



COLEGIO DE POSTGRADUADOS
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS TABASCO

PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TROPICO

**Efecto de los niveles de Vitafert y melaza en la
Pollinaza fermentada aeróbica.**

FLOR DE TILA ARIAS LÓPEZ

T E S I S

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

MAESTRA EN CIENCIAS

H. CÁRDENAS, TABASCO

2010

La presente tesis, titulada: **Efecto de los niveles de Vitafert y melaza en la Pollinaza fermentada aeróbica** realizada por el alumno: Flor de Tila Arias López, 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 PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TROPICO

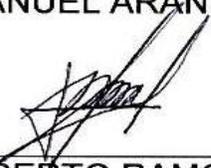
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



DR. EMILIO MANUEL ARANDA IBAÑEZ

ASESOR



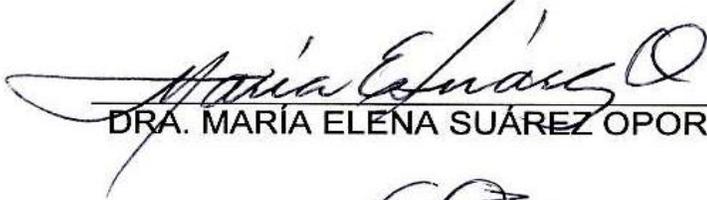
DR. JESUS ALBERTO RAMOS JUAREZ

ASESOR



DR. ARABEL ELÍAS IGLESIAS

ASESOR



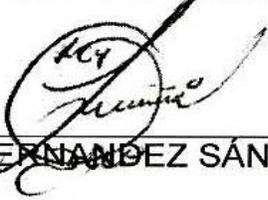
DRA. MARÍA ELENA SUÁREZ OPORTA

ASESOR



DRA. CONSUELO DEL C. BAUTISTA MUÑOZ

ASESOR



DR. DAVID HERNÁNDEZ SÁNCHEZ

H. Cárdenas, Tabasco, Diciembre 2010

EFFECTO DE LOS NIVELES DE VITAFERT Y MELAZA EN LA POLLINAZA FERMENTADA AERÒBICA

RESUMEN

La pollinaza es la excreta de las aves de engorda y se ha utilizado en la suplementación de los bovinos debido al elevado contenido de nitrógeno no proteínico (NNP) y por su bajo costo. Con el objetivo de mejorar los parámetros bromatológicos y fermentativos de la pollinaza. Se estudió en diseño completamente al azar con arreglo factorial 3 x 3 con 3 repeticiones por tratamientos, con variable de respuesta incremento en Y, el efecto de los niveles de Vitafert (0, 30 y 60%) y melaza (10, 20, y 30%) Se mezcló la pollinaza con los porcentajes de Vitafert y melaza de forma homogénea, se utilizó 1kg de muestra como unidad experimental agregando agua a los tratamientos para mantener una proporción del 60 % de humedad, una vez mezclados los ingredientes homogéneamente con cantidades del 100 %, se procedió a extenderlo en charolas con un espesor de 3 cm, para permitir una aireación durante la fermentación de los tiempos 0 y 24 horas, se tomó 100g de alícuotas para determinar los parámetros bromatológicos, fermentativos y microbiológico del tiempo 0. Se encontró interacción ($P < 0.001$) en el contenido de proteína verdadera (PV) en el proceso de fermentación en estado sólido (FES), en los tratamientos con 30% de Vitafert y 30% de melaza. Con respecto al contenido de PC se encontró interacción ($P < 0.001$), en los tratamientos 30 y 60% de Vitafert y 30% de melaza, sin diferencias entre ellos. En todos los tratamientos estudiados, el pH disminuyó a las 24 h del proceso de fermentación en estado sólido. En relación a las bacterias ácido láctica Se concluye que la fermentación en estado sólido a las 24 h, incrementa la proteína cruda de la pollinaza así como también la proteína verdadera. En los parámetros microbiológicos al menos, a las 24 h, de acuerdo los resultados, disminuyeron los contenidos de Ooquistes e incrementa las bacterias ácido láctica

Palabras claves: Pollinaza, Vitafert, melaza, proteína cruda, proteína verdadera, pH, bacteria ácido láctica y Ooquiste.

EFFECT OF VITAFERT AND MOLASSES LEVELS IN AEROBIC FERMENTED POULTRY MANURE

ABSTRACT

Poultry manure is the feces of finishing poultry and it has been used to supplement the cattle because of the high content of no-protein nitrogen and its affordable prices. We aimed to improve the bromatologic and fermentative parameters of the poultry manure in order to do this, we studied a random design with a factorial arrangement 3 X 3 with three repetitions per each treatment with response variable increased in Y the effect of Vitafert levels (0, 30 and 60%). The poultry manure was mixed with the percentages of molasses and Vitafert in a homogeneous way. One Kg of sample was used as an experimental unit adding water to the treatments to keep a 60% proportion of humidity. Once the ingredients were mixed in a homogeneous way with amounts of 100%, they were put on 3 cm-thickness trades to permit ventilation during fermentation between 0 and 24 hours. 100 g aliquots were taken to determine the bromatologic, fermentative and microbiological parameters of the 0 hour. Interaction in the content of true protein ($p < 0.001$) during fermentation of solid state in the treatments with 30% of Vitafert and 30% of molasses was found. About the content of CP, an interaction was found ($p < 0.001$) in the treatments 30 and 60% of Vitafert and 30% of molasses, with no differences between them. In all studied treatments, the Hp decreased at the 24 hours of the process of fermentation of solid state. On lactic acid bacteria it is concluded that fermentation in solid state at the 24 hours increases the raw protein of poultry manure and the true protein as well. In the microbiological parameters at least at the 24 hours and according to the results; the Oquiste content decreases and the lactic acid bacteria increases.

Keywords: Manure, Vitafert, Molasses, Protein raw, true protein, pH, lactic acid bacteria y Oocyst.

DEDICATORIA

A **Dios** todopoderoso, porque sin el esta tesis no lo hubiera realizado. “Jehová, Dios de Israel, no hay Dios semejante a ti, ni en el cielo, ni en la tierra. Tú eres fiel a tu alianza y tienes compasión con tus siervos cuando te sirven con sinceridad”. (1 Reyes 8:23).

A mi **Padre; Antonio Arias Zetina** por brindarme su amor, la confianza, paciencia, su apoyo moral y económico, especialmente a mi **Madre; Carmita López García** que con sus consejos sabios, y el gran Amor infinito que nos tiene logro hacernos una persona de provecho y se que donde nos este viendo estará orgullosa de su Familia que la Quiere mucho.

A mis **Hermanos, Antonio Guadalupe Arias López y Elizabeth Arias López** que con sus palabras de aliento y cariño me dieron fuerzas para concluir la Tesis.

A todos los **Profesores, Amigos y a Gerardo Arango Rodríguez** por estar con migo en las buenas y en los malos momento de mi maestria, dando el apoyo suficiente para la realización de la misma.

AGRADECIMIENTOS

Al **Colegio de Posgraduado en Ciencias Agrícola**, en especial al área de ciencia animal y microbiología, por el apoyo en reactivo y equipo utilizado para la realización de la presente investigación.

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 mi **consejero** Dr. Emilio Manuel Aranda Ibáñez, por habernos permitido formar parte de sus conocimientos e inducido en el saber científico; le agradecemos su amistad y confianza.

A mis **Asesores**: Dr. Jesús Alberto Ramos Juárez, Dr. Arabel Elías Iglesia, Dra. Consuelo del C. Bautista Muñoz, Dr. David Hernández Sánchez y Dra. María Elena Suárez Oporta por compartir sus conocimientos a la presente tesis.

A mi **Familia, Amigos y Compañeros** de clases que depositaron la confianza en mí durante la trayectoria de la carrera.

Que **Dios**, nos Bendiga a cada uno de nosotros sus hijos, “Gracias”.

