea perenne tropical, adaptada a zonas tropicales y sub-tropicales y su persistencia está asociada a su manejo (Martín, 2004). El tallo está compuesto por una parte sólida llamada fibra y una parte líquida, el jugo, que contiene agua y sacarosa, en ambas partes también se encuentran otras sustancias en cantidades muy pequeñas y las proporciones de cada componentes varían de acuerdo con el cultivar, edad, madurez, clima, suelo, método de cultivo, abonos, lluvias, riegos, etc. En general, contiene entre 73 y 76% de agua, 8 a 15% de sacarosa y 11 a 16% de fibra, además, el jugo contiene 0.2 a 0.6% de glucosa, 0.2 a 0.6% de fructosa, 0.3 a 0.8% de sales y 0.8 a 1% de ácidos orgánicos (Perafán, 2007). Según Martín (2004), la caña de azúcar contiene de 1.0 a 3% de proteína, 48.1% de paredes celulares y de 50 a 65% de digestibilidad.

En el estado de Tabasco, la caña de azúcar se cultiva en una gran diversidad de suelos (Palma *et al.*, 2007). Salgado, *et al.* (2008), indica que la textura arcillosa favorece la retención de humedad en el suelo y que modifica la relación paja:tallo, produciendo más paja, lo que provoca que se remuevan más nutrimentos en paja, obteniendo bajos rendimientos.

El desarrollo de la caña de azúcar depende en gran medida de la radiación solar, por esta razón, su cultivo se realiza en las zonas tropicales que poseen un brillo solar alto y prolongado (Li, 2002). La clorofila presentes en las hojas absorben la energía solar y esta sirve como combustible en la reacción del dióxido de carbono y el agua, que juntos con los minerales que las raíces extraen de la tierra, forman la sacarosa, que se almacena en el tallo y constituye la reserva alimenticia de la planta, a partir de la cual fabrican otros azúcares (fructosa, glucosa) y fibra.

La caña de azúcar se encuentra dentro del grupo más eficiente de convertidores de la energía solar. Posee la vía fotosintética C₄, lo que le permite realizar la fotosíntesis con los estomas prácticamente cerrados, esto duplica su eficiencia en el uso del agua y su transpiración relativa (fotosíntesis líquida/transpiración), en comparación con otras gramíneas del tipo fotosintética C₃ (avena, trigo, etc.). Por esta razón, la caña utiliza el agua

con mayor eficiencia, manteniendo a su vez, una mayor adaptabilidad en condiciones con presencia de déficit de humedad o sequía (Chávez, 1999).

Se le considera un recurso forrajero con potencial en los trópicos (Alexander, 1988) y se puede emplear en las etapas críticas de disponibilidad de pastos y forrajes, sobre todo en la época de seca, ya que la caña requiere poca agua cuando está en edad adulta. Martín (2004), revisó su rendimientos en varios países, encontró que la producción de tallos puede variar entre 88 y 148 t/ha/año e indicó que si se consideraba la biomasa total (tallos, cogollos y hojas) aprovechable para la alimentación animal, la producción se incrementaría en 30%, es decir, la producción de biomasa total sería de 114.4 y 192.4 t/ha/año respectivamente.

Según el servicio de información agroalimentaria y pesquera (SIAP, 2007), en este año, el promedio de producción de tallos de caña en México fue de 75.4 t/ha/año, destacando el Estado de Puebla con una producción de tallo de 123.3 t/ha/año, si ha esto se le agrega el 30% para considerar la biomasa total, según Martín (2004), la producción sería de 98.0 y 160.3 t/ha/año, respectivamente. Alexander (1988), mencionó que el potencial máximo de producción de biomasa total de la caña de azúcar en las regiones tropicales y subtropicales es de 395 y 276 t/ha/año, respectivamente, muy superior a lo encontrado por Martín (2004) y a lo registrado por el SIAP en el 2007.

Leng (1989), Stuart (2002) y Martín (2004) mencionaron como ventaja de la caña la disponibilidad de biomasa en la época de seca, la adaptación al medio ambiente tropical o subtropical, la menor sensibilidad a los suelos pobres y que es un cultivo aprovechable por varios años y como desventajas, a los carbohidratos solubles y estructurales en estrecha relación (inhibición parcial de la celulolisis ruminal), el bajo contenido proteínico para la nutrición microbiana y del animal, el déficit y desbalance mineral y la baja digestibilidad de la fibra, lo cual limita el consumo voluntario.

2.2 Importancia de la diversificación en el uso de la caña de azúcar

Normalmente, la caña se ha utilizado para la producción de azúcar, y este ha sido, desde hace cientos de años, uno de los componentes más importantes y universalmente utilizados en la dieta humana (Suárez y Morin, 2005). Sin embargo, desde hace muchos años, la industria del azúcar enfrenta una crisis por la importación desmedida de jarabes fructosados, que son mucho más baratos que el azúcar de caña, por se producidos a partir

de los grandes excedentes exportables de maíz, subsidiados por el gobierno de EU, nuestro principal proveedor de fructuosa, y a la restricción, a pesar del TLC, a las exportaciones del azúcar mexicana a Estados Unidos (García, 2004; Chávez, 2007).

La diversificación equivale al uso integral de la caña de azúcar, la optimización de los subproductos de la fabricación de azúcar y del azúcar en sí, como materias primas para su transformación en otros productos de importancia económica y social. Equivale también, al uso óptimo de la tierra utilizada a este cultivo, por ejemplo, mediante la introducción de cultivos intercalados o en rotación (Salgado et al., 2003).

En ningún caso se debe entender que la diversificación significa la sustitución de la caña de azúcar por otros cultivos. Se trata de combinar el adecuado aprovechamiento integral de la caña y la utilización de los subproductos de la industria azucarera. Según Subirós (1995) esta acción podría contribuir al desarrollo de las economías de los países, que producen la caña de azúcar.

Ruiz (1994) mencionó que fue en la década de los años 70 que comenzó a tomarse conciencia, principalmente en América Latina, de realizar estudios con el objetivo de perfeccionar las raciones basadas en caña de azúcar para la producción de carne y leche, ya que la caña de azúcar y sus subproductos, pueden ser usados en la producción pecuaria en los países con grandes déficit de cereales, pastos y otras fuentes proteínicas, para sostener los esquemas tradicionales de alimentación animal.

Al respecto, Ramos (2005), Ramos *et al.* (2006), produjeron por FES, alimentos a base de caña de azúcar con 18 a 20% de proteína bruta (PB), 12 a 13% de proteína verdadera (PV) y 2.8 Mcal/Kg de materia seca (MS) que fueron utilizado exitosamente en la alimentación bovina, ya que se incrementó la ganancia diaria de peso de los animales en pastoreo, así como la digestibilidad de la MS del pasto. Estos alimentos son alternativas que tienen no sólo importancia económica para los países de clima tropical, sino que representan una contribución estratégica a largo plazo para aliviar la crítica competencia entre el hombre y la ganadería en el consumo de cereales y energía (Vivas y Carvajal, 2004).

2.3 La biotecnología en la producción de alimentos

La biotecnología ha sido utilizada por el hombre desde hace miles de años en diversas actividades (preparación del pan, queso, producción de bebidas alcohólicas, etc.). Los conocimientos del hombre han ido perfeccionando a la biotecnología tradicional, ésta, no es en sí misma una ciencia; es un enfoque multidisciplinario que involucra varias disciplinas y ciencias (biología, bioquímica, genética, virología, agronomía, ingeniería, química, medicina y veterinaria entre otras) que permite analizar fenómenos y procesos biológicos en una forma integradora (López *et al.*, 2003). Ofrece la posibilidad de producir, a partir de recursos renovables y disponibles en abundancia, gran número de sustancias y compuestos esenciales para la vida y para mejorar la condición del hombre (Casas, 1991).

La FAO (2003), define a esta como “toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados, para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos”. Puede aplicarse a la producción de alimentos de mayor valor nutritivo para los animales a partir de recursos fibrosos con bajo contenido de proteína disponibles. Sin embargo, la biotecnología en la producción de alimentos no implica necesariamente referirse a los métodos de ingeniería genética, sino a procesos de fermentación sólidos ó líquidos, que se pudieran catalogar de rústicos o de campo, donde no es necesario un laboratorio para adicionar nutrientes como nitrógeno y minerales en algunos productos, incluso en residuos fibrosos o excretas y otros, que por lo general se desechan, y se puede elevar su contenido de proteína de 3 hasta un 15 % o más (Ramos, 2005; Elías *et al.*, 2008).

El avance científico-tecnológico, ha dado lugar a lo que actualmente se conoce como “biotecnología moderna” que utiliza técnicas de biología molecular, ingeniería genética, bioquímica y bioinformática (Said *et al.*, 2005). La biotecnología moderna está compuesta por una variedad de técnicas derivadas de la investigación en biología celular y molecular, las cuales, pueden ser utilizadas en cualquier industria que utilice microorganismos o células vegetales y animales, se puede agrupar en cuatro categorías básicas:

- 1) Técnicas para el cultivo de células y tejidos.
- 2) Procesos biotecnológicos, fundamentalmente de fermentación.
- 3) Técnicas que aplican la microbiología a la selección y cultivo de células y microorganismos.

- 4) Técnicas para la manipulación, modificación y transferencia de materiales genéticos (ingeniería genética).

Los primeros tres grupos, se basan en el conocimiento de las características y el comportamiento de los microorganismos para lograr objetivos específicos, en la obtención de nuevos productos o procesos. El último grupo, se basa en la manipulación de las características estructurales y funcionales de los organismos.

Iáñez (2001) y Fernández (2007), señalan que la biotecnología se puede aplicar en la obtención de:

Productos farmacéuticos:

- Antibióticos
- Vacunas
- Hormonas

Diagnósticos

- Diagnósticos para salud humana
- Diagnósticos para agricultura y ganadería
- Ensayos para calidad de alimentos
- Ensayos para calidad ambiental

Alimentación

- Mejora de procesos tradicionales de obtención de alimentos y bebidas
- Nuevos alimentos y bebidas
- Nutraceuticos: alimentos con perfiles determinados de nutrientes
- Aditivos alimentarios

Medio ambiente

- Tratamientos de residuos urbanos, agrícolas e industriales, biorremedios y biorreparación
- Producción de energía a partir de biomasa

2.4 Antecedentes de Fermentación

Hasta el siglo XIX, la fermentación permaneció totalmente inexplicada. En la Antigüedad se le atribuía a los dioses o a los demonios, la fermentación es una de las biotecnologías aplicadas más antiguas, existen de manera natural desde el comienzo de la vida en el planeta y fueron empleados de forma artesanal en Asia, África y América Central. Se ha utilizado para elaborar y conservar alimentos a partir de cereales, yuca, entre otros (Ruiz *et al.*, 2007).

La fermentación puede mejorar el contenido nutritivo de los alimentos a partir de la biosíntesis de vitaminas, aminoácidos esenciales y proteínas. Las proteínas y las fibras son más digeribles, proporcionan más micronutrientes y se degradan los factores antinutritivos; también enriquece la dieta a través de la producción de una variedad de sabores, texturas y aromas (FAO, 1998).

Ramírez (2003), indica que los procesos fermentativos se clasifican en aerobios (en presencia de oxígeno) y anaerobios (en ausencia de oxígeno).

La fermentación aerobia de la materia orgánica, consiste en su degradación en presencia de oxígeno por medio de bacterias, produciendo principalmente dióxido de carbono (CO_2), agua (H_2O) y diversos componentes.