CONTENIDO

RESUMEN.....	iii
ABSTRACT.....	iv
DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTO.....	vi
INDICE DE CUADROS.....	x
INDICE DE FIGURA.....	xi
ABREVIATURAS USADAS.....	xii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
Objetivo.....	2
Hipótesis.....	2
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1. Características de la producción bovina en el trópico.....	3
2.2. Contaminación ambiental.....	4
2.3. Pollinaza.....	6
2.3.1. La pollinaza y el medio ambiente.....	7
2.3.2. Microorganismo patógeno de la pollinaza.....	9
2.3.3. Normas del uso de la pollinaza.....	9
2.4.4. Uso de la pollinaza como alimento proteínico.....	10
2.3.5. El nitrógeno no proteínico (NNP) y la pollinaza.....	11
2.4. Melaza	11
2.4.1. Inclusión de la miel final en la fermentación de la pollinaza.....	13
2.5. Fermentación.....	14
2.5.1. Fermentación en estado sólido.....	14
2.5.2. Factores que influyen en la fermentación en estado sólido.....	15
2.5.2.1. Fuente de carbón y la relación carbón/nitrógeno.....	15
2.5.2.2. Temperatura.....	15
2.5.2.3. Humedad y actividad del agua.....	16
2.5.2.4. pH.....	16

2.5.2.5 Aeración y agitación.....	16
2.5.2.6. Tamaño de partículas.....	16
2.5.3. Ventajas de los alimentos fermentados en estado sólido.....	17
2.6. Vitafert.....	17
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
3.1. Localización geográfica del área de estudio.....	18
3.2. Tratamientos estudiados	19
3.3. Procedimiento experimental.....	20
3.3.1. Preparación del Vitafert.....	21
3.4. Determinación de parámetros fermentativos.....	24
3.4.1. pH	22
3.4.2. Amoniaco.....	22
3.4.3. Ácido láctico.....	22
3.5. Determinación de parámetros bromatológicos.....	23
3.5.1. Materia Seca (MS).....	23
3.5.2. Cenizas.....	23
3.5.3. Materia orgánica.....	23
3.5.4. Proteína cruda (PC).....	23
3.5.5. Nitrógeno no proteínico (NNP x 6.25) y proteína verdadera (PV).....	24
3.5.6. Fibra detergente neutro (FDN).....	24
3.5.7. Fibra detergente ácido (FDA).....	24
3.5.8. Hemicelulosa y contenido celular	24
3.6. Determinación de parámetros microbiológicos.....	24
3.6.1. Cuenta viable por dilución seriada.....	24
3.6.2. Método rápido de Mc Master.....	25
IV. RESULTADOS	26
4.1 parámetros bromatológicos.....	26
4.2 Parámetros Fermentativos.....	32
4.3 Parámetros Microbiológico.....	35
V. DISCUSIÓN	38
VI. CONCLUSIONES.....	42

VII. RECOMENDACIÓN.....	42
VIII. REFERENCIA.....	43
IX. ANEXOS.....	53

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Composición química y fraccionamiento de la pared celular de la pollinaza, según el tipo de cama (% base seca).....	7
Cuadro 2. Composición de la melaza en diferentes regiones.....	12
Cuadro 3. Tratamientos estudiados.....	19
Cuadro 4. Porcentaje de pollinaza, Vitafert y melaza en los tratamientos estudiados (base húmedo).....	21
Cuadro 5. Porcentaje de pollinaza, Vitafert, y Melaza en los tratamientos estudiados (base seco).....	21
Cuadro 6. Ingredientes del Vitafert (%).....	22
Cuadro 7. Efecto de niveles de Vitafert y melaza en el contenido de Materia Seca de la pollinaza fermentada en estado sólido	27
Cuadro 8. Efecto de niveles de Vitafert y melaza en el contenido de Cenizas de la pollinaza fermentada en estado sólido.....	27
Cuadro 9. Efecto de niveles de Vitafert y melaza en el contenido de Materia Orgánica de la pollinaza fermentada en estado sólido.....	28
Cuadro 10. Efecto de niveles de Vitafert y melaza en el contenido Celular de la pollinaza fermentada en estado sólido	28
Cuadro 11. Efecto de niveles de Vitafert y melaza en el contenido de Fibra Detergente Neutra de la pollinaza fermentada en estado sólido.....	30
Cuadro 12. Efecto de niveles de Vitafert y melaza en el contenido de Hemicelulosa de la pollinaza fermentada en estado sólido.....	30
Cuadro 13. Efecto de niveles de Vitafert y melaza en el contenido de Fibra Detergente Ácida de la pollinaza fermentada en estado sólido.....	31
Cuadro 14. Efecto de niveles de Vitafert y melaza en el contenido de Proteína Cruda de la pollinaza fermentada en estado sólido.....	31

Cuadro 15. Efecto de niveles de Vitafert y melaza en el contenido de Nitrógeno No Proteínico * 6.25 de la pollinaza fermentada en estado sólido.....	32
Cuadro 16. Efecto de niveles de Vitafert y melaza en el contenido de Proteína Verdadera de la pollinaza fermentada en estado sólido.....	33
Cuadro 17. Efecto de niveles de Vitafert y melaza en el contenido de Amoniaco de la pollinaza fermentada en estado sólido.....	33
Cuadro 18. Efecto de niveles de Vitafert y melaza en el contenido de Acido Láctico de la pollinaza fermentada en estado sólido.....	34
Cuadro 19. Efecto de niveles de Vitafert y melaza en el indicador de pH de la pollinaza fermentada en estado sólido.....	35
Cuadro 20. Efecto de niveles de Vitafert y Melaza en el crecimiento de bacterias lácticas (ufc/g) en la pollinaza fermentada aeróbica.....	36
Cuadro 21. Efecto de niveles de Vitafert y melaza en el conteo de UFC en las bacterias aeróbicas en la pollinaza fermentada en estado sólido.....	36
Cuadro 22. Efecto del Vitafert y Melaza en Conteo de Ooquiste en heces (g de MS) a las 0 y 24 hora de fermentación en estado sólido.....	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Macro y micro localización del área de estudio.....	18
---	----

ABREVIATURAS USADAS

A.C.	Antes de Cristo	h	Hora
ACE	Agar Cuenta Estándar	hpg	heces por gramos
AGVs	Ácidos Grasos Volátiles	Km	Kilómetro
BS	Base Seco	MO	Materia Orgánica
CO ₂	Dióxido de carbono	MRS	Agar Man, Rogosa y Sharpe
CC	Contenido celular	MS	Materia seca
cm	centímetro	ml	Mililitros
DMO	Digestibilidad de la Materia Orgánica	nm	Nanómetro
FAD	Fibra Acido Detergente	N	Normalidad
FDN	Fibra Neutro Detergente	NNP	Nitrógeno no Proteínico
FAO	Organización de la Naciones Unidas para la Agricultura y la alimentación.	PC	Proteína Cruda
FES	Fermentación en Estado Solido	PV	Proteína Verdadera
FLS	Fermentación Liquida Sumergida	pH	Potencial de Hidrógeno
FB	Fibra Bruta	UFC	Unidades Formadora de Colonia
GDP	Ganancia Diaria de Peso	ha	hectárea
g	Gramos	L-GDH	L-Glutamato Deshidrogenasa

I. INTRODUCCIÓN

En las áreas tropicales, los pastos y los forrajes son la base de la alimentación bovina (Del Pozo *et al.*, 2002). Éstos presentan variaciones temporales en disponibilidad de materia seca y calidad nutricional, lo cual influye en la producción de carne y leche. Para evitar variaciones en la producción animal, se han implementado estrategias de suplementación asociado principalmente con la utilización de granos. Sin embargo, el uso de concentrados comerciales no siempre está al alcance de los pequeños productores debido a su alto costo en el mercado, por lo cual es necesario buscar alternativas productivas y económicamente factibles.

La pollinaza es la excreta de las aves (pollos) de engorda y se ha utilizado mezclada con melaza ,en la suplementación para bovinos (por) debido a su elevado contenido de nitrógeno no proteínico (NNP), bajo costo y efecto positivo en el proceso digestivo en el rumen (Calderón y Elías, 2005). Sin embargo, los resultados en la alimentación animal han sido contradictorios.

Según Castellanos *et al.* (2002), el uso de la pollinaza en la alimentación animal constituye un riesgo potencial para la salud humana por la presencia de residuos de sustancias químicas, biológicas o medicamentos veterinarios, además, contiene una alta carga microbiana (*Echerichia. Coli* y *Coccideas*) que procede del tracto gastrointestinal de las aves (Castellano y Murguía, 2002) y pueden parasitar al animal que la consume, haciendo necesario el uso de antibióticos de amplio espectro (Rejo *et al.*, 1997) lo cual, encarece los costos de producción.

También puede convertirse en sustrato para el crecimiento, proliferación o diseminación de plagas, sobre todo de moscas y enfermedades de importancia sanitaria humana y animal.

Por lo anterior, el Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) junto con el Ministerio de Salud (MS) de la República de Cuba en el 2003, realizaron un plan de manejo que abarca el almacenamiento, tratamiento, transporte y mercadeo de la pollinaza, decretando que la pollinaza fuera tratada con procesos físicos, químicos o biológicos o bien una combinación de ellos, para que sea utilizada como fuente de NNP para rumiantes, fertilizante y enmienda o mejorador de suelos.

Castellano *et al.* (2000), deshidrataron y molieron la pollinaza para facilitar su manejo, conservación y reducción de la diseminación de enfermedades. Concluyeron que el deshidratado disminuyó su valor proteínico y no logró la eliminación total de los microorganismos patógenos.

Se ha demostrado que el grupo de las bacterias ácido lácticas son capaces de producir gran cantidad de ácidos orgánicos, como el ácido láctico durante las fermentaciones y éste funciona muy eficazmente contra *Salmonella* spp. y *Escherichia coli* (Roe *et al.*, 2002). Cada microorganismo tiene un rango de pH en el que puede vivir adecuadamente y un pH desfavorable, influye en el funcionamiento de las enzimas y en el transporte de nutrientes al interior de la célula. Así, el ácido láctico, a bajo pH en el sistema, se encuentra en forma no disociada y pueden penetrar a la célula por difusión pasiva, dentro del citoplasma del microorganismo se disocia debido al pH neutro y se liberan los protones, bajando el pH del citoplasma, lo cual interfiere con algunos senderos metabólicos y el microorganismo muere (Hazan *et al.*, 2004).

El pH de la pollinaza es alcalino debido a su alto contenido de amoníaco (NH_3) y a este pH el NH_3 es volátil, además, es el pH ideal para el crecimiento de microorganismos patógenos como la *Echerichia coli* y *Coccideas*, a pH ácido, el NH_3 puede ser transforma a amonio (NH_4) y este puede ser retenido en el sistema.

El Vitafert es un producto biológico obtenido por fermentación en estado líquido que contiene bacterias, levaduras y sus metabolitos, capaces de producir cantidades apreciables de ácidos orgánicos de cadena corta como láctico, acético, propiónico, succínico y pirúvico, vitaminas y enzimas (Elías y Herrera, 2008) y podría retener el NH_3 de la pollinaza en NH_4 .

Por lo anterior, el **objetivo** del presente estudio es: Evaluar los efectos de la inoculación de niveles de Vitafert y melaza en los parámetros bromatológicos, fermentativos y microbiológicos de la pollinaza fermentada aeróbicamente.

La **hipótesis** indica que la inclusión de Vitafert y melaza en la fermentación en estado sólido de la pollinaza, incrementará el contenido de proteína cruda y verdadera en el producto fermentado y disminuirá los parámetros microbiológicos de la pollinaza.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Características de la producción bovina en el trópico

Ruiz (2005), menciona que los sistemas de alimentación bovina en el trópico se sustentan principalmente en el uso de pastos y forrajes, el cual ofrecen la fuente más barata de nutrientes con que se cuenta para la alimentación animal. Sin embargo, esta se ve afectada debido a que la producción forrajera tiene una serie de limitantes en cuanto a calidad de los suelos, competencia con los cultivos y malezas (Hernández, 2002), y la alta estacionalidad, provocada por los cambios climáticos que se dan en la región, ocasionando épocas de seca y norte, lo que propician la escasez de forraje y la baja calidad del poco alimento disponible (Sosa *et al.*, 2000) lo que ocasiona la disminución en la producción bovina ya que los pastos no satisfacen por si solos los requerimientos nutricionales de crecimiento (Betancourt *et al.*, 2003b; Ibáñez *et al.*, 2006).

Betancourt y Caraballo (2005), indican que dicha situación ha ocasionado en los sistemas de producción ganadera, una alta dependencia del alimento concentrado, estos alimentos son elaborados principalmente con materias primas importadas, lo que lo hace cada día más costoso, y en muchos casos es una práctica no rentable por los niveles de producción. Por lo que, para mejorar la producción es factible establecer estrategias de suplementación a los animales en pastoreo que permiten reducir las pérdidas de peso vivo y producción de leche en las épocas críticas, especialmente en el período poco lluvioso y mantener una mejor tasa de crecimiento. Por tal motivo cada día cobra más importancia el desarrollo de tecnologías para lograr la elaboración de alimentos con los recursos naturales locales (Elías y Herrera, 2008).

Ibáñez *et al.* (2006), señala que debido a esto los productores han optado por alternativas de suplementación a base de productos y sub-productos disponibles ricos en proteínas y nutrientes de alto valor energético, para mejorar la dieta animal en la región tropical, debido a que resultan más baratos, entre estas alternativas se encuentran el uso de la pollinaza. Sin embargo, la pollinaza fresca tiene algunas desventajas: por su gran contenido de humedad (20% o más), lo que la convierte en

un factor de riesgo para el medio ambiente y para la salud de los individuos que la manejan (Castellano y Murguía, 2002).

El reglamento sobre el manejo y control de gallinaza y pollinaza (2001), indica que los subproductos de aves de corral como el caso de la gallinaza y la pollinaza, son de sumo interés para el desarrollo sostenible de la agricultura en el proceso de fertilización y recuperación de suelos; así como en el uso pecuario como base o materia prima para la producción de alimentos para ganado; por lo que en el artículo 9° establece, cuando la gallinaza o pollinaza se utilice en dietas de rumiantes u otros animales, en el ambiente de crianza animal o en instalaciones de cría de peces, los tratamientos permitidos serán:

- a) Secado mediante proceso térmico.
- b) Ensilaje con un pH final inferior a 4.7.
- c) Peletizado con una temperatura de proceso superior a 70°C.
- d) Otros tratamientos físicos, químicos o biológicos aprobados por el Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) y por el Ministerio de Salud (MS)

Fontenot (1999) sugiere que cuando las excretas se usan como alimento animal, es necesario procesarlas para destruir los microorganismos patógenos, mejorar sus características y realzar su palatabilidad. Entre los principales tratamientos a que se han sometido estos desechos, pueden citarse los procesos fermentativos que ocurren en el ensilaje, compost y otras fermentaciones (Kwak, 1999; Morais *et al.*, 1999; Tuquia y Tam, 2000; Mitchell *et al.*, 2002). De acuerdo con lo anterior, algunos investigadores han recurrido al proceso de ensilaje para aprovechar al máximo el contenido de nutrientes de las excretas, además, este método permite la incorporación de otros subproductos agroindustriales, como la melaza (Martínez *et al.*, 2008).

2.2. Contaminación ambiental

Canziani y Mielinicki (2007), señalan que en la actualidad la contaminación atmosférica por los gases de efecto invernadero (GEI) es la más relevante a nivel global, los principales gases componente de la atmosfera son el dióxido de carbono,

el metano y óxido nitroso, los cuales han aumentado debido a la concentración de las actividades humana (industriales, agroganadera y de transporte).

Una de las problemáticas que presenta la actividad agropecuaria en la zona del altiplano, es el almacenamiento de excreta, esto se debe a que permanece en piso y en lugares cerrados durante meses, tiempo suficiente para producir gases y olores fuertes. El amoniaco es el más importante y común de los contaminantes gaseosos. Es un gas alcalino, compuesto por nitrógeno e hidrógeno. Proveniente de la descomposición de las excretas de los animales (Tesa, 2005).

Méndez *et al.* (2009), mencionan que las granjas avícolas producen subproductos como son las excretas que al ser dispuestos sin control alguno ocasionan perjuicios al ambiente, estos efectos se pueden clasificar en términos de la contaminación del aire, agua y suelo, además de propiciar la proliferación de vectores y microorganismos patógenos, todo ello con un impacto negativo en el medio ambiente (Estrada, 2005). En el aire las emisiones de amoniaco, sulfuros de hidrógeno, metano y dióxido de carbono producen molestias por los olores desagradables, siendo además precursores de trastornos respiratorios en el hombre y animales (Pacheco *et al.*, 1997). Los residuos agrícolas y ganaderos (amoniaco y nitrito) son fuente principal de nitrógeno artificial, un exceso de nitrógeno provoca la liberación a la atmosfera de gases nitrogenados que contribuyen al efecto invernadero y a la lluvia ácida, lo que constituye a la acidificación del suelo y a la pérdida de otros nutrientes como el calcio y el potasio, esenciales para la fertilidad (Hack-Ten-Broeke *et al.*, 1996; Brandi-Dohrn *et al.*, 1997).

Mayor (2000), indica que la formación de gases amoniacales ha sido atribuida a la descomposición del ácido úrico presente en las excretas. Coma y Bonet (2004), mencionan que la cantidad de nitrógeno (N) excretado depende del nivel de proteína bruta en el pienso, la digestibilidad de esta proteína y valor biológico. La contaminación final al medio ambiente puede ser en forma de emisión aérea de amoniaco (NH_3) o bien en forma de contaminación de aguas por exceso de nitrato (NO_3^-).

La conversión del N de las heces en amonio (NH_3) varía en función de la temperatura, humedad y pH de las excretas y tasa de ventilación. Se ha demostrado que los olores aumentan con el contenido de humedad, de este modo, las excretas mas húmedas tienen mayor degradación microbiana de ácido úrico excretado por las aves, lo que trae como consecuencia mayor emisión de amonio y generación de olores (Leyla *et al.*, 2005; Carey *et al.*, 2004).

2.3. Pollinaza

Valdivié y Ortiz (2003), se refieren a la pollinaza, como la excreta de las aves de engorda la cual siempre se presenta mezclada con el material que se utiliza en la cama para los pollos, como el aserrín de madera, cascarilla de arroz o de soya, olote de maíz molido, etc. La pollinaza es un subproducto nitrogenado no proteínico, cuya composición varía debido a varios factores tipo de cama, edad de las aves, condiciones de ventilación y temperatura dentro de las naves. El valor proteínico está constituido por el ácido úrico, urea y amoníaco que dan un mínimo de 3.0 a un 24% de proteína total (Ortiz, 2004).