La fermentación anaerobia de la materia orgánica, consiste en su degradación en ausencia de oxígeno por medio de bacterias, produciendo el denominado biogas, que es una mezcla de múltiples componentes, donde predomina el metano y en menor cantidad, bióxido de carbono (CO_2), amoníaco (NH_3), ácido sulfhídrico (SH_2) y metano (CH_4).

2.5 Definiciones de la Fermentación en Estado Sólido (FES)

El concepto de FES, ha variado en la literatura a medida en que se ha profundizado su estudio, Hesseltine (1972) empleó el término de FES a todas las fermentaciones donde el sustrato no es líquido. Zadrazill *et al.* (1996) definen que la FES, es un proceso natural, mediante el cual se da continuidad a importantes ciclos vitales, dentro de los cuales destacan los de descomposición de la materia orgánica mediante los hongos y levaduras, y estos tienen una gran habilidad para asimilar residuos lignocelulósicos. Viniegra-González (1997), plantea que la FES es un proceso microbiológico que ocurre comúnmente en la superficie de materiales sólidos que tienen la propiedad de absorber y contener agua, con o

sin nutrientes solubles. Raimbault (1998) menciona que la FES es un proceso de transformación microbiana aeróbica, de un material sólido por acción de hongos, bacterias y levaduras.

Según Pandey (2001), los términos de FES y fermentación en sustrato sólido (FSS) se han usado ambiguamente, y deben distinguirse; FSS debe usarse sólo en los procesos donde el sustrato actúe como fuente de carbono y nutrientes para el crecimiento microbiano en ausencia o casi en ausencia de agua libre y FES debe definir una fermentación que ocurra en ausencia o casi en ausencia de agua libre, empleando un sustrato natural como el caso anterior o usando un material inerte como soporte sólido. Al respecto, Gutierrez *et al.* (2003) mencionan como sustratos naturales al almidón, celulosa, residuos agroindustriales como los granos, cereales y subproductos, la yuca, papa, arroz, frijoles y la pulpa de remolacha azucarera y los inertes, al bagazo de caña de azúcar, perlita, amberlita, espuma de poliuretano y otros.

Lagunas *et al.* (2006) define la FES, como en el crecimiento de microorganismos (principalmente hongos) en materiales sólidos húmedos con ausencia de agua libre. Julián *et al.* (2007) después de haber analizado distintas definiciones de diversos autores, concluye que la FES es un proceso en el cual se desarrollan microorganismos en materiales sólidos húmedos.

La tecnología de la FES se basa en la utilización de fuentes de carbono orgánico y nitrógeno inorgánico, para obtener proteína mediante el desarrollo de microorganismos (Álvarez, 1999). Una de las ventajas de la FES, es que el proceso requiere de equipos de bajo costo y abundantes residuos agroindustriales como sustrato (Castilho *et al.*, 2000) y algunos requieren pretratamientos (Mitchell *et al.* 2002). La selección del sustrato depende de varios aspectos, principalmente el costo y su disponibilidad (Pandey *et al* 2001).

Elías *et al* (2008), señaló que los sustratos empleados en los procesos de FES, deben presentar las siguientes características:

- Contenido satisfactorio de fuentes de carbono disponibles para el uso microbiano
- Estructuras físicas fuertes para la fermentación en cepas profundas y que permitan el flujo de aire.
- Poseer una estructura desmenuzada que permitan el intercambio gaseoso

- Capacidad máxima de almacenamiento del agua que permitan la solubilización de nutrientes
- Contenido moderado de sustancias indigestibles

2.6 Factores que intervienen en el proceso de la FES

Según Krishna (2005), existen factores físicos, químicos y ambientales, que pueden afectar el proceso de FES (actividad del agua, temperatura, pH, tipo de sustrato, tamaño de partícula, aireación, entre otros). Uno de los criterios de mayor importancia para el éxito en los procesos de FES, es la selección de la cepa y el sustrato conveniente (Pandey *et al.* 2001; Krishna, 2005).

Fuente de carbón y la relación carbón/nitrógeno. La fuente de carbón representa la fuente de energía que puede estar disponible para el crecimiento de los microorganismos y puede ser un monosacárido simple o un polisacárido complejo. La selección de la fuente de carbón está en función de los microorganismos a emplear y el producto a obtener (Tronconi, 2003). El nitrógeno es un factor importante que determina el crecimiento de los microorganismos y desempeña un papel importante en el cambio de pH en el sustrato durante la fermentación.

Temperatura. Probablemente el más importante de todas las variables físicas, que afectan la FES, porque el crecimiento y la producción de enzimas o metabolitos son sensible a la temperatura (Krishna, 2005). La temperatura se eleva debido a las características exotérmicas de los procesos de fermentación y es difícil de controlar. Muchos de los microorganismos usados en la FES son mesófilos y su temperatura óptima de crecimiento está entre 20 y 40 °C y un máximo inferior a 50 °C.

Actividad del agua. La actividad del agua del medio se considera como un indicador fundamental para la transferencia de masa, de agua y los solutos, a través de la membrana celular (Anupama y Ravindra, 2001). Altos valores de humedad pueden desplazar los gases del espacio entre las partículas y causar aglomeración y dificultar el intercambio gaseoso entre las partículas. Por otro lado, altos valores de humedad pueden hinchar el sustrato, lo cual incrementa la porosidad y esto favorece la difusión y acción de las enzimas, y mejora la penetración micelial (Mitchell *et al.* 2002; Krishna, 2005). En general, se ha establecido

que en el caso de las bacterias, la humedad de la matriz sólida puede ser mayor de 70%, para las levaduras de 60 a 70% y en el caso de los hongos, de 20 a 70%.

pH. Cada microorganismo posee un rango de pH óptimo para crecer. Por otro lado, la liberación de amonio por la desaminación de la urea u otras aminas puede incrementar el pH. La magnitud del cambio de pH, dependerá de la actividad metabólica de los microorganismos y de la capacidad amortiguadora del sustrato (Mitchell *et al.*, 2002).

El pH cambia por diferentes razones; normalmente disminuye por la secreción de ácidos orgánicos como acéticos y lácticos durante el proceso. No obstante, la fuente de nitrógeno utilizada influye mucho en la tendencia que sigue el pH, el control de pH es prácticamente imposible debido a la heterogeneidad del sistema, y la falta de equipo adecuado y electrodos para determinar el pH en materiales sólidos (Krishna, 2005).

Un intento para superar la variación de pH durante los procesos de FES es el de formular sustratos en que se considere la capacidad amortiguadora de los diferentes componentes empleados, o por el uso de tampón formulados con componentes que no tengan influencia letal en la actividad biológica. En general, se ha observado que el crecimiento de los hongos tiene un rango de pH entre 3.5 y 6, el de las levaduras entre 4.5 y 7, y el de las bacterias ligeramente mayor que los hongos. Sin embargo, esto no es una regla, ya que algunos lactobacillus y otras bacterias, pueden crecer a pH 2 (Pandey *et al.*, 2001).

Aireación. Resulta un factor básico para el desarrollo del proceso. La aireación se utiliza para suministrar el oxígeno necesario, para extraer el CO₂ formado, así como para extraer el calor metabólico evolucionado, de manera que el flujo óptimo de aire debe tomar en consideración la naturaleza del microorganismo utilizado, los requerimientos de oxígeno para el crecimiento y/o la formación del producto deseado (Krishna, 2005).

Tamaño de partículas. Generalmente, un sustrato de pequeño tamaño de partículas puede proporcionar mayor superficie para el ataque microbiano, porque existe una mayor superficie de contacto entre el microorganismo y el sustrato, y por consiguiente, un mejor aprovechamiento de los nutrientes y mejor transferencia de oxígeno (Krishna, 2005). De igual forma se optimizan los espacios vacíos inter partículas que faciliten la transferencia de gases y de calor. Sin embargo, el tamaño de partículas muy pequeño, provocaría que el sustrato se aglomere y puede interferir con la respiración aeración microbiana, dando por resultado un pobre crecimiento. El mayor tamaño de partículas proporciona mejor

eficiencia de respiración/aireación, debido al incremento del espacio entre las partículas, pero limita la superficie de ataque microbiano (Pandey *et al.* 2001).

2.7 Fermentación en estado sólido de la caña de azúcar

El contenido celular, la concentración de azúcar y el contenido de MS de la caña, se incrementan con la edad de la planta, así mismo, la digestibilidad de la materia seca se incrementa con la edad, debido a que hay mayor acumulación de azúcares solubles, el cual puede ser de 68% de la materia seca (Figuroa y Ly, 1990). La alta concentración de azúcares solubles (sacarosa, glucosa y fructosa) de la caña (Salgado, 2003; Martín, 2004; Perafan, 2007), puede limitar su uso como dieta básica energética por los rumiantes, ya que según Elías (1983) y Galindo (1988), inhibe la celulolisis ruminal, lo cual influye negativamente en la digestibilidad de la fibra y el consumo voluntario. Sin embargo estos pudieran ser aprovechados en los procesos de FES.

Durante el proceso de FES, los carbohidratos solubles de la caña son utilizados por los microorganismos autóctonos encontrados por Valiño *et al.* (1994ab) como fuente de energía para la conversión del NNP de la urea en NP a través de un proceso físico – biológico (Elías, 1990), lo anterior es posible debido a que algunas especies de los microorganismos, poseen la enzima ureasa para hidrolizar la urea y liberar amoníaco, el que puede ser usado por otras bacterias y levaduras que no poseen esta enzima. El amoníaco liberado puede convertirse en amonio por efecto de un bajo pH y a través de la enzima L-glutamato deshidrogenasa puede incorporarse a la célula microbiana como sillares de aminoácidos (Metges y Loh, 2003).

Según Peláez *et al.* (2008), la manera de mejorar la disponibilidad de nutrimentos de la caña de azúcar y sus derivados, es mediante la FES.

2.8.- Alimentos para animales, obtenidos por FES a partir de la caña de azúcar y otros subproductos

La FES es ampliamente utilizado para producir alimentos por las múltiples ventajas que ofrece, principalmente no produce residuales y puede involucrar cultivos mixtos, microbiota indígena, microbiota del sustrato o ambas. La utilización de los productos y subproductos de la caña, y de otros residuos agrícolas en los procesos de FES permiten un aprovechamiento integral de éstos, utilizándolos de manera que no causen daño al medio

ambiente y a la vez tengan una utilidad económica. Algunos de ellos son de interés especial para la producción de proteína unicelular y al ser utilizados como sustratos para fermentaciones han dado origen a productos destinados para la alimentación animal. Entre estos productos se destacan:

a) Saccharina:

Obtenido por Elías *et al.* (1990) en Cuba, usando 98% de tallo de caña, 1.5% de urea y 0.5% de minerales, fermentándola durante 24 horas. Su contenido de proteína bruta (PB), proteína verdadera (PVE) y fibra bruta (FB) está en el rango de 11.1 a 16.0%, entre 8.9 y 13.8% y de 24.6 a 26.6%, respectivamente.

b) Sacchasoya:

La variante fue la inclusión de soya desgrasada y sin desgrasar, en sustitución de la urea (Elías y Lezcano 2000). A medida que se incrementó el nivel de N-ureico, el pH y el amoníaco aumentaron. La PB y PV disminuyeron con el aumento del N-ureico, independiente de la fuente de soya. No obstante, la disminución fue mayor en presencia de soya sin desgrasar.

c) Caña, soya y maíz, inoculados con Vitafert:

Se estudió el efecto que producía la harina de maíz o de soya desgrasada, o ambas, en la FES de la caña inoculada con Vitafert El Vitafert es un producto que se obtiene por fermentación en estado líquido, de una mezcla de excreta de gallinas, urea, sales minerales y otros sustratos ricos en bacterias lácticas y levaduras (Elías *et al.*,2008).