El contenido de nutrimentos de la pollinaza está influenciado principalmente por el tipo de material utilizado como cama, el tipo de piso de la galera, la densidad del ave/ m^2 , la temperatura y humedad ambiental de las unidades de producción del sistema de agua y los métodos de limpieza utilizados (Jacob *et al.*, 1997). La pollinaza tiene una composición química variable y su mayor valor es como fuente de proteína y minerales, como se indica en la cuadro 1.

Cuadro 1. Composición química y fraccionamiento de la pared celular de la pollinaza, según el tipo de cama (% base seca).

Fracciones y Nutrimento	Tipo de Cama		Promedio Total
	Cascarilla de arroz	Viruta de madera	
Materia Seca	85.5±2.9	80.2±4.7	84.1±4.1
Proteína Cruda	34.9±2.6	30.0±3.0	33.6±3.4
Extracto Etéreo	4.8±1.0	4.4±1.3	4.7±1.1
Ceniza	14.9±0.8	13.4±1.2	14.5±1.1
Calcio	2.8±0.7	2.1±0.8	2.6±0.8
Fosforo	1.1±0.1	1.1±0.2	1.1±0.1
FND	34.9±3.3	37.9±4.9	35.7±3.9
FAD	21.4±1.7	25.0±5.4	22.4±3.4
Hemicelulosa	13.6±2.6	12.8±3.8	13.4±2.9
Celulosa	15.0±1.0	17.4±3.5	15.6±2.2
Lignina	4.1±0.6	6.9±2.1	4.9±1.7
CNE	10.4±2.3	14.4±2.4	11.5±2.9

± desviación estándar

FND: Fibra Neutra Detergente

FAD: Fibra Ácida Detergente

CNE: Carbohidratos no estructurales

Fuente: Tobía y Vargas (2000).

El tipo de piso influye en el contenido de cenizas de la pollinaza. La cama utilizada afecta los contenidos de proteína y los niveles de fibra; la densidad de pollos alojados/m² afecta positivamente el contenido de proteína cruda y cenizas y está negativamente correlacionada con el contenido de materia seca (Fontenot *et al.*, 1996).

2.3.1. La pollinaza y el medio ambiente

Piad (2001), menciona que en el ámbito mundial, la avicultura es una de las ramas de la producción animal de mayor importancia, porque contribuye a la satisfacción de 35 % de las necesidades proteicas de la población. Esto se logra a partir de la explotación de dos de sus vertientes básicas: la producción de carne y huevo.

Debido a esto, en los últimos años, se ha observado un incremento en el consumo de estos productos, que equivale a un aumento del número de aves para satisfacer las demandas (García *et al.*, 2005). Sin embargo, esto trae como consecuencia la generación de abundantes contenidos de residuos, que causan la contaminación de suelos y aguas, emitiendo olores desagradables y altas concentraciones de gases, además de propiciar la proliferación de vectores y microorganismos patógenos, todo ello con un impacto negativo en el medio ambiente (Estrada, 2005), lo que conducen a la búsqueda de métodos que reduzcan la contaminación ambiental (García *et al.*, 2005).

Tesa (2005), señala que las excretas de aves contienen proteína ingerida y no absorbida en el tracto intestinal, y en la orina predomina el ácido úrico, y otros compuestos nitrogenados provenientes del metabolismo de las proteínas. Indicando que la rápida transformación del Nitrógeno urinario no implica que el Amoniac sea liberado al medio ambiente, no obstante la cama tiene una solución acuosa y hay un equilibrio entre la cantidad de amoniaco e iones amonio e iones hidroxilo. La importancia del equilibrio es que el Amoniac puede ser sostenido en solución como ion amonio, lo que está en función del pH y de la concentración de amoniaco en el aire. Un aumento de temperatura disminuye la solubilidad y se libera el gas, además de aumentar el metabolismo y la reproducción microbiana.

Debido a esto el manejo de la pollinaza fresca tiene algunas desventajas: por su gran contenido de humedad (20% o más), lo que lo hace posible que presente combustión espontánea en los sitios de almacenamiento (Castellano *et al.*, 1999); por su elevado contenido microbiológico (Latala A. *et al.*, 1999) y por propiciar liberación de amoniaco (Moore, *et al.*, 1996), convirtiéndolo en un material contaminante para el medio ambiente y un factor de riesgo para la salud de los individuo que la manejan.

Por lo que Hyden (2001), sugiere que algunas de estas limitantes pueden ser solventadas a través de tratamientos físicos, biológicos o químicos que incluyen secado, peletizado, ensilado, entre otros. Al respecto, los procesos de fermentaciones, recientemente han demostrado que algunas bacterias, especialmente del grupo de las bacterias ácido lácticas, son capaces de producir

gran cantidad de ácidos orgánicos, como el ácido láctico, que funciona muy eficazmente contra Coccidias y cualquier microorganismo patógeno.

2.3.2. Microorganismo patógeno de la pollinaza

Casi todos los animales vertebrados, padecen parásitos protozoarios que producen la infección conocida como coccidiasis o coccidiosis. Miles de especies de coccidios de los animales herbívoros, omnívoros y carnívoros han sido descritas, y permanecen muchos más en el anonimato. Algunos causan enfermedades graves, mientras que otros son de menor o ninguna importancia clínica (Jolley y Bardsley, 2006).

Marshall (2000), menciona que las excretas de las aves contienen compuestos orgánicos e inorgánicos, una cantidad variable de humedad y una abundante población microbiana, principalmente huevos esporulados de coccidias. Estos huevos son agentes que causan coccidiosis y son organismos unicelulares protozoos que se desarrollan dentro de las células intestinales de sus anfitriones animales. Debido a que sus resultados de desarrollo intracelular en la destrucción de las células donde se multiplican, todos ellos son considerados parásitos, sean o no causas de enfermedades (Levine, 1985). La coccidiosis es un problema importante de salud mundial veterinarios en cría intensiva de pollos. Esta, es causada por grupo de protistas, parásitos del género *Eimeria*, familia Eimeriidae, el orden Eucoccidiorida y clase Sporozoasida. Aunque la mayoría de las especies que infectan a los rumiantes no causan síntomas, se pueden encontrar en un gran número de análisis de diagnóstico estándar. La distinción entre especies patógenas y las de menor importancia clínica, es esencial para diferenciar coccidias de virus, bacterias u otra enfermedad de causas entéricas (Dougschies y Najdrowski, 2005). Sin embargo, el riesgo de adquirir parásito del género *Eimeria* en los rumiantes, es latente al momento de consumir pollinaza contaminada de esta.

2.3.3. Normas del uso de la pollinaza

El Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), junto con el Ministerio de Salud (MS) de la República de Cuba en el 2003, realizaron un plan de manejo de desechos que abarca el almacenamiento, tratamiento, transporte y mercadeo de la pollinaza o

gallinaza y su uso o disposición final. Decretando que las excretas de aves de engorda (pollinaza) u otras aves en etapas de cría o desarrollo, solas o mezcladas con otros materiales se le efectuara procesos físicos, químicos o biológicos o bien una combinación de ellos con la finalidad de dar tratamiento a la pollinaza o gallinaza de tal manera que esta pueda ser posteriormente utilizada como fuente de proteína, fertilizante, enmienda o mejorador de suelos, como sustrato de cultivos agrícolas o bien se utilice en dietas de animales.

La Ley Federal de Sanidad Animal (LFSA, 2007), en el Capítulo III, Artículo 67, establece los requisitos zoonosanitarios que deben observar los interesados en movilizar mercancías reguladas en el territorio nacional, por lo que las autoridades estatales o municipales no podrán exigir mayores requisitos que los establecidos por la propia Secretaría. En el Artículo 70, menciona que la Secretaría determinará mediante disposiciones de sanidad animal, las características, requisitos o especificaciones que deberán reunir los vehículos y la transportación de animales vivos, bienes de origen animal y productos para uso o consumo animal, cuando impliquen un riesgo zoonosanitario o en su caso un riesgo de contaminación de los bienes de origen animal. La secretaria tendrá la capacidad de ordenar modificaciones o restricciones al uso o destino de animales, sus productos o subproductos e insumos de producción animal, siempre y cuando represente un riesgo de diseminación de enfermedades y plagas en una zona o región determinada o en todo el territorio nacional.

2.4.4. Uso de la pollinaza como alimento proteínico

Leyla *et al.* (2005), señalan que los altos niveles de proteína y minerales esenciales en la nutrición animal junto con sus bajos costos hacen de la pollinaza un recurso alimenticio atractivo para ser empleado en los sistemas de producción de rumiantes, ya que estos tienen la capacidad de sintetizar la proteína a partir del nitrógeno no proteínico (NNP) y de utilizar los compuestos fibrosos presentes en estas (Tobías y Vargas, 2000).

Este subproducto es rico en proteína, sales minerales y moderadas en fibras. Aunque su contenido de Proteína Cruda (PC) puede variar de 17% hasta 31% de

acuerdo al tipo de cama utilizado (Tobías y Vargas, 2000). Sin embargo, su riqueza energética es todavía baja, ya que depende del tipo de material fibroso que se haya utilizado como cama, así como de su contenido en celulosa, hemicelulosa y lignina, por lo que se sugiere mezclarlo con otra fuente energética (carbohidratos de fácil disponibilidad), (Calderón y Elías, 2006).

2.3.5. El nitrógeno no proteínico (NNP) y la pollinaza

Church (1988), menciona que el aporte de nitrógeno, es una parte muy importante dentro de la nutrición de los rumiantes, para la síntesis de proteína microbiana. El nitrógeno puede ser de origen dietario, del nitrógeno no proteínico externo o del nitrógeno de reciclaje endógeno. La proteína microbiana (PM) formada en el rumen, pasa hacia el intestino, representando el 70 a 90% de nitrógeno no amoniacal que penetra al intestino; la PM, puede verse afectada por la cantidad de energía de ATP disponible para el crecimiento microbiano. Las fuentes de NNP más económicas, han sido la urea y el amoniaco (en forma líquida o gaseosa), administrado en forraje de baja calidad incluyendo algunas sales amoniacales, así como el de origen endógeno, el cual es transferido hacia el rumen a través de la saliva (Meyreles *et al.*, 1982).

Zinn *et al.* (1996), señala que otros elementos claves para el desarrollo bacteriano son los aminoácidos esenciales. La pollinaza es un subproducto de la industria avícola, fuente de nitrógeno amoniacal y ácido úrico como NNP, la cual aporta aminoácidos indispensables (arginina, histidina, isoleusina, leucina, metionina, fenilalanina, triptófano y valina) o esenciales como la lisina y treonina; pero estos no pueden ser sintetizado por el animal, ni su población microbiana, por lo tanto debe ser suministrado en la dieta.

2.4. Melaza

Uno de los principales problemas a nivel mundial en las agroindustrias, es la gran cantidad de desechos o subproductos, que se obtienen del procesamiento de la materia prima (Castro *et al.*, 2010), estos residuales y subproductos de la industria azucarera son relativamente contaminantes, al mismo tiempo que contienen una gran cantidad de nutrientes orgánicos e inorgánicos que permiten su reciclaje en la

elaboración de otros productos como son alimento para ganado, así como en la producción industrial. Uno de los principales residuales de esta industria son las mieles o melazas, esta es ampliamente utilizada como materia prima para las fermentaciones tales como la producción del etanol y ácido láctico debido a su abundancia y precio bajo comparado con otra materias primas disponibles (Bulut *et al.*, 2004).

Leeson y Summers (2000), se refieren a la melaza como un líquido denso y viscoso de color oscuro proveniente del subproducto final de la fabricación o refinación de la sacarosa de la caña de azúcar. Fajardo y Sarmiento (2007), señalan que la composición de la melaza es muy heterogénea y puede variar considerablemente dependiendo de la variedad de caña de azúcar, suelo, clima, periodo de cultivo, eficiencia de la operación de la fábrica, sistema de ebullición de la azúcar, entre otros. Leeson y Summers (2000), mencionan que además de la sacarosa, contiene otros compuestos solubles que normalmente está presente en el jugo de caña (glucosa, fructosa y rafinosa). No obstante, como se presenta en la Cuadro 2, el producto resultante (melaza final) es todavía muy rico en carbohidratos de fácil fermentación, muy bajo en nitrógeno, y relativamente alto en cenizas. En general, la composición de la miel final varía entre países y regiones, según la tecnología de extracción, su eficiencia, la variedad de caña, y otros (cuadro 2).

Cuadro 2. Composición de la melaza en diferentes regiones

Región	MS, %	PB, %	Azúcares Totales, %	Cenizas %	Fuente
Australia	76.4	5.6	65.3	13.6	
Caribe	80.0	-	70.9	15.1	Figuroa y Ly 1990
América del Norte	78.8	3.2	-	8.1	
Latinoamérica	77.2	3.4	62.1	10.3	Figuroa y Ly 1990

2.4.1. Inclusión de la miel final en la fermentación de la pollinaza

Ortiz (2004), indica que la pollinaza constituye un excelente recurso en la suplementación de rumiantes, determinado por su alto contenido en nitrógeno, sin embargo, su riqueza energética es todavía baja. Por lo que Calderón y Elías, 2006, sugieren mezclarla con otra fuente energética, para lograr una mejor sincronización ruminal y aprovechar la capacidad fermentativa de la microbiota del complejo rumen. Garantizando, de esta forma la energía necesaria a los microorganismos para utilizar el amoníaco, generado por la alta degradabilidad del NNP de la pollinaza.

El comité de la Unión Ganadera Regional de Jalisco (UGRJ, 2010), señala que debido a esto la melaza puede ser utilizada como aglutinante de la dieta, reduciendo el polvo y aumentando la palatabilidad de la misma o proporcionada en mayor cantidad, sirviendo como una de las fuente principales de energía. Por lo que Fajardo y Sarmiento (2007) y Betancourt *et al.*, (2003a), mencionan que la melaza ha sido suministrada al ganado de carne y de leche por muchos años, como aditivo para incrementar la gustosidad del alimento, y compensar el bajo contenido de azúcares en los forrajes. En este sentido, estudios realizados han reportado, que cuando la melaza es suministrada como alimento a novillos de engorde en porción del 10 %, éstas suministran una energía neta (EN) relativamente alta. Sin embargo, cuando el nivel es incrementado a 25 y 40 %, la EN se reduce en casi 100 % (Fajardo y Sarmiento, 2007).

Por lo que el comité de la UGRJ (2008), recomienda adicionarlo en un 5 -10% cuando se emplea como aglutinante de la dieta. Aunque se ha experimentado con inclusiones de melaza que rebasan el 50% de la ración, los resultados al uso de niveles elevados, confirman que el nivel más adecuado es cercano al 20% resultando en mayores ganancias de peso y mejores conversiones alimenticias. Sin embargo, es posible incluirlo hasta en un 30%, siempre y cuando se contemple un aumento de la proteína de la dieta. De acuerdo a lo anterior, Calderón (2005) menciona que mediante el proceso de fermentación, se mejora el contenido de proteína (proteína verdadera), lo que contribuye a que gran parte pase a la región baja del tracto digestivo en los rumiantes.

2.5. Fermentación

Ruiz *et al.* (2007), menciona que la fermentación es una de las biotecnologías aplicadas más antiguas, que existe de manera natural desde el comienzo de la vida en el planeta y fue empleada de forma artesanal en Asia, África y América Central. Esta se ha utilizado para elaborar y conservar alimentos a partir de cereales, yuca, entre otros.

La fermentación es la transformación de una sustancia orgánica (generalmente un carbohidrato) en otra utilizable mediante un proceso metabólico por la acción de las enzimas. Estas enzimas pueden ser producidas por hongos, bacterias y levaduras, las cuales provocan reacciones de oxidación-reducción, con lo anterior el organismo productor deriva energía suficiente para su metabolismo. Las fermentaciones pueden ser anaeróbicas, si se producen fuera del contacto con el aire, o aeróbica, que solo tiene lugar en presencia de oxígeno (Encarta, 2000).

Mitchell *et al.*, (2002), señalan que los procesos fermentativos se pueden dividir en fermentación líquida sumergida (FLS) y fermentación en estado sólido (FES). La diferencia mayor entre estos dos procesos biológicos, es la cantidad de líquido libre en el sustrato.

2.5.1 Fermentación en estado sólido

La fermentación en estado sólido puede definirse como un proceso en el cual se desarrollan microorganismos en materiales sólidos húmedos, por supuesto que quedan incluidos los materiales naturales o sintéticos que actúan sólo como soportes, y que están impregnados en una solución que contiene las sustancias nutritivas (Julián y Ramos, 2007).

Pandey *et al.*, (2001) señalan que las fermentaciones en estado sólido deben definirse como fermentación que ocurre en ausencia o casi en ausencia de agua libre, empleando un sustrato natural usando un material inerte como soporte sólido.

En los últimos años, la FLS y FES han mostrado ser prometedoras en el desarrollo de algunos bioprocesos y productos, estos se han empleado exitosamente para la producción de enzimas, probióticos, proteína unicelular, aditivos antibióticos y metabolitos secundarios, además, permiten mejorar la composición química de

algunos productos y subproductos agrícolas y obtener nuevas opciones para la alimentación animal (Sancho, 2004). Lo cual permiten mejorar la composición química de algunos productos agrícolas y obtener nuevas opciones para la alimentación animal. La fermentación puede incrementar los niveles proteicos, mejorar el balance de aminoácidos y la digestibilidad de las materias primas empleadas (Pedraza *et al.*, 1995; FAO, 1998).