El Vitafert incrementó la PB, PV, MO y disminuyó la FB en la caña (testigo). Los mayores valores de PB, PVE y DMO se obtuvieron cuando se mezcló la caña con el maíz, la soya y se inoculó con el Vitafert, 22.19, 15.93, 95.39%, respectivamente. Así mismo, el valor de FB fue el menor (9.92%).

d) Sacchayuca:

Rodríguez (2005), sustituyó la caña de azúcar por yuca a diferentes proporciones, (0, 16, 36 y 56%) y a todos los tratamientos le adicionó 4% de soya, 2% de urea, 0.2% de sulfato de magnesio y 0.5% de minerales; además, los inoculó con 10% de Vitafert. Con ello hubo la disgregación de los componentes de la fibra; pero, el Vitafert disminuyó el pH y no hubo incremento en el contenido de PV, lo cual se debió, posiblemente, al efecto tóxico que tienen el ácido láctico y el ácido acético a pH bajo, en otro trabajo, pero con los mismos

tratamientos, incluyó carbonato de calcio (0, 0.3, 0.6 y 0.9%) como amortiguador. El pH se elevó de 5.77 a 6.59 con la inclusión del mayor porcentaje del tampón y la PB, la PV y la DMS se incrementaron.

e) Bagarip:

Pedraza (2000), obtuvo un alimento rico en proteínas a partir del bagazo de la caña. Se basa en la FES de una mezcla de cachaza y miel final, sobre bagazo; como inóculo utilizó, fundamentalmente, una cepa de levadura.

Los valores de FB inferiores a 15% y proteína verdadera entre 5 y 11%. Sustituyó los alimentos tradicionales hasta el 11% en pollos de ceba, el 20% en gallinas ponedoras y cerdos en pre-ceba y el 60% en conejos en ceba. Se incrementó la producción de leche durante la época seca en 1.8 L de leche/vaca/día, sin alteraciones en su calidad.

f) Banano Fermentado:

Álvarez *et al.* (2002) utilizaron el banano rechazado como sustrato para producir proteína unicelular por medio de la fermentación en estado sólido, utilizaron el hongo *Aspergillus niger*, como nutrientes urea, sulfato de amonio, ácido cítrico (como regulador del pH). El banano fermentado alcanza un contenido de proteína verdadera de 9.56%.

g) Sacchaboniato:

Rodríguez (2004), incluyó boniato (*Ipomea batata, Lam*). En un primer estudio utilizó 25, 50 y 75%, encontró incremento considerable de amoníaco, debido a la fuerte actividad ureolítica; la PB disminuyó con 25 y 50% de inclusión; además, se redujo la carga microbiana inicial y los componentes fibrosos del sustrato se disgregaron. La reducción de la carga microbiana provocó que el sustrato fuera menos degradado, en un segundo experimento estudió la dinámica de fermentación (0, 24, 48, 72, 96, 168 y 360 horas) incluyendo 50% de caña y 50% de boniato; el mayor incremento de la biomasa se obtuvo a las 96 horas, en un tercer experimento, estudió niveles de N-ureico (0.5, 1 y 1.5%) y la mayor síntesis de proteína microbiana y la mejor eficiencia de utilización del nitrógeno se logró a las 96 horas con la adición de 1% de urea.

h) Caña de azúcar con excreta vacuna:

Carrasco *et al.* (1998 a y b) mezcló la caña con excreta vacuna a una proporción 70:30 (base húmeda) y se le adicionó 0.5% de minerales. Se estudió el efecto de tres niveles de urea (0, 0.5 y 1%) y dos grosores de capa (15 y 20 cm). La concentración de amoníaco y el

pH se incrementaron al aumentar la cantidad de urea, independiente del grosor de la capa. Las dosis de urea aumentó la PV, independientemente del grosor de la capas y los mayores valores se obtuvieron con 0.5 y 1% de urea y grosor de la capa de 15 cm (9.56 y 9.99%, respectivamente). Similar resultado se obtuvo para la PB (10.18 y 11.79%, respectivamente).

i) Cáscara de Cacao fermentado:

Bermúdez *et al.*, (2002), elaboraron un producto fermentado, utilizando la cáscara de cacao (*Theobroma cacao L*) de Cuba y de la Costa Ecuatoriana, mediante el hongo *Pleurotus ostreatus* var. Florida. Las cáscaras de cacao se picaron y se procedió a secarlas, molerlas y tamizarlas, fueron rehidratadas durante 24 horas en agua y posteriormente, fueron pasteurizadas. La cepa del hongo se cultivó en cajas petri con agar Sabouraud. La inoculación del sustrato se realizó cuando este alcanza la temperatura ambiente, mediante un mezclado homogéneo de las semillas del hongo. Se colocaron en fundas de plástico de 2 kg de capacidad. El sustrato proveniente tanto de ecuador y de cuba, presentaron MS de 40.62 y 31.18%, de PB de 13.26 y 13.88% y de FB de 23.45y 19.21% respectivamente, lo cual hace posible su utilización en la alimentación animales, ellos señalaron que el aumento de la PB se debe a las pérdidas de MS en forma de CO₂ del sustrato y restos del miscelio que quedan aún presentes.

j) Sacchamaíz

Ramos *et al.* (2006) en este experimento le adicionó el 20% de maíz molido, caña de azúcar mezclada con 4% de pasta de soya, 0.5 % de minerales, 0.3% de sulfato de amonio y 2% de urea durante 24 horas de fermentación. El contenido de PB y PV para el Sacchamaíz fue 18.13% y 12.65% respectivamente. Por otro lado, las concentraciones de amoniaco al final de la fermentación fueron de 18.1 mmol/L.

k) Sacchasorgo

Ramos *et al.* (2006) Similar al sachamaiz, la variante fue la inclusión de 20% de sorgo. El contenido de PB y PV fue de 18.9 y 12.8%. Por otro lado, las concentraciones de amoniaco al final de la fermentación fueron de 21.3 mmol/L.

l) Sacchapulido

Ramos *et al.* (2006) similar al sacchamaíz y sachasorgo, la variante fue la inclusión de 20% pulido de arroz, Los valores de PB y PV fueron de 19.7 y 13.3%, respectivamente.

m) Sacchacítrico

Ramos *et al.* (2006) similar al sacchamaiz y sachasorgo y sacchapulido, la variante fue la inclusión de 20% de pulpa de cítrico. El contenido de PB y PV fue de 19.1 y 10.6%., respectivamente. Por otro lado, las concentraciones de amoniaco al final de la fermentación fueron de 28.4 mmol/L.

n) Manzarina

Becerra *et al.* (2008), fermentaron el bagazo de manzana en dos experimentos, lo mezclaron con dos niveles de urea (1.5 y 2.0%, experimento 1) y le adicionaron 3 niveles de maíz molido (0, 10 y 20%, experimento 2). En el primer experimento, la DMO fue de 62.21 y 66.67%, el contenido de FDN de 56.5 y 55.2% y el contenido de FDA de 36.47 y 42.91% para 1.5 y 2% de urea, respectivamente. Con la adición del maíz, disminuyó linealmente la DMO 59.8, 65.0 y 68.3%, la FDN 64.5, 55.5 y 47.4% y la FDA 53.2, 35.7 y 30.7%, respectivamente. La PB y PV disminuyó con la adición de urea.

Por todo lo anteriormente, el panorama para mejorar la producción bovina a través de la suplementación en el trópico es muy amplia, basta visualizar los materiales con los que se cuentan a nivel local o regional y mejorarlos nutricionalmente, a través de procesos biotecnológicos sencillos, como la FES.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Localización geográfica del área de estudio

Esta investigación se realizó en el laboratorio de Ciencia Animal del Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco, el cual se encuentra ubicado en el kilómetro 3.5 Periférico Carlos A. Molina Cárdenas – Huimanguillo en la región de la Chontalpa, en el municipio de H. Cárdenas, Tabasco.

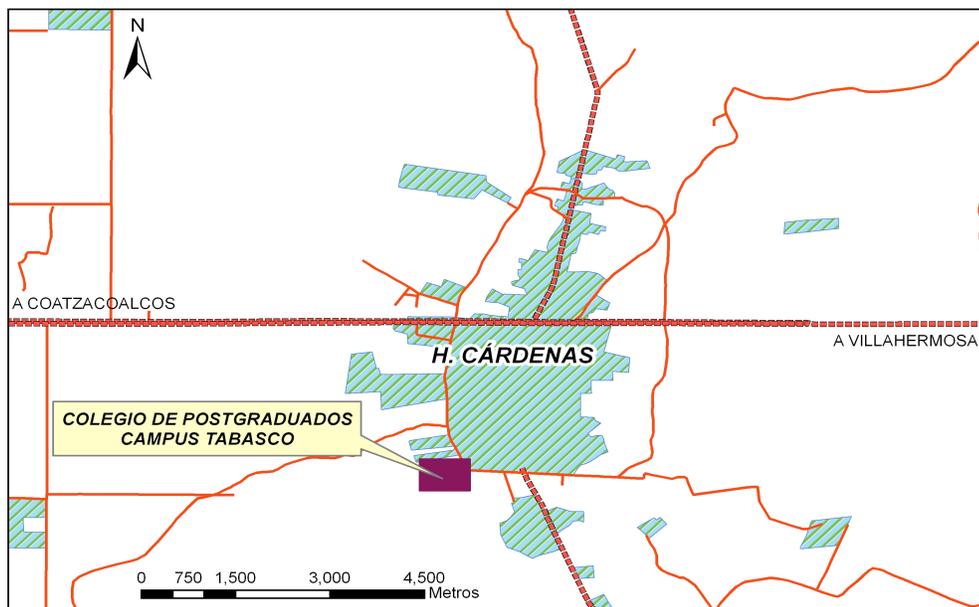


Figura1. Ubicación geográfica del área de estudio

3.2 Tratamientos (T) y diseño experimental

El experimento fue de tipo factorial (5 x 2), el primer factor consistió de 5 niveles de urea (0, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0%) y el segundo factor consistió en dos tiempos de fermentación (0 y 24 h). Se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo en parcelas divididas en tiempo con 6 repeticiones, de acuerdo al modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + A_j + e_{i(j)} + B_k + AXB_{jk} + e_{ijk}, \quad i = 1, 2, \dots, 6; j = 1, \dots, 5; k = 1, 2$$

Donde:

Y_{ijk} = Valor de la variable en la unidad experimental ijk

μ = Media general

A_j = Efecto del nivel j del factor A

$e_{i(j)}$ = Error a

B_k = Efecto del nivel k del factor B

AXB_{jk} = Efecto de la interacción AXB en el nivel jk

e_{ijk} = Error b

Cuadro 1. Distribución de los tratamientos (T)

Tiempos de fermentación	Niveles de Urea (%)				
	0	0.5	1.0	1.5	2.0
0 h	T1	T2	T3	T4	T5
24 h	T1	T2	T3	T4	T5

3.3 Procedimiento experimental

El tallo de caña de azúcar limpio (sin hojas, sin pajas y sin cogollo) se molió a las 24 horas de cortada y se mezcló con el sulfato de amonio ($(NH_4)_2SO_4$), minerales, pasta de soya, pulido de arroz y urea según tratamientos (Cuadro 1). La urea se adicionó en forma líquida y fue diluida a razón de 1:5 (100 g de urea en 500 ml de agua destilada), para que todos los tratamientos tuvieran la misma humedad inicial, al T1 se le adicionó 10 ml de agua sin urea, al T2 se le adicionó 2.5 ml de la solución + 7.5 de agua, al T3 se le adicionó 5 ml de la solución + 5 de agua, al T4 se le adicionó 7.5 ml de la solución + 2.5 de agua y al T5 se le adicionó 10 ml de la solución.