2.5.2. Factores que influyen en la fermentación en estado sólido.

Robinson *et al.* (2001), mencionan que la FES se ha empleado, exitosamente, para la producción de enzimas y metabolitos secundarios. Muchos de estos metabolitos secundarios se producen, aún, en FLS; sin embargo, cuando la producción se incrementa a gran escala, también se aumentan los costos y la demanda energética. 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. Otros factores importantes para el crecimiento microbiano en un sustrato en particular son: la fuente de carbón y la relación carbón/nitrógeno, temperatura, humedad y actividad del agua, pH, aeración, agitación y el tamaño de partículas (Pandey *et al.*, 2001).

2.5.2.1. Fuente de carbón y la relación carbón/nitrógeno: El tipo, carbón natural y nitrógeno, son los factores de mayor importancia. 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. El nitrógeno es un factor importante que determina el crecimiento de los microorganismos y desempeña un importante papel en el cambio de pH en el sustrato durante la fermentación.

2.5.2.2. Temperatura. La temperatura se eleva debido a las características exotérmicas de los procesos de fermentación y es uno de los indicadores más 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. (Mitchell *et al.*, 2002).

2.5.2.3. Humedad y 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 tenores 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). En general, se ha establecido que en el caso de las bacterias, la humedad de la matriz sólida puede ser mayor de 70%.

2.5.2.4. pH. Cada microorganismo posee un rango de pH óptimo para crecer. El crecimiento microbiano puede causar un cambio en el pH del sustrato, debido a la producción de ácido por la oxidación incompleta del sustrato o cuando el ión amonio es atrapado como amoníaco, por lo cual libera un protón al medio, causando una rápida disminución del pH. Por otro lado, la liberación de amonio por la deaminación 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).

De manera general, se ha observado que el crecimiento de los hongos tiene un rango de pH entre 3.5 y 6, 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).

2.5.2.5. Aeración y agitación. Estos procesos influyen en dos aspectos fundamentales: la demanda de oxígeno en los procesos aeróbicos y el transporte de masa y calor, fenómenos característicos de estos sistemas.

2.5.2.6. Tamaño de partículas. Generalmente, un sustrato de pequeño tamaño de partículas puede proporcionar mayor superficie para el ataque microbiano, y esto sería considerado como un factor deseable. 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).

2.5.3. Ventajas de los alimentos fermentados en estado sólido

Rodríguez *et al.* (2001a), señalan que las fermentaciones en estado sólido han sido utilizadas ampliamente en el reciclaje de materiales voluminosos a través de tecnologías sencillas, con la que se logran incrementar los valores proteínicos, mejorando el balance de aminoácidos y la digestibilidad de las materias primas empleadas. Por lo que tomando como base estos estudios realizados y teniendo en cuenta que los procesos de enriquecimiento proteínicos por fermentación en estado sólido son más lento, que los que ocurre en estado líquidos.

Calderón *et al.* (2005) determinaron las variaciones en el tiempo de fermentación de los indicadores químicos y fermentativos de la pollinaza de cascarilla de café, encontrando que los valores de pH disminuyeron en el tiempo de fermentación, lo cual mostro que las principales variaciones del pH dependen más de la concentraciones de NH₃ que de la producción de la concentraciones de AGV, influenciado principalmente por el crecimiento de los lactobacilos.

2.6. Vitafert

El vitafert, es un producto biológico de color oscuro, olor agradable, obtenido como resultado de la fermentación en estado líquido, compuesto de bacterias lácticas y levaduras capaces de producir cantidades apreciables de ácidos orgánicos de cadena corta como láctico, acético, propiónico, succínico y pirúvico, vitaminas y enzimas. El Vitafert es un activador de la fermentación que estimula la producción de ácidos orgánicos, disminuye el pH, incrementa y estabiliza la proteína, aumenta la digestibilidad de la materia seca y disminuye las fracciones de la pared celular de las materias alimentarias que se someten a su acción (Elías y Herrera, 2008).

Geros *et al.* (2000), señalan que a pH bajo, el ácido acético y ácido láctico son ácidos débiles y se encuentra principalmente en forma no disociada y puede entrar a la célula microbiana por difusión pasiva; en el citoplasma se disocia debido al pH más neutro y se liberan los protones, bajando el pH del citoplasma, lo cual interfiere

con algunos senderos metabólicos (Roe *et al.*, 2002; Hazan *et al.*, 2004), así como en el transporte de nutrientes e iones, cambio en la estructura de la membrana, en los ácidos grasos y composición de los fosfolípidos, y en la síntesis de proteína (Sikkema *et al.*, 1995).

Pandey *et al.*, (2001), indican que cada microorganismo posee un rango de pH en el que puede vivir adecuadamente, con el óptimo dentro de ese rango, y el pH desfavorable influye en el funcionamiento de las enzimas y en el transporte de nutrientes al interior de la célula. La disminución del pH del medio que producen ciertos microorganismos, les confiere una ventaja selectiva frente a otros microorganismos competidores. Las bacterias lácticas, que producen grandes cantidades de ácido láctico como consecuencia de su metabolismo primario, reducen el pH del sistema a valores inferiores a los soportables por otras bacterias competidoras; de esa forma, las bacterias competidoras mueren y las lácticas se convierten en la población dominante (Jay, 1994).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Localización geográfica del área de estudio

El presente estudio se realizó en el laboratorio de Ciencia Animal del Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco ubicado en el km 3.5 periférico Carlos A. Molina s/n, Carretera Cárdenas – Huimanguillo en la región de la Chontalpa en el Municipio de Cárdenas, Tabasco (Figura 1).

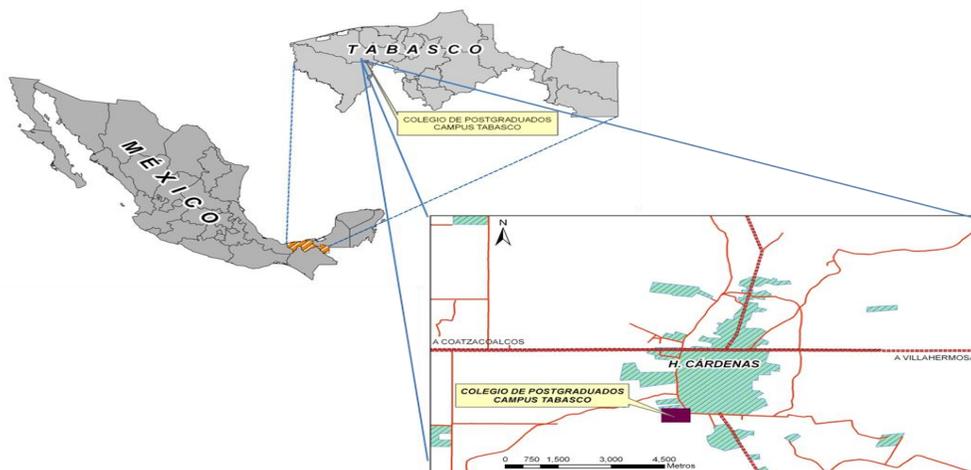


Figura 1. Macro y micro localización del área de estudio.

El campus está situado a 18° 00` latitud Norte y 93° 30´ de longitud Oeste, con una altura de 9 msnm. El clima de la región es de tipo Am (f) w (i) y de acuerdo a la clasificación de Koppen, modificado por (García, 1988). La precipitación promedio anual es de 2163 mm y la temperatura media anual es de 25.9 °C. La humedad relativa promedio es de 80% con una máxima de 90% y una mínima de 65% (Nájera., 1990).

3.2. Tratamientos estudiados

Se estudiaron 3 niveles de Vitafert (0, 5.5 y 11.0 % BS) y 3 niveles de melaza (8, 16 y 24 % BS) en un diseño completamente al azar con arreglo factorial 3 por 3 formando 9 tratamientos (cuadro 3) con 3 repeticiones por tratamientos. La variable de respuesta estudiada fue incremento en Y ($Y= 24 \text{ h} - 0 \text{ h}$).

Cuadro 3. Tratamientos estudiados

Factor A	Factor B	Tratamientos (T)
Nivel de Vitafert.	Nivel de Melaza.	
0%	8%	T1
	16%	T2
	24%	T3
5.5%	8%	T4
	16%	T5
	24%	T6
11.0%	8%	T7
	16%	T8
	24%	T9

Para el análisis estadístico de la media de los datos se aplicó la prueba de Tukey (1983) y el procesamiento de los datos se realizó mediante el software R (2009), para lo cual se utilizó el modelo siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + AB_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

Dónde:

A_i =Efecto del i-ésimo nivel del factor A (Vitafert)

B_j =Efecto del j-ésimo nivel del factor B (melaza)

AB_{ij} =Efecto de la interacción del i-ésimo nivel del factor A y el j-ésimo nivel del factor en su repetición k.