Cuadro 2. Porcentaje de los ingredientes mezclado en el Sacchapulido con diferentes niveles de urea.

Tratamientos	Pulido de arroz	Pasta de soya	Minerales	Sulfato de amonio	Urea	Caña
0.0 % urea	20.0	4.0	0.5	0.3	0.0	75.2
0.5 % urea	20.0	4.0	0.5	0.3	0.5	74.7
1.0 % urea	20.0	4.0	0.5	0.3	1.0	74.2
1.5 % urea	20.0	4.0	0.5	0.3	1.5	73.7
2.0 % urea	20.0	4.0	0.5	0.3	2.0	73.2

3.4 Métodos de muestreo:

Con los porcentajes de los ingredientes indicado en el Cuadro 2, se pesó 200 g y se homogenizó, de estos, se utilizó 100 g para determinar los parámetros bromatológicos y fermentativos al inicio de la fermentación (0 h) y los 100 g restantes, se depositó en los frascos Roux y se dejó fermentar durante 24 h en una estufa calibrada a 37 °C, según la metodología descrita por Elías *et al.* (1994). Cada frasco Roux, constituyó una unidad experimental. Después de las 24 h de fermentación, el contenido del frasco Roux se recolectó en su totalidad y se homogenizó individualmente. Se pesó 10 g de muestra de cada uno de los tratamientos y se depositó en Matraz de Erlenmeyer de 200 ml y se les añadió 90 ml de agua destilada, posteriormente, se agitaron durante 30 minutos en un agitador magnético y se filtró a través de gasas estériles para medir los indicadores fermentativos.

3.5 Indicadores Fermentativos

1. pH: Al filtrado se le tomó inmediatamente el pH con un potenciómetro marca ultra BASIC PROBIOTEK.
2. Amoníaco (MC Cullough, 1967). Para preparar las muestras, se tomó 5 ml del filtrado que se obtuvo en la extracción líquida, se depositó en un matraz volumétrico aforado de 25 ml y se le adicionó 5 ml de HCl 0.1 N, se agitó y se aforó con agua destilada y se procedió a guardarlos en el refrigerador para su análisis posterior.
3. Ácido láctico (Madrid *et al.* 1999). Solo se analizó a las 24 horas, en un diseño completamente al azar, con 6 repeticiones por tratamientos. Para preparar la muestra, se tomó 8 ml del filtrado de la extracción líquida, se depósito en un frasco

de 20 ml y posteriormente, se le adicionó 2 ml de ácido metafosfórico al 25% para preservar la muestra y se llevo al frío para su análisis posterior.

3.6 Indicadores Bromatológicos:

El total de los sólidos que quedaron en los frascos Roux, se secó en una estufa a 60 °C y se molió en molino Thomas - Willey modelo 4, con criba de 2 mm para análisis bromatológicos posteriores a las 0 y 24 h:

1. Materia seca (AOAC, 1995)
2. Proteína bruta (PB), Micro – Kjeldahl, según AOAC (1995)
3. Nitrógeno no precipitable al ácido tricloroacético (NNP), según (Hayward, 1975)
4. Proteína verdadera (PV), se calculó por diferencia, $(PB) - (NNP \times 6.25)$
5. Se calculó la relación $((PV/PB) \times 100)$ según Elías y Lezcano (1994)
6. Fibra detergente neutro (FDN) de acuerdo a de Van Soest et al. (1991)
7. Fibra detergente ácido (FDA) de acuerdo a de Van Soest et al. (1991)
8. Se calculó el contenido celular $(100 - FDN)$
9. Se calculó la hemicelulosa $(FDN - FDA)$
10. El balance de nitrógeno se obtuvo por diferencia con los datos obtenidos al inicio de la fermentación (hora cero) y los datos obtenidos al final de la fermentación (24 horas)

5. RESULTADOS

5.1 Efectos del tiempo de fermentación y niveles de urea en los parámetros bromatológicos del Sacchapulido

5.1.1. Efectos del tiempo de fermentación y niveles de urea en el contenido de materia seca (MS)

La MS fue afectada ($P < 0.001$) por el tiempo de fermentación, ya que a las 24 h de fermentación, disminuye en 2.2 unidades percentiles. Los niveles de urea no la afectaron (Cuadro 3).

Cuadro 3. Efectos del tiempo de fermentación y niveles de urea en el contenido de materia seca y proteína bruta en el Sacchapulido.

FACTOR	Materia Seca %	Proteína Bruta %
Tiempo, h		
0	42.0 ^a	14.6 ^b
24	39.8 ^b	15.4 ^a
EE±	0.10***	0.11***
Niveles de urea, %		
0.0	41.3 ^a	12.2 ^c
0.5	41.2 ^a	13.7 ^c
1.0	41.0 ^a	15.8 ^b
1.5	41.0 ^a	15.7 ^b
2.0	40.4 ^a	18.0 ^a
EE ±	0.3	0.22***

^{abc} Medias con diferentes superíndices en la misma columna difieren a $P < 0.05$ (Tukey, 1953)

** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

5.1.2. Efectos del tiempo de fermentación y niveles de urea en el contenido de proteína bruta (PB)

La PB fue afectada ($P < 0.001$) por el tiempo de fermentación, se incrementó en 0.8 unidades percentiles a las 24 h. También fue afectado ($P < 0.001$) por los niveles de urea, los valores menores se obtuvieron con la adición de 0 y 0.5% de urea, sin diferencias entre ellos, los

valores intermedio se encontraron con la adición del 1.0 y 1.5% de urea, sin diferencias entre ellos, y el valor más alto se encontró con la adición del 2% de urea (Cuadro 3).

5.1.3. Efectos del tiempo de fermentación y niveles de urea en el fraccionamiento de la fibra en el Sacchapulido

La FDN fue afectada ($P<0.01$) por el tiempo de fermentación, se incrementó en 4.1 unidades percentiles a las 24 h, sin embargo, los niveles de urea no la afectaron. Por otro lado, la FDA, fue afectada ($P<0.01$) por el tiempo de fermentación, se incrementó en 1.9 unidades percentiles a las 24 h, y de igual manera que la FDN, los niveles de urea no la afectaron. El contenido celular disminuyó ($P<0.01$) en 4.1 unidades percentiles a las 24 h de fermentación y también no fue afectado por los niveles de urea. El contenido de hemicelulosa no fue afectado por el tiempo de fermentación ni por los niveles de urea (Cuadro 4).

Cuadro 4. Efectos del tiempo de fermentación y niveles de urea en las fracciones de la fibra del Sacchapulido.

FACTOR	FDN	FDA	Contenido Celular	Hemicelulosa
Tiempo, h				
0	33.6 ^b	18.1 ^b	66.4 ^a	15.5 ^a
24	37.7 ^a	20.0 ^a	62.3 ^b	17.7 ^a
EE ±	0.3**	0.36**	0.84**	0.85 NS
Niveles de urea, %				
0	36.8 ^a	20.0 ^a	63.2 ^a	17.2 ^a
0.5	35.5 ^a	21.3 ^a	65.0 ^a	14.1 ^a
1.0	34.8 ^a	17.9 ^a	65.2 ^a	17.1 ^a
1.5	35.38 ^a	17.9 ^a	64.6 ^a	17.5 ^a
2.0	35.6 ^a	19.0 ^a	64.4 ^a	17.1 ^a
EE ±	1.4 NS	1.0 NS	1.44 NS	0.9 NS

^{abc} Medias con diferentes superíndices en la misma columna difieren a $P<0.05$ (Tukey, 1953)

** $P<0.01$, NS: No significativo

5.1.4. Efectos del tiempo de fermentación y niveles de urea en el contenido de proteína verdadera (PV)

Se encontró interacción ($P < 0.01$) en el contenido de PV. Al comparar los tiempos de fermentación (0 y 24 h), no hubo diferencias cuando no se adicionó urea (tratamiento 1), sin embargo, cuando se adicionó urea, el contenido de PV fue mayor a las 24 h de fermentación en todos los tratamientos (Figura 2).

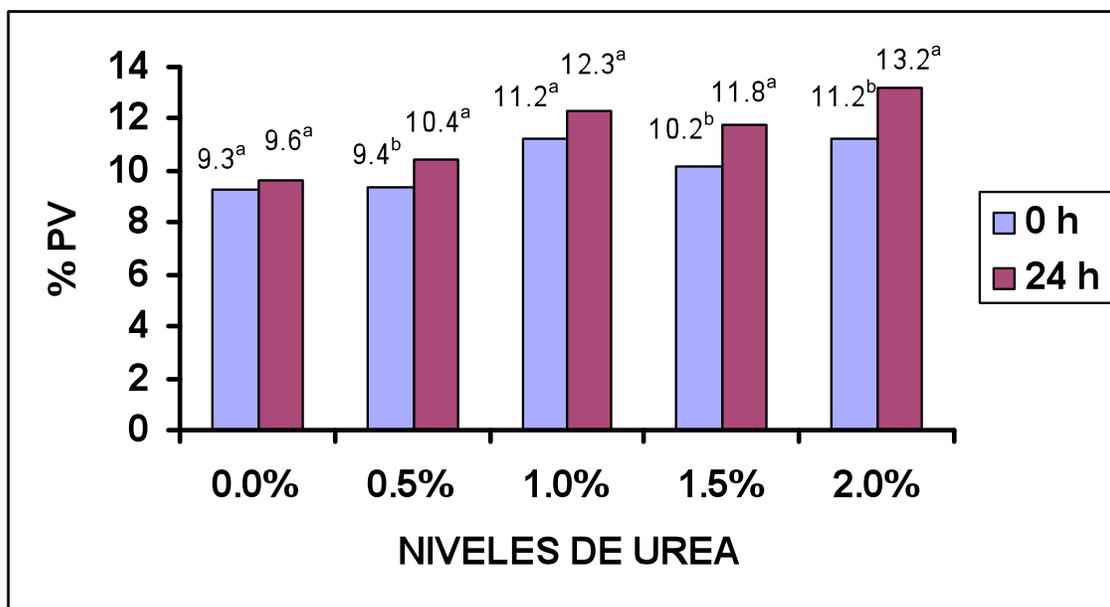


Figura 2. Efectos del tiempo de fermentación en el contenido de proteína verdadera del Sacchapulido.

Por otra lado, al comparar los niveles de urea en los diferentes tiempos de fermentación, se encontró que a las 0 h, los valores de PV fueron menores en los tratamientos que se le adicionó 0 y 0.5% de urea, sin diferencias entre ellos, y los mayores valores se encontró con la adición de 1.0 y 2.0% de urea, sin diferencias entre ellos, pero los valores de PV obtenidos con la adición de 1.5% de urea fue similar a todos los tratamientos. Por otra parte, a las 24 h de fermentación, los menores valores de PV se obtuvo con la adición de 0 y 0.5% de urea, sin diferencias entre ellos, y los mayores valores de PV se alcanzó con la adición de 1.0, 1.5 y 2.0%, sin diferencias entre ellos, pero el valor de PV logrado con la adición de 1.5% de urea, fue similar al obtenido cuando se le adicionó 0.5% de urea y diferente al obtenido con el 0% de urea (Cuadro 5).