Y_{ijk} = variable respuesta de la k-esima repetición con el i-ésimo nivel de A, el j-ésimo nivel de B y la repetición k-ésima.

μ =Media general

ϵ_{ijk} =Error aleatorio

3.3. Procedimiento experimental

Se mezcló la pollinaza de forma homogénea con los ingredientes según los tratamientos de acuerdo al cuadro 4, que se corresponde con los tratamientos planteados BS (cuadro 5). Se utilizaron 1000 g de muestra como unidad experimental agregando agua a los tratamientos con menor contenido de Vitafert y sin Vitafert para que todos tuvieran el mismo porcentaje de humedad inicial. Después de mezclar los 1000 g de muestra, se tomó 100 g aproximadamente para los análisis bromatológicos, fermentativos y microbiológicos (hora 0). El resto de la muestra (900 g aproximadamente) se extendió en charolas de plástico con un grosor de capa de 3 cm para permitir aireación (fermentación aeróbica) durante la 24 h de fermentación. Después de las 24 h de fermentación, se procedió a tomar alícuotas para determinar los parámetros bromatológicos, fermentativos y microbiológicos.

Cuadro 4. Porcentaje de pollinaza, Vitafert y melaza en los tratamientos estudiados (base húmedo).

Ingredientes	Nivel de Vitafert (%)								
	0			5.5			11.0		
	Nivel de Melaza (%)			Nivel de Melaza (%)			Nivel de Melaza (%)		
	8	16	24	8	16	24	8	16	24
Pollinaza	90.00	80.00	70.00	69.23	61.54	53.85	56.25	50.00	43.75
Melaza	10.00	20.00	30.00	7.69	15.38	23.08	6.25	12.50	18.75
Vitafert	0.00	0.00	0.00	23.08	23.08	23.08	37.50	37.50	37.50
Total	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

Cuadro 5. Porcentaje de pollinaza, Vitafert, y Melaza en los tratamientos estudiados (base seco).

Ingredientes	Nivel de Vitafert (%)								
	0			5.5			11.0		
	Nivel de Melaza (%)			Nivel de Melaza (%)			Nivel de Melaza (%)		
	8	16	24	8	16	24	8	16	24
Pollinaza	91.52	82.73	73.68	86.26	77.92	69.31	81.57	73.61	65.42
Melaza	8.47	17.24	26.32	7.98	16.23	24.75	7.55	15.34	23.36
Vitafert	0.00	0.00	0.00	5.75	5.84	5.94	10.88	11.04	11.21
Total	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

3.3.1. Preparación del Vitafert

En base a los porcentajes de los ingredientes del Vitafert (cuadro 6) se prepararon 25 L del inóculo en tres cubetas de plástico. Se mezclaron los ingredientes sólidos (pasta de soya, pulido de arroz, sales minerales, sulfato de amonio y urea) después se le adicionó la melaza, el agua y el yogurt natural como inóculo de lactobacilos, se agito seis veces durante 5 minutos, cada 2 horas, y se dejo fermentar en estado líquido durante 48 horas. Para adicionarlo al alimento y mezclarlo de acuerdo a los tratamientos del experimento.

Cuadro 6. Ingredientes del Vitafert (%)

Ingredientes	%
Pasta de Soya	4.0
Pulido de Arroz	4.0
Sales Minerales	0.5
Sal Urea	0.4
Sulfato de Amonio	0.3
Melaza	15.0
Agua	75.8
Total	100.0

Nota: Se le agregó el 5% de yogurt natural marca yoplait al inicio como inóculo.

3.4. Determinación de parámetros fermentativos

3.4.1. pH

Se pesaron 5 g de la muestra (0 y 24 h) y se depositaron en un matraz Erlenmeyer de 250 ml que contenía 45 ml de agua destilada y se procedió a agitarlo durante 15 minutos con un equipo Griffin Flash Shaker. Posteriormente se filtró con gasa estéril recolectando la muestra en un vaso de precipitado de 50 ml, inmediatamente se midió el pH con un potenciómetro portátil marca WPA (Conway, 1957).

3.4.2. Amoniaco

Se utilizó la técnica descrita por McCulloough (1967). Del líquido filtrado se tomaron 5 ml y se diluyeron en 5 ml de ácido clorhídrico valorado (0.14 N) y posteriormente se aforó con 15 ml de agua destilada, la muestra se guardó durante 2 meses en refrigeración a temperatura -4°C para su análisis posterior en un Espectrofotómetro de luz ultravioleta visible CARY 1-E VARIAN.

3.4.3. Ácido láctico

Para su determinación se utilizó la técnica descrita por SIGMA, (1990). Para preparar la muestra, se tomaron 8 ml de la muestra líquida y se le adicionaron 2 ml de

ácido metafosfórico al 25 % y se guardaron en refrigeración a temperatura -4°C, para análisis posterior.

3.5. Determinación de parámetros bromatológicos

3.5.1. Materia Seca (MS)

Para determinación de materia seca (MS) se pesaron 95 g de muestra en bolsas de papel de 1 kg de capacidad y se colocaron en una estufa a una temperatura de 60° C por 6 días. Posteriormente, se molió en un molino de martillo marca CULATII, con criba de 1 mm, para análisis bromatológicos. Para obtener el porcentaje de MS, primero se obtuvo el porcentaje de humedad (AOAC, 1980).

3.5.2. Cenizas

Considerando cuando una muestra se somete a una temperatura entre 550 y 600 °C en una mufla, toda la materia orgánica se quema. De esta manera se determina la materia inorgánica, o cenizas (AOAC, 1980), ya que esta no se volatiliza a estas temperaturas por lo que queda como residuo.

3.5.3. Materia orgánica

Se obtiene restando el 100 % de muestra al resultado del porcentaje de ceniza.

3.5.4. Proteína cruda (PC)

Se determinó mediante el método de Micro-Kjeldahl descrita según AOAC (1995), siguiendo el fundamento en el cual la determinación de proteína cruda, consiste en la conversión de proteína – nitrógeno a sulfato ácido de amonio durante la digestión de la materia orgánica con ácido sulfúrico y calor en la presencia de un catalizador; una vez que la materia orgánica se ha desintegrado completamente, se neutraliza con hidróxido de sodio, liberándose amoníaco el cual es destilado por arrastre con vapor dentro de una solución de ácido bórico, para formar un complejo boro-amoniaco (tetraborato de amonio). La cuantificación del nitrógeno se logra cuando una solución previamente valorado de ácido clorhídrico al 0.1 N, se añade a la solución, formando por cada equivalente de boro-amoniaco, un equivalente del

sulfato-amoniaco (sulfato de amonio), en donde 1ml de ácido estandarizado neutraliza 0.014 g de nitrógeno en forma de ion amonio.

3.5.5. Nitrógeno no proteínico (NNP x 6.25) y proteína verdadera (PV)

Se determinó mediante la técnica descrita por Bernstein (1983), para lo cual se utilizó el mismo equipo y reactivos mencionados en la metodología anterior, excepto el ácidotricloro- acético.

3.5.6. Fibra detergente neutro (FDN)

Para la determinación de la fracción fibrosa se utilizó la técnica descrita por Van Soest *et al.* (1991), Siguiendo el fundamento en el cual este método del detergente neutro para constituyentes de paredes celulares es un método rápido para determinar la fibra total en alimentos de origen vegetal, divide la materia seca de los alimentos muy cerca al punto que separa los constituyentes solubles y nutricionalmente disponibles (98%), de aquellos que son aprovechables de manera incompleta y dependen de la fermentación microbiana.

3.5.7. Fibra detergente ácido (FDA)

Para la determinación de la fibra detergente ácido se utilizó la técnica descrita por Van Soest *et al.* (1991).

3.5.8. Hemicelulosa y contenido celular

Se determina ***hemicelulosa*** por diferencia, restando la fibra detergente neutra de la fibra detergente ácida y el calculo para determinar ***contenido celular***, es restando el 100 % de muestra a la fibra detergente neutra.

3.6. Determinación de parámetros microbiológicos

3.6.1. Cuenta viable por dilución seriada

En placa del Agar Man, rogosa y Sharpe (MRS), se utilizó para lactobacilos y Agar Cuenta estandar (ACS) para cuenta aeróbicas. Las colonias blanco perla en MRS, se identificaron

como lactobacilos, mientras las colonias amarillo marrón de ACS, se identifico como bacterias aeróbicas.

El método de cuenta viable por dilución seriada (Zuberer, 1998) consiste, en resuspender 10 g de muestra, extraída de los silos previamente destapado del alimento de acuerdo al tiempo de fermentación (Cuadro 4) en 90 mL de Phosphate-Buffered Saline (PBS), se agito durante 15 minutos, de esta dilución se tomo 1 mL y se adiciono a un tubo de dilución que contiene 9 mL de PBS (10^{-1}), nuevamente se agito por unos segundos y se repitió el proceso hasta que se obtuvieron diluciones de 10^{-10} . Posteriormente de las diluciones 10^{-8} , 10^{-9} y 10^{-10} por triplicado, se tomo una alícuota de 0.1 mL y se vertió sobre los medios de cultivos específicos para cada tipo de bacterias ya antes mencionada.

El cultivo para lactobacilos se incubo a 28° C, a las 24 h de incubación se contaron las unidades formadoras de colonias (UFC); el cultivo para cuenta aeróbicas se incubo a 36° C, a las 72 h de incubación se contaron las unidades formadoras de colonias. El conteo se realizó de manera manual y visual, para esto en cada caja petri se observó a contra luz las colonias de bacterias, colocando una marca en el lugar de cada colonia (Madigan *et al.*, 2004).

3.6.2. Método rápido de Mc Master

Cada muestra se trato con el **método rápido de Mc Master** (Haug *et al.*, 2005) de la siguiente manera:

Dicromato de potasio al 2%: Se utilizaron 5 g de dicromato de potasio en un matrax volumétrico de 250 mL, se aforo con agua destilada.

Se preparo cloruro de sodio saturado, agregando 36 g de cloruro de sodio saturado (sal) y 100 ml de agua destilada. Se utilizó tubo de centrifugación de 50 mL por cada tratamiento, se agrego 3 mL de dicromato de potasio y se adiciono un mL de cada tratamiento en cada tubo de centrifugación y el dicromato de potasio prevendrá la degradación de bacteria de oocitos durante el tiempo que se realice la lectura de los tratamientos.

Los tratamientos pre-tratados fueron mezclados completamente usando un vortex para asegurar una suspensión uniforme y el cloruro de sodio saturado se agrego a cada tubo para dar un contenido total de 30 mL. Las dos cámara de Mc Master se llenaron con las muestras previamente tratadas en donde todos los oocitos bajos las celdillas de cada cámara se contaron y el numero de las madias de oocitos por cámara se calculo.

IV. RESULTADOS

Efecto de los niveles de Vitafert y melaza en la pollinaza fermentada en forma aeróbica

4.1.1 parámetros bromatológicos.

En relación a la MS se encontró interacción ($P < 0.001$) para esta variable. El mayor incremento de MS se encontró con 0 % de Vitafert y 8 % de Melaza, sin embargo, con los tratamientos 11 % de Vitafert y 16 % de melaza, 5.5 % de Vitafert y 24 % de melaza y 11 % de Vitafert y 24 % de melaza hubo menor incremento en esta variable, sin diferencia entre 11 % de Vitafert y 16 % melaza y 5.5 % de Vitafert y 24 % de melaza, este último es diferente ($P < 0.001$) al tratamiento 11 % de Vitafert y 24 % de melaza (cuadro 7).

Referente a Ceniza se encontró interacción ($P < 0.05$). El mayor incremento de Ceniza se encontró con 11 % de Vitafert y 24 % de Melaza y 11 % de Vitafert y 8 % de Melaza con diferencias entre ellos, sin embargo, con los tratamientos 0 % de Vitafert y 24 % de melaza, 0 % de Vitafert y 16 % de melaza y 5.5 % de Vitafert y 8 % de melaza hubo menor incremento en esta variable, sin diferencia entre 11 % de Vitafert y 16 % de melaza y 5.5 % de Vitafert y 8 % de melaza, este último es diferente ($P < 0.05$) al tratamiento 0 % de Vitafert y 24 % de melaza (cuadro 8).

Con relación a Materia Orgánica se encontró interacción ($P < 0.05$) para esta variable. El mayor contenido de MO se encontró con 0 % de Vitafert y 24 % de Melaza, 0 % de Vitafert y 16 % de Melaza y 5.5 % de Vitafert y 8 % de Melaza sin diferencias entre 0 % de Vitafert y 24 % de Melaza y 0 % de Vitafert y 16 % de Melaza, este último es diferente ($P < 0.05$) al tratamiento 5.5 % de Vitafert y 8 % de melaza, sin embargo, con los tratamientos 11 % de Vitafert y 24 % de melaza y 11 % de Vitafert y 8 % de melaza hubo menor contenido, con diferencia entre ellos (cuadro 9).

En relación al Contenido Celular se encontró interacción ($P < 0.001$). El mayor incremento de Contenido Celular se encontró con 11 % de Vitafert y 16 % de Melaza, sin embargo, con el tratamiento 0 % de Vitafert y 8 % de melaza hubo menor incremento (cuadro 10).

Cuadro 7. Efecto de niveles de Vitafert y melaza en el contenido de Materia Seca de la pollinaza fermentada en estado sólido

Nivel de Vitafert, %	Nivel de Melaza, %	0 Horas Materia Seca, %	24 Horas Materia Seca, %	Diferencias
0	8	53.68 ^f	60.88 ^a	7.20 ^a
5.5	8	55.74 ^{cd}	59.77 ^b	4.03 ^c
11	8	55.97 ^c	57.01 ^c	1.04 ^d
0	16	55.61 ^d	61.31 ^a	5.70 ^b
5.5	16	56.51 ^b	57.25 ^c	0.74 ^d
11	16	54.87 ^e	53.12 ^e	-1.75 ^{ef}
0	24	55.74 ^{cd}	61.26 ^a	5.52 ^b
5.5	24	56.63 ^b	54.93 ^d	-1.70 ^e
11	24	56.98 ^a	54.71 ^d	-2.27 ^f
		EE±0.033***	EE±0.050***	EE ± 0.042***

^{abcdef} Medias con diferentes superíndice en la misma columna difieren a P<0.05 (Tukey 1980)

*** P<0.001

Cuadro 8. Efecto de niveles de Vitafert y melaza en el contenido de Cenizas de la pollinaza fermentada en estado sólido

Nivel de Vitafert, %	Nivel de Melaza, %	0 Horas Cenizas, %	24 Horas Cenizas, %	Diferencias
0	8	17.72 ^{ab}	18.15 ^a	0.43 ^{cd}
5.5	8	17.84 ^a	16.92 ^{bc}	-0.93 ^{de}
11	8	15.67 ^{cd}	17.88 ^{ab}	2.21 ^{ab}
0	16	17.29 ^{ab}	16.20 ^{cd}	-1.09 ^{de}
5.5	16	16.24 ^{bc}	16.55 ^{cd}	0.30 ^{cde}
11	16	16.66 ^{abc}	17.78 ^{ab}	1.12 ^{bc}
0	24	16.94 ^{abc}	15.58 ^d	-1.36 ^e
5.5	24	15.66 ^{cd}	17.05 ^{abc}	1.40 ^{bc}
11	24	14.62 ^d	17.96 ^{ab}	3.33 ^a
		EE±0.175*	EE±0.128*	EE ± 0.140*

^{abcde} Medias con diferentes superíndice en la misma columna difieren a P<0.05 (Tukey 1980)

* P<0.05

Cuadro 9. Efecto de niveles de Vitafert y melaza en el contenido de Materia Orgánica de la pollinaza fermentada en estado sólido

Nivel de Vitafert, %	Nivel de Melaza, %	0 Horas Materia Orgánica, %	24 Horas Materia Orgánica, %	Diferencias
0	8	82.28 ^{cd}	81.85 ^d	-0.43 ^{bc}
5.5	8	82.16 ^d	83.08 ^{bc}	0.93 ^{ab}
11	8	84.33 ^{ab}	82.12 ^{cd}	-2.21 ^{de}
0	16	82.71 ^{cd}	83.80 ^{ab}	1.09 ^{ab}
5.5	16	83.76 ^{bc}	83.45 ^{ab}	-0.30 ^{abc}
11	16	83.34 ^{bcd}	82.22 ^{cd}	-1.12 ^{cd}
0	24	83.06 ^{bcd}	84.42 ^a	1.36 ^a
5.5	24	84.34 ^{ab}	82.95 ^{bcd}	-1.40 ^{cd}
11	24	85.38 ^a	82.04 ^{cd}	-3.33 ^e
		EE±0.175*	EE±0.128*	EE ± 0.140*

^{abcde} Medias con diferentes superíndice en la misma columna difieren a P<0.05 (Tukey 1980)

* P<0.05

Cuadro 10. Efecto de niveles de Vitafert y melaza en el contenido Celular de la pollinaza fermentada en estado sólido

Nivel de Vitafert, %	Nivel de Melaza, %	0 Horas Contenido Celular, %	24 Horas Contenido Celular, %	Diferencias
0	8	49.42 ^a	41.38 ^f	-8.04 ^g
5.5	8	42.77 ^d	42.33 ^e	-0.44 ^c
11	8	43.58 ^{cd}	46.60 ^b	3.02 ^b
0	16	45.03 ^b	40.46 ^g	-4.57 ^e
5.5	16	43.67 ^c	43.92 ^d	0.25 ^c
11	16	39.73 ^e	48.92 ^a	9.19 ^a
0	24	43.06 ^{cd}	37.52 ^h	-5.54 ^