Cuadro 5. Efectos de niveles de urea en el contenido de proteína verdadera del Sacchapulido a las 0 y 24 h de fermentación.

Tratamientos, % de urea	Tiempo de fermentación	
	0 horas	24 horas
0.0	9.3 ^b	9.6 ^c
0.5	9.4 ^b	10.4 ^{bc}
1.0	11.2 ^a	12.3 ^a
1.5	10.2 ^{ab}	11.8 ^{ab}
2.0	11.2 ^a	13.2 ^a
EE±	0.17 ^{**}	0.16 ^{***}

^{abc} Medias con diferentes superíndices en la misma columna difieren a $P < 0.05$ (Tukey, 1953)
^{**} $P < 0.01$, ^{***} $P < 0.001$

5.1.5. Efectos del tiempo de fermentación y niveles de urea en el contenido de nitrógeno no proteínico (NNP) x 6.25

Se encontró interacción significativa ($P < 0.001$) para esta variable. Al comparar los tiempos de fermentación (0 y 24 h), no hubo diferencias con la adición de 0 y 1.0% de urea, sin embargo, cuando se le adicionó 0.5, 1.5 y 2.0% de urea, a las 24 h de fermentación, se encontraron los mayores valores de NNP x 6.25 (Figura 3).

Por otra parte, al comparar los niveles de urea en los diferentes tiempos de fermentación, a las 0 h, se encontró que los mayores valores de NNP x 6.25 se obtuvo cuando se le adicionó 1.5 y 2.0% de urea al Sacchapulido, sin diferencias entre ellos, y los menores valores cuando se le adicionó 0 y 0.5% de urea, sin diferencias entre ellos, pero el valor de NNP x 6.25 obtenido cuando se le adicionó 0.5% de urea, fue similar al encontrado con la adición 1.0% de urea y, este último fue mayor al obtenido con 0% de urea. Por otro lado, a las 24 h de fermentación, cuando no se le adicionó urea, se obtuvo el menor valor de NNP x 6.25 y los mayores valores se encontraron con la adición de 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0% de urea, sin diferencias entre ellos (Cuadro 6).

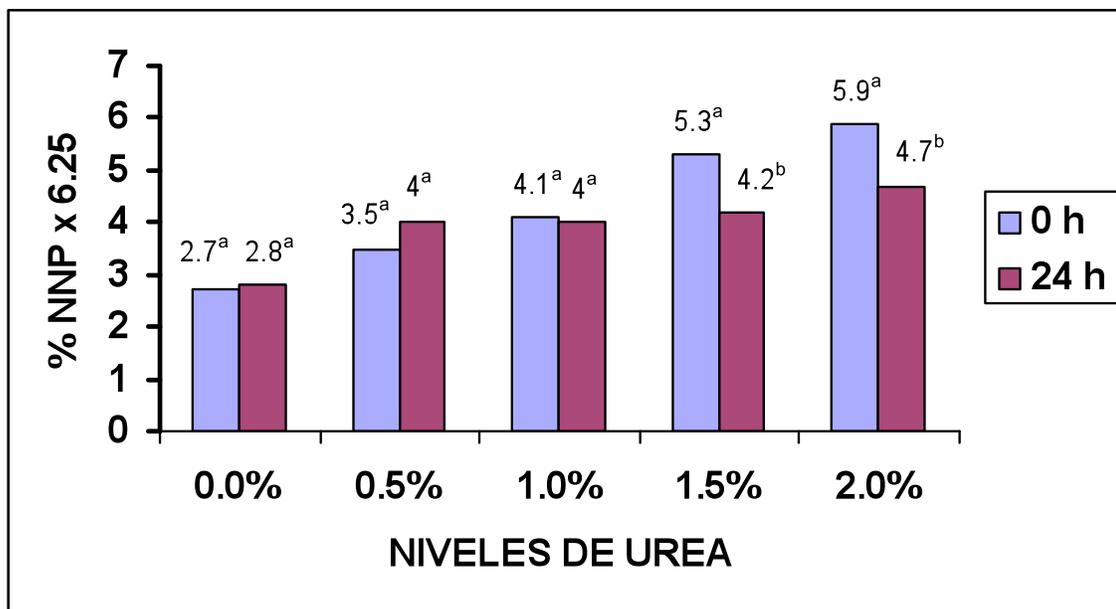


Figura 3. Efectos del tiempo de fermentación en el contenido de NNP x 6.25 en el Sacchapulido.

Cuadro 6. Efectos de niveles de urea en el contenido de (NNP) x 6.25 del Sacchapulido a las 0 y 24 h de fermentación.

Tratamientos	Tiempo de fermentación	
	0 horas	24 horas
0.0 % de urea	2.7 ^c	2.8 ^b
0.5 % de urea	3.48 ^{bc}	4.04 ^a
1.0 % de urea	4.1 ^b	4.0 ^a
1.5 % de urea	5.3 ^a	4.2 ^a
2.0 % de urea	5.9 ^a	4.7 ^a
EE±	0.09***	0.08***

^{abc} Medias con diferentes superíndices en la misma columna difieren a P<0.05 (Tukey, 1953)
 ***P<0.001

5.1.6. Efectos del tiempo de fermentación y niveles de urea en la relación PV/PB*100

Se encontró interacción (P<0.001) en esta variable. Al comparar los tiempos de fermentación (0 y 24 h), no hubo diferencias cuando se adicionó 0 y 0.5% de urea, sin

embargo, cuando se adicionaron concentraciones mayores a 0.5% de urea (1.0, 1.5 y 2.0), la mayor relación PV/PB*100 se encontró a las 24 h de fermentación (Figura 4).

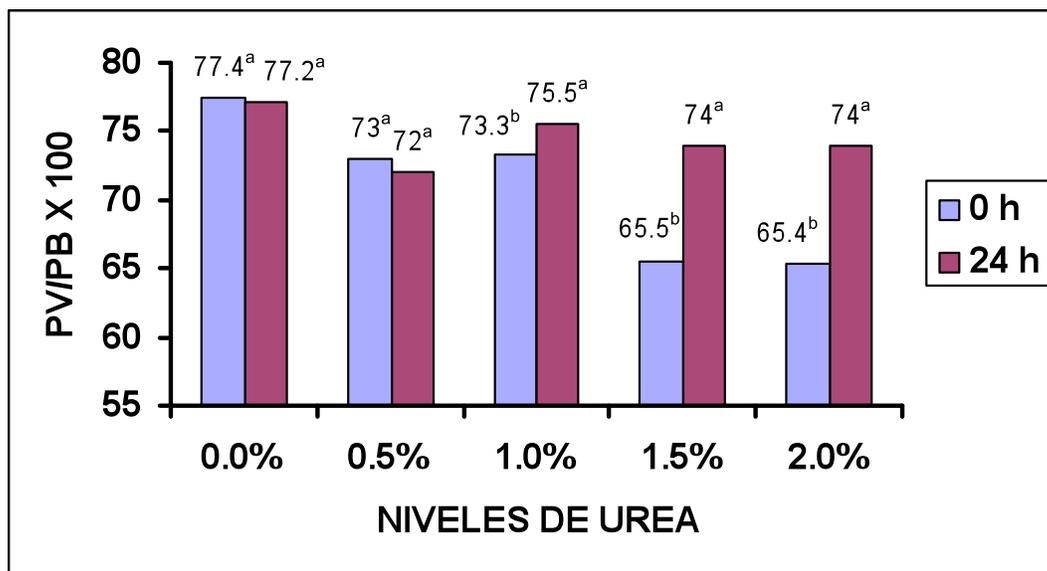


Figura 4. Efectos del tiempo de fermentación en la relación PV/PB*100 del Sacchapulido.

Por otro lado, al comparar los niveles de urea en los diferentes tiempos de fermentación, a las 0 h, la relación PV/PB*100 fue mayor cuando se le adicionó 0, 0.5 y 1.0% de urea al Sacchapulido, sin diferencias entre ellos, y la menor relación se obtuvo con la adición de 1.5 y 2.0% de urea, sin diferencias entre ellos.

Cuadro 7. Efectos de niveles de urea en la relación PV/PB*100 del Sacchapulido a las 0 y 24 h de fermentación.

Tratamientos	Tiempo de fermentación	
	0 horas	24 horas
0.0 % de urea	77.5 ^a	77.1 ^a
0.5 % de urea	73.1 ^a	72.1 ^a
1.0 % de urea	73.3 ^a	75.4 ^a
1.5 % de urea	65.3 ^b	73.9 ^a
2.0 % de urea	65.3 ^b	73.9 ^a
EE±	0.01 ^{***}	0.1 NS

^{abc} Medias con diferentes superíndices en la misma columna difieren a P<0.05 (Tukey, 1953)

^{***}P<0.001, NS: No significativo

A las 24 horas de fermentación, no se encontró diferencias entre tratamientos (Cuadro 7).

5.2. Efectos del tiempo de fermentación y niveles de urea en los parámetros fermentativos del Sacchapulido

5.2.1. Efectos del tiempo de fermentación y niveles de urea en el pH

El pH fue afectado ($P < 0.01$) por el tiempo de fermentación; el menor valor se obtuvo a las 24 h (5.8). También fue afectado ($P < 0.05$) por los niveles de urea, los menores valores se obtuvieron con el 0 y 0.5% de urea, sin diferencias entre ellos, los mayores valores se obtuvieron con el 1.0, 1.5 y 2.0%, sin diferencias entre ellos (Cuadro 9).

Cuadro 8. Efectos del tiempo de fermentación y niveles de urea en el pH.

FACTOR	pH
Tiempo, h	
0	6.6 ^a
24	5.8 ^b
EE ±	0.14**
Niveles de urea, %	
0	5.6 ^b
0.5	5.6 ^b
1.0	6.4 ^a
1.5	6.7 ^a
2.0	6.7 ^a
EE ±	0.16*

^{abc} Medias con diferentes superíndices en la misma columna difieren a $P < 0.05$ (Tukey, 1953)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

5.2.2. Efectos del tiempo de fermentación y niveles de urea en la concentración del amoniaco

Se encontró interacción ($P < 0.001$) en la concentración del amoniaco. Al comparar los tiempos de fermentación (0 y 24 h), en todos los tratamientos, la concentración de amoniaco fue mayor a las 24 h (Figura 5).

Por otro lado, al comparar los niveles de urea en los diferentes tiempos de fermentación, a la 0 h, la inclusión de urea, incrementa los niveles de amoniaco, los mayores valores se encontraron con la adición de 1.5 y 2.0% de urea, sin diferencias entre ellos, pero la concentración de amoniaco que se encontró cuando se adicionó el 1.5% de urea, fue similar al encontrado cuando se le adicionó el 0.5 y 1.0% de urea. A las 24 h de fermentación, se encontró un efecto lineal a la adición de urea hasta el 1.5%, ya que no se encontró diferencias con la inclusión del 1.5 y 2.0% de urea (Cuadro 9).

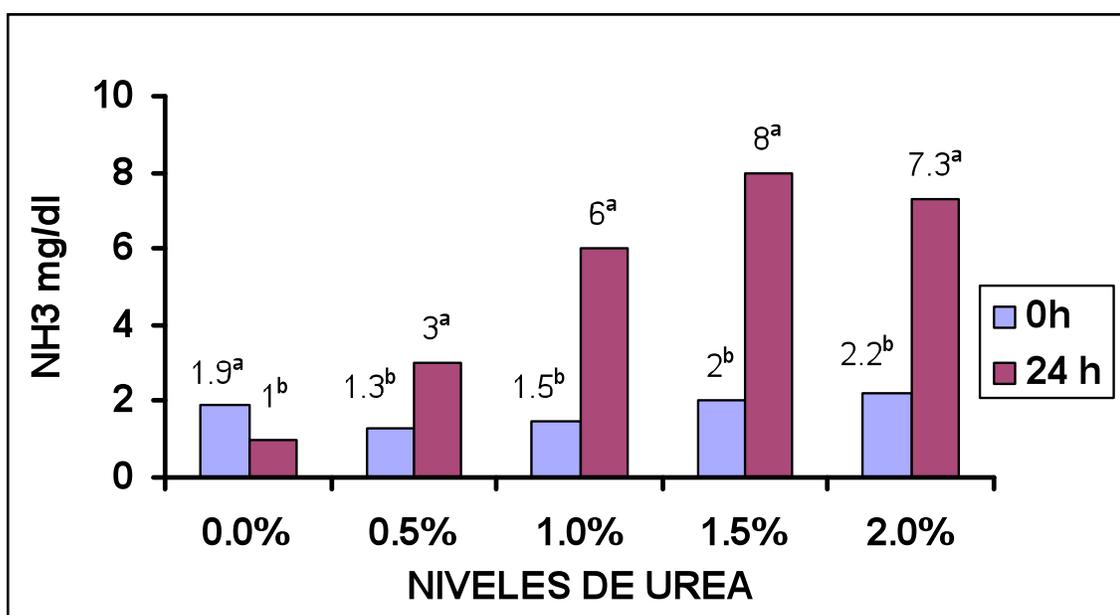


Figura 5. Efectos del tiempo de fermentación en la concentración de amoniaco en el Sacchapulido.

Cuadro 9. Efectos de niveles de urea en la concentración de amoniaco en el Sacchapulido a las 0 y 24 h de fermentación.

Tratamientos	Tiempo de fermentación	
	0 horas	24 horas
0.0 % de urea	72.3 ^c	140.1 ^d
0.5 % de urea	151.8 ^b	374.3 ^c
1.0 % de urea	169.5 ^b	702.5 ^b
1.5 % de urea	198.5 ^{ab}	917.8 ^a
2.0 % de urea	243.7 ^a	932.1 ^a
EE±	6.4***	15.4***

^{abc} Medias con diferentes superíndices en la misma columna difieren a P<0.05 (Tukey, 1953)
 ***P<0.001.

5.2.3. Efectos de niveles de urea en la concentración de ácido láctico a las 24 h de fermentación.

La concentración de ácido láctico fue afectada por los niveles de urea (P<0.001), las menores concentraciones se obtuvieron con el 0 y 0.5% de urea, sin diferencias entre ellos; con la inclusión del 1% de urea se incrementó las concentraciones de ácido láctico, sin llegar a los valores que se encontraron con inclusión de 1.5 y 2.0% que fueron las mayores, sin diferencias entre ellos (Cuadro 10).

Cuadro 10. Efectos de niveles de urea en la concentración de ácido láctico en el Sacchapulido a las 24 h de fermentación.

Indicador, % de la MS	Niveles de urea					EE ±
	0	0.5	1.0	1.5	2.0	
Ácido láctico	0.8 ^c	1.15 ^c	2.5 ^b	4.0 ^a	4.4 ^a	1.01***

^{abc} Medias con diferentes superíndices en la misma fila difieren a P<0.05 (Tukey, 1953)
 ***P<0.001

6. DISCUSIÓN

Los valores de MS encontrado en este trabajo, son similares a los obtenidos en otros experimentos de FES en condiciones similares de realización a la de nuestro estudio y en donde se le han incluido similares porcentajes de diferentes fuentes amiláceas para disgregar el contenido de fibra de la caña de azúcar e incrementar la síntesis de proteína microbiana, cabe mencionar que los porcentajes utilizados y las condiciones fueron parecidos a los de nuestro experimento (Elías *et al.*, 2001; Ramos, 2005; Ramos *et al.*, 2006).

Por otro lado, la disminución de la MS que se observó a las 24 h de fermentación, ha sido también observada por otros investigadores en similares procesos de FES de la caña de azúcar (Elías *et al.*, 1990; Rodríguez *et al.*, 2001 a y b; Ruíz *et al.*, 2003; Ramos, 2005; Ramos *et al.*, 2006). Esta disminución, según Rodríguez *et al.* (2001 a y b), y Ramos (2005), pudiera deberse a la fermentación de cierta cantidad de carbohidratos solubles (sacarosa, glucosa, fructosa), que predominan en la caña de azúcar (Salgado, 2003; Martín, 2004; Perafan, 2007), del almidón de la pulidura de arroz, a la hidrólisis de la urea y, posiblemente en menor escala, a la desaminación de péptidos y aminoácidos de la pasta de soya con producción de amoníaco que pudiera volatilizarse en dependencia del pH final de la fermentación, por los microorganismos presentes en el ecosistema (Valiño *et al.*, 1994 a y b) durante sus procesos metabólicos para síntesis celular, oxidándolos a compuestos volátiles como los ácidos grasos, CO₂ y agua, como productos finales. Así, parte del agua producida durante la oxidación de las moléculas, pudiera evaporarse por el calor metabólico que se genera durante el proceso de la FES (Pandey *et al.*, 2001 y Krishna, 2005).

El hecho de no haber encontrado diferencias a los niveles de urea en el contenido de MS, se debe probablemente a que al inicio de la fermentación, la urea se le adicionó de forma líquida y a los tratamientos con menos urea, se le agregó agua para que todos tuvieran la misma humedad inicial como se mencionó en los materiales y métodos ya que según Anupama y Ravindra (2001); Pandey *et al.* (2001); Mitchell *et al.* (2002) y Krishna (2005), la actividad del agua, se considera como un indicador fundamental para la transferencia de masa, de agua y de solutos a través de la membrana celular en estos procesos de FES.

El incremento de 0.8 unidades percentiles en el contenido de PB a las 24 h de fermentación pudiera estar relacionado con la pérdida de MS, ya que la proteína pudiera concentrarse y por lo tanto en términos relativos se incrementaría, esto ha sido observado también por Rodríguez *et al.* (2001a) al estudiar diferentes niveles de urea (0.5, 1.0 y 1.5) y tiempo de fermentación (0, 48, 72 y 96 h), sin embargo, sus incrementos en PB fueron mayores debido a que los tiempos de fermentación que ellos estudiaron fueron mayores a los de nuestro estudios y sus pérdida de MS también.

Por otro lado, el contenido de PB que se encontró al inicio de la fermentación (0 h), no corresponde a los obtenidos a través del cálculo realizado, en el que se tomó en cuenta los porcentajes de los ingredientes usados y sus contenidos de PB obtenido en el laboratorio (Anexo 1). Se esperaba que esta variable se incrementara linealmente a los niveles de urea, lo cual no sucedió, esto pudo deberse a que en este estudio las muestras se secaron a 62 °C y el nitrógeno amoniacal, pudo volatilizarse, lo cual ha sido reportado también por Rodríguez *et al.* (2001 a). De acuerdo al Anexo 1, la pérdida es más alta a mayor porcentaje de inclusión de urea, por lo tanto, recomendamos que para este tipo de estudios, la PB se obtenga de la muestras en fresco, usando el método del Macro – Kjeldahl, ya que este alimento lo consumen los animales en fresco y para realizar un balance de nitrógeno, es importante conocer con precisión el consumo de materia seca de los alimentos y su contenido de nitrógeno.

El incremento en el contenido de FDA y FDN que se obtuvo a las 24 h de fermentación, ha sido observado también por Rodríguez *et al.* (2001 b), lo anterior pudiera estar relacionado a la pérdida de MS como se explicó anteriormente, lo cual provocaría un efecto de concentración relativa del resto de los indicadores que se expresan en valores porcentuales respecto a la MS, tales como la FDN, FDA y PB, y la disminución en el contenido celular, se pudiera atribuir a la utilización de los azúcares solubles de la caña de azúcar por la microflora que según Valiño *et al.* (1994 a y b), se encuentra establecida en el sistema.

El no haber encontrado efectos significativos a la inclusión de la urea en las fracciones de FDN y FDA, podría indicar que estos no han sido utilizados en los procesos energéticos y respiratorios por la microbiota presente en el ecosistema debido al corto tiempo de fermentación que fue de 24 h. Al respecto, Becerra *et al.* (2008), en un alimento llamado Manzarina, obtenido por FES a base de urea, bagazo de manzana y maíz, no encontró efecto con los niveles de urea adicionados (1.5 y 2%) para estas variables.

Se han realizados numerosos trabajos de FES con residuos lignocelulósicos agroindustriales y han logrado disminuir sus fracciones fibrosas en el producto final, sin embargo, han inoculado con hongos filamentosos específicos con enzimas extracelulares específicas asociadas a la degradación de la lignina y celulosa, además, de dar más tiempo a la fermentación (Rabelo *et al.*, 2002; Iyayi, 2004; Iyayi y Aderolu, 2004).

La disminución que se observó en el pH a las 24 h de fermentación, debe estar relacionados con los incrementos que se tuvo en la concentración de ácido láctico. Al respecto, Rodríguez (2004) al correlacionar estas variables, encontró correlaciones altamente significativas. Por otra parte, la inclusión de los niveles de urea, incrementó linealmente la concentración de amoníaco, lo cual pudiera tener un efecto directo en el pH, sin embargo, la concentración del ácido láctico, producto de la fermentación de los carbohidratos de fácil fermentación presente en la caña (Salgado, 2003; Martín, 2004; Perafan, 2007) y de los AGVs, que aunque no se midieron, pero han sido encontrados en este tipo de fermentaciones (Álvarez, 2004; Cárdenas, 2006; Ramos *et al.*, 2006; Ramos *et al.*, 2007) pudieran ser suficiente para neutralizar el pH, como sucedió en este estudio, ya que a partir de la adición de 1.0% de urea, ya no hubo efecto en esta variable. Por lo tanto, se puede indicar que en los procesos de FES de la caña de azúcar, a medida que se incrementa el nivel de urea, se aumenta la concentración de amoníaco y por ende el pH, pero éste, está influido en menor o mayor grado por la concentración de los ácidos orgánicos (AGVs y láctico).

Según Anupama y Ravindra (2001); Pandey *et al.* (2001); Mitchell *et al.* (2002) y Krishna (2005), el pH es uno de los factores importante a tomar en cuenta en los procesos de FES y es uno de los problemas no resuelto, debido a la heterogeneidad característico del proceso y que cada microorganismo posee un pH óptimo para crecer. Pandey *et al.* (2001) y Rodríguez *et al.* (2001 a), han indicado que la proteína verdadera puede ser una vía indirecta de medir el crecimiento microbiano.

En este estudio, el mayor contenido de PV se obtuvo a las 24 h de fermentación cuando se le adicionó urea, independientemente del nivel incluido, por lo cual, pudiera inferirse que los carbohidratos fácilmente fermentables y el nitrógeno ureico, fueron utilizados en la formación de protoplasma celular. Por otro lado, cuando no se le agregó urea, no hubo diferencias entre las 0 y 24 h de fermentación, lo cual demuestra la importancia de la adición de una fuente de NNP como la urea para síntesis de proteína microbiana como ha sido

indicado por Elías *et al.* (1990). Thomson y Hobson (1971), han indicado que cuando la disponibilidad de amoníaco es limitante para los microorganismos, ellos entrarían a fase de latencia, fermentando los azúcares disponibles con producción de AGVs.

En parte, el incremento de PV a las 24 h de fermentación pudiera estar relacionado con la pérdida de MS como se ha explicado anteriormente, sin embargo, a diferencias de las fracciones fibrosas, hubo un efecto positivo a la adición de urea. Se observó que el nivel más adecuado para síntesis de proteína microbiana, es el 1% de urea, ya que a partir de este nivel, se obtienen los valores más altos de PV en el producto final, lo cual está relacionado también con el pH obtenido. Krishna (2005) menciona la importancia que tiene la relación carbón/nitrógeno y que esta relación puede afectar el pH en el sustrato durante la fermentación. Según Elías y Lezcano (1993), la eficiencia con la cual el NNP de la urea se convierte en NP, varía en relación con los sustratos empleados y al manejo, pero sobre todo a la disponibilidad de energía y las fuentes de carbono (carbohidratos solubles, almidón y grasas), aminoácidos, péptido, vitaminas y minerales y que el nivel de urea óptimo, dependerá del tipo de sustrato a fermentar.

Al respecto, se han realizado diferentes estudios con la finalidad de encontrar los niveles de urea más adecuado para síntesis de proteína microbiana en diferentes sustratos y en todos el nivel de urea varía. Así, Lezcano y Elías (1992) estudiaron niveles de urea (0, 0.5, 1.0 y 1.5%) en la FES de la caña y minerales (Saccharina) y obtuvieron el mayor valor de PV con 1.5% de urea, sin embargo, Carrasco *et al.* (1998) al estudiar niveles de urea (0, 0.5 y 1.0%) y grosor de la capa (15 y 20 cm) en la FES de la caña de azúcar con 30% de excreta vacuna, obtuvieron la mayor eficiencia de síntesis proteica con 0.5% de urea y 15 cm de grosor de capa. Por otro lado, Rodríguez *et al.* (2001) obtuvo el mayor incremento de PV con 1% de urea en la FES de la mezcla de caña, minerales y boniato (*Ipomea batata Lam.*). Becerra *et al.* (2008), estudió dos niveles de urea (1.5 y 2.0) y diferentes niveles de maíz en la FES del bagazo de manzana y obtuvo los mayores valores de PV con la adición del 1.5% de urea.

La relación PV/PB*100 encontrada en este trabajo, es mayor sin la inclusión de urea, y esto se explica porque la relación se obtiene por la división del contenido de PV entre el contenido de PB, por lo cual, al no adicionar urea, la PB es menor y la relación se hace mayor, por lo tanto, estas relaciones se deben de comparar solo cuando se usen iguales niveles de urea. Al respecto, estas relaciones son mayores, a las reportadas por Cárdenas

(2006) en la elaboración de Saccharina a partir del bagacillo de retorno y por Ramos *et al.* (2006) en este mismo tipo de sustrato fermentado.

Teniendo en cuenta que la caña de azúcar se considera como un recurso forrajero con potencial en los trópicos, a pesar de sus limitaciones nutricionales (Aranda *et al.*, 2004), debido su alta producción de biomasa por unidad de superficie (Alexander, 1988; Aranda *et al.*, 2003 y Martín, 2004) y que no se puede usar como dieta básica energética por los rumiantes debido a la alta concentración de azúcares solubles que posee y que según Elías (1983) y Galindo (1988), puede inhibir la celulolisis ruminal e influir negativamente en la digestibilidad de la fibra y el consumo voluntario, así mismo, al reto de diversificar su uso, como respuesta a la caída de precio del azúcar en el mercado internacional, se hace factible fermentar la caña de azúcar, con inclusión de la urea para mejorar su valor nutricional y añadirle disgregadores de la fibra como la pulidura de arroz u otro cereal que se tenga disponible al menor costo.

CONCLUSIONES

1. La adición de 1.0% de urea en el proceso de FES para elaborar el Sacchapulido fue el más adecuado debido a que este nivel no tuvo diferencias con los niveles superiores.
2. La adición de urea incrementó el NP en el proceso de FES en la elaboración del Sacchapulido.
3. Las características nutricionales del Sacchapulido (15.8% de PB, 12.3% de PV, 34.8% de FDN y 17.9% de FDA), lo hace factible para utilizarlo en la alimentación animal.

LITERATURA CITADA

- Álvarez M. 2002.** Fermentación Sólida del banano de rechazo en la obtención de alimentos. Tesis Maestría. Escuela politécnica del Chimborazo, Ecuador. Revista de la universidad francisco de Paula Santander, San José de Cúcuta.
- Álvarez, A. 2004.** Elaboración y conservación de un alimento basado en subproductos de la caña y su respuesta en vaquillas. Tesis de Maestría. UNAM. 107 p.
- Aranda, E., Mendoza, G., Marcoff, C., & Ramos, J.A. 2004.** Changes in the digestion of three varieties of sugar cane and their fiber fractions. Cuban Journal of agricultural Science. 38:2:135.
- Alexander, A.G. 1988.** Sugarcane as a source of biomass. In. Sugarcane as feed. FAO animal production and health paper. Rome. 46 – 60 pp.
- Anupama and Ravindra 2001.** Studies on production of single cell protein by *Aspergillus niger* in solid state fermentation of rice bran. Braz. Arch. Biol. Technol. 44 (1).
- Becerra, B, Rodríguez, M., Jiménez, C., Ruiz B. Arabel, E., Ramírez G. 2008.** Urea y Maíz en la fermentación aeróbica de bagazo de manzana para la producción de proteína microbial. Tecnociencia, Chihuahua, pp. 7-14
- Bermúdez, S. Ramos, S., Donoso, G. Martínez, M. 2002.** Fermentación Sólida de la Cáscara de cacao por *pleurotus sp.* pp.52-57
- Bernstein, J. 1983.** Análisis de alimento. Eds. Wintra, A.L. y Winto, K.B. Tomo I. Ed. Pueblo y Educación. 84 p.
- Calderón, A; Elías A., Valdiviè, N. 2005.** Dinámica de la fermentación en estado sólido de la camas de cascarilla de café en inicio de ponedoras inoculadas con vitafert Centro Universitario de Guantánamo (CUG). Instituto de Ciencia Animal. San José de la Lajas La Habana. Cuba. pp- Revista Electronica de Veterinaria. Vol. VI No.5
- Carrasco, E., Boucourt, R., Elías, A. & Febles, I. 1998a.** Indicadores bromatológicos de la caña de azúcar fermentada con excreta vacuna y diferentes niveles de urea y grosor de la capa fermentativa. Rev. Cubana Cienc. Agríc. 32:275.
- Cassman, K. 2007.** Biocombustibles, seguridad alimentaria e intensificación ecológica de los sistemas agrícolas. 1-10
- Casas, 1991.** Potencial de la investigación biotecnológica agrícola en México. Revista Mexicana de Sociología UNAM vol 50 no.1 pp 121-146.

- Chávez, M. 1999.** Nutrición y fertilización de la caña de azúcar en costa rica Conferencia 78XI Congreso Nacional Agronómico / III Congreso Nacional de Suelos).pp.193-199.
- Chávez, G. 2004.** La Agroindustria Azucarera de México: El Impacto del Tratado de Libre Comercio de América del Norte”. Documento de trabajo, marzo 2004. Texcoco, Universidad Autónoma Chapingo.pp 49.
- Chávez, 2007.** La Agroindustria Azucarera de México: El Impacto del Tratado de Libre Comercio de América del Norte”. Documento de trabajo, diciembre de 2007. Texcoco, Universidad Autónoma, Chapingo, México.
- Elías, A. 1983.** Digestión de pastos y forrajes tropicales. En: Los pastos en cuba, tomo 2, Utilización, Capítulo IV. Ed. EDICA. La Habana, Cuba. 187 – 246 pp.
- Elías, A. y Lezcano, O. 1993.** Efecto de la fuente de N y algunos factores de crecimiento en la población de levaduras que se establecen en la producción de Saccharina. Rev. Cubana Cienc. Agríc. 28:319.
- Elías A., Lezcano O., Lezcano P., Cordero J. y Quintana L. 1990.** Una reseña descriptiva sobre el desarrollo de una tecnología de enriquecimiento proteico de la caña de azúcar a través de fermentación en estado sólido. Saccharina. Rev. Cubana Cienc. Agríc. 24:1
- Elías, A; Herrera, R 2008.** Producción de alimento para animales a través de procesos biotecnológicos sencillos, con el empleo de microorganismos beneficiosos activados (MEBA). Vitafert. Primera versión. (Aun en imprenta).
- FAO. 2003.** Estudio FAO investigación y tecnología 8. Biotecnología agrícola para países en desarrollo. Resultado de un foro electrónico. Roma. <http://www.fao.org/documents/show_cdr.asp?url_file=/DOCREP/004/Y2729S/y2729s00.htm> /Consultado 5/AGOSTO/ 07.
- FAO 2008.** El hambre aumenta Sala de prensa 18 de septiembre 2008 <http://www.fao.org/newsroom/es/news/2008/1000923/index.html>
- FAO, 1998.** La fermentación en pequeña escala. En: Agricultura21. <<http://www.fao.org/ag/esp/revista/9812sp3.htm>> /Consultado: 7 de octubre /2007.
- Faria, M 2006.** Manejo de pastos y forrajes en la ganadería de doble propósito, postgrado de producción animal, Facultad de agronomía, Universidad de Zulia, Maracaibo.pp-9.
- Fernández, A. 2007.** aplicaciones de los microorganismos cátedra de microbiología departamento de Biociencias.
- Gálvez, J. 1998.** Diversificación de la caña de azúcar para el siglo XXI. Revista Bimestre Cubana de la sociedad económica de amigos del país. 84(9): 1

- Galindo, B. J. L. 1988.** Efecto de la zeolita en la población de bacterias celulolíticas y su actividad en vacas que consumen ensilajes. Tesis de doctor en ciencias veterinarias. Instituto de Ciencia Animal. La Habana, Cuba. p.135
- García, 2004** La agroindustria azucarera en México: El impacto del tratado de libre comercio en América del Norte. Chapingo. México.
- Gutiérrez, C; Villena, 2004.** K; Fermentación por adhesión a superficies. Una nueva categoría fermentativa. Facultad de ciencias biológicas. Revista Perú de biología. pp 113-124
- Hesseltine C.W. 1972** Solid State Fermentations. *Biotechnol. and Bioeng.* 14: 517 – 532.
- Hernández, E 2005** Crecimiento de la demanda mundial de carne. Política y Negociaciones Comerciales. Comunica Edición No. 4 II Etapa.
- Iañez, P. 2001** Introducción a la Biotecnología. Curso Doctorado”Biotecnología, ética y sociedad” Instituto de Biotecnología, Universidad de Granada , España.
- Iyayi, E.A. & Aderolu, Z.A. 2004.** Enhancement of the feeding value of some agro-industrial by-products for laying hens alter their solid state fermentation with *Trichoderma viride*. African Journal of Biotechnology. 3(3): 182-185.
- Julián R., Ramos S 2007** Fermentación en estado sólido para la producción de alimento animal tecnología química Vol. XXVII, No. 3, 2007.
- Krishna, C. 2005** *Critical Solid-State Fermentation Systems-An Overview Reviews in Biotechnology*; ProQuest Agriculture Journals pp 30
- Li L. K. A.2002** Memoria Descriptiva Para Examen De Suficiencia Profesional la ingeniería de los alimentos y el proceso de refinación de azúcar.
- Lagunas, B; García, Castaño T; Regalado G; Ávila G; 2006** Producción de enzimas hemicelulíticas por FES y su aplicación en alimento balanceado de pollos de engorda. Ignacio Lagunas Bernabé. Veterinaria de México. pp.13.
- Leng, R.A 1989** Restricciones metabólicas para la utilización de la caña de azúcar y sus subproductos para el crecimiento y la producción de leches en rumiantes mayores.
- Lezcano, O Elías A. 1992** Efecto de la temperatura y la urea en la fermentación de la caña de azúcar para producir saccharina. Rev. Cubana Ciencia Agric, 26; 291.
- López, M. García, G. Quintero, R, 2003.** Biotecnología alimentaria, LIMUSA, Noriega Editores,

- McCullough, H. 1967.** The determination of ammonia in whole blood by a direct colorimetric method. Clin. Chem. Acta 17:297-304.
- Mandigan M, T 2004** Biología de los microorganismos. Multiprensa. Madrid España 56 p
- Martín, M.P.C. 2004.** La alimentación del ganado con caña de azúcar y sus subproductos. Ed. EDICA. La Habana, Cuba. 193 p.
- Madrid ,J., Martínez.Teruel, AM., Hernández, F., and Megias, M.,D. 1999.** a Comparative study on the determination of lactic acid in silage juice by colorimetric, high performance liquid chromatography and enzymatic methods. Journal of the Science of food and agriculture. 79; 1722-1726 (1999).
- Mena, A. 1988.** Utilización del jugo de la caña de azúcar para la alimentación animal: sinopsis. En: La caña de azúcar como pienso. Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación (FAO). 153 – 163 pp.
- Metges. C.C and Loh G. 2003.** Intestinal microbial amino acid synthesis and its importance for the amino acid homeostasis of the monogastric host. In: Progress in research on energy and protein metabolism. EAAP. Publication No. 109. Rostoch – Warnemünde, Germany. p. 579 – 592.
- Mitchell, D.A., Berovic, M; Krieger, N. 2002.** Overview of solid state bioprocessing. Biotechnology annual Review. Elsevier Science. Animal Feed Science and technology. 8:183-200.
- Palma López D. J., Cisneros J. D., Moreno-Cáliz E., Rincón R.J. 2007.** Suelos de Tabasco su uso y manejo sustentable, Colegio de Postgraduados- ISPROTAB-Fundación Produce, Tabasco. A.C Villahermosa Tabasco. 195 p.
- Pandey, A., Soccol C.R., Rodríguez-León, J.A. and Nigam, P. 2001.** Solid-state fermentation in biotechnology. Fundamentals and applications. Asiatech Publishers, Inc. New Delhi. 221 p.
- Preafán, F 2007.** La Caña de azúcar (www.perafan.com (<http://www.perafan.com/>)). Cali Colombia 27 abril 2008.pp 6
- Pedraza, O 2000.** Bagazo rico en proteína (Bagarip), Alimento obtenido por fermentación en estado sólido. Centro de Estudios Para el desarrollo de Producción Animal (CEDEPA), Universidad de Camaguey.
- Peláez, 2008.** Ventajas de la Fermentación en Estado Sólido con pleurotus sapidus en ensilajes de caña de azúcar. Archivos zootecnia 2008.
- Ramírez, 2003.** Fermentaciones aplicadas a la industria de alimentos. Universidad del Valle Contribución a la II Muestra Agroindustrial, Universidad del Cauca, Facultad ciencias agropecuarias, Popayán.pp 49.

- Ramos, J.A 2005.** Obtención de un concentrado energético proteínico por fermentación en Estado Sólido de la caña de azúcar para bovinos en ceba. Tesis de Doctorado. Habana Cuba. pp 139.
- Ramos, J.A A. Elías y F. Herrera 2006.** Procesos para la producción de un alimento energético - proteico para animales. Efecto de cuatro fuentes energéticas en la fermentación en estado sólido (FES) de la caña de azúcar. Rev. Cubana Ciencia Agrícola 40:1.
- Ramos, J., Elías, A. Herrera, F. Aranda, E y Mendoza G. 2007.** Processes for the production of an energetic- proteinic animal feed. Effect of final molasses levels on the solid state fermentation of saccha- sorghum and saccha – polishing. Cuban Journal Science. 41:2.
- Robinson, T., Singh, D. & Nigam, P. 2001.** Solid state fermentation: a technology successfully for the production of secondary metabolites. Appl. Microbiol Biotechnol. 55: 284-289.
- Rodríguez G. F. 1970.** Urea y Gallinaza. Los concentrados energético y proteínico. Ed. EDICA. México D. F. p. 157-159.
- Rodríguez, A. Z. 2004.** Uso del boniato (*Ipomea batata Lam.*) en la tecnología de fermentación en estado sólido de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*). Tesis de Doctor en Ciencias. Instituto de Ciencia Animal, Habana, Cuba. pp 104.
- Rodríguez, Z., Boucourt, R., Elías, A. & Nuñez, O. 2001a.** Efecto de los niveles de nitrógeno ureico en la síntesis proteica durante la fermentación de mezcla de caña (*Saccharum officinarum*) y boniato (*Ipomea batata Lam.*). Rev. Cubana Cienc. Agric. 35:29.
- Rodríguez B. Y.2005** Obtención de un alimento energético proteico a través de la FES de la caña de azúcar y el tubérculo de yuca Tesis en Opción al Grado Científico de Master en Ciencias Veterinarias Especialidad: Producción con Rumiantes.Universidad Agraria de la Habana Instituto de Ciencia Animal cuba 56 p
- Rojo R; Mendoza M; García B; Bárcena G y. Aranda I. 2000.** Consumo y digestibilidad de pastos tropicales en toretes con suplementación nitrogenada y *Saccharomyces cerevisiae* Rev. Fac. Agron. (LUZ). 17: 358-370.
- Ruiz, M.E. 1994.** Subproductos y residuos en la alimentación de bovinos. En. Memoria del IV curso "Producción e investigación en pastos tropicales". Facultad de Agronomía, Universidad de Zúlia, La Sociedad Venezolana de Pastizales y Forrajes. Capítulo Zuliano y el Banco de Maracaibo. Maracaibo, Venezuela. p. 69-87.

- Ruiz, T.E. Febles, G. & Alonso, J. 2003.** Potencial para la producción de biomasa en sistemas con leguminosas perenne. En: II foro Latinoamericano de pastos y forrajes. La Habana, Cuba.
- Ruiz L, Rodríguez, J; Rodríguez H; Contreras, E 2007.** Diseño de birreactores para la fermentación en medio sólido. Revista Mexicana de ingeniería química. Volumen 6Número 001 pp33-40.
- Rosscup, R; Marshall, A; 1989.** Biotecnología agrícola: implicaciones y perspectivas. Agricultura y sociedad no. 53. Centro De Evaluación Tecnológica y Político Agrario de Purdue (Indina). Pp.139-144
- Ravelo, R.,** Bermúdez, S., Valiño, C., Pérez, P 2002 fermentación del bagazo de azúcar en un biorreactor a escala laboratorio. Tecnología Química pp 32-40.
- Said A; Barrios O; Acevedo E, 2005.** Los microorganismos y su impacto en procesos biotecnológicos Revista Chilena de educación científica
- Salgado-García S., Palma-López, D. J., Zavala-Cruz, j., Lagunes-Espinoza, L. C., Ortiz-García, C. F., Castelán-Estrada M., Guerrero-Peña, A., Moreno-Cáliz E., Rincón-Ramírez, J. A. 2008.** Sistema integrado para recomendar dosis de fertilizantes (SIRDF). En caña de azúcar: Ingenio Aszuremex. Colegio de Posgraduados Campus Tabasco. H. Cárdenas, Tabasco, México. 102 p.
- Salgado,G.s,Bucio. , A L., Riestra. D.D., y Lagunas E., I.C 2003** Caña de azucar hacia un manejo sustentable, ISBN- 968 -839-3312 Campus, Tabasco.
- Sancho, R. 2004.** VI de indicadores de ciencia y tecnología Iberoamericana/Interamericano. Buenos Aire, Argentina.
- Suárez R. y Morin R. 2005.** Caña de azúcar y sostenibilidad: enfoques y experiencias Cubanas. pp. 143
- Subiros, R.1995.** El Cultivo De La Caña De Azúcar Editorial San José Costa Rica 1995.Primer Edición universidad Estatal A Distancia (Eued) P441 Consultadas 3 y 355
- Stuart, M. 2002** .La experiencia cubana en la utilización de la proteína vegetal unicelular y en el mejoramiento proteico de los residuos agroindustriales. Seminario Taller Internacional; manejo de la Proteína en la Producción de Ganado pp.1-11
- SIAP 2007.** Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), en el <http://w4.siap.gob.mx/sispro/Integra/Caracteristicas/CanaAzu.html> Caña de azúcar.
- SIAP. 2008.** Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) Sistema integral de información agroalimentaria y pesquera.

- Resumen nacional de la producción pecuaria.**
 <http://www.siap.sagarpa.gob.mx/ar_compec_pobgan.html> /Consultado: 8 agosto del 2007.
- Tronconi, G. 2003.** Fermentaciones aplicadas a la industria de alimentos Universidad del Valle Contribución a la II Muestra Agroindustrial, Universidad del Cauca, Facultad ciencias agropecuarias, Popayán.(www.revistaindustriyalimentos.com/r20/tecnologia.htm - 21k) pp.4
- Tukey, J. W. 1953.** The problem of multiple comparison. Ditto, Princeton University, Princeton, NJ
- Valiño, E., Elías, A., Álvarez, E. Quintana, M. & Montes de Oca, N. 1994a** Composición de especies de bacterias aisladas del proceso de obtención de la Saccharina. 1. Bacterias gram negativas. Rev. Cubana Cienc. Agríc. 28:69.
- Valiño, E., Elías, A., Álvarez, E. Quintana, M. y Montes de Oca, N. 1994b.** Composición de especies de bacterias aisladas del proceso de obtención de la Saccharina. II. Bacterias gram positivas. Rev. Cubana Cienc. Agríc. 28:75.
- Van Soest, P.J Robertson, JP y Lewis, B.A- 1991.** Symposium; Carbohydrate methodology, metabolism, and nutritional implications in dairy cattle. J Dairy Sci 74: 3583- 3597.
- Viniegra-González G. 1997.** Solid State Fermentation: Definition, Characteristics, limitations and monitoring. *Eds. Advances in Solid State Fermentation*, Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, Chapter 2: pp. 5-22
- Vivas N, j., Carvajal J. 2004,** Sacharina rústica una aplicaciòn biotecnològica para la alimentaciòn animal. Universidad de Cauca. pp3

Anexo.

Anexo 1. Contenido de proteína bruta (PB) calculada y la obtenida en el laboratorio al inicio del procesos de fermentación.

INDICADOR	NIVELES DE UREA %				
	0 2.0	0.5	1.0	1.5	2.0
PB calculada, %	12.6	15.8	19.0	22.2	25.3
PB obtenida a la 0 h, %	12.1	13.0	15.2	15.5	17.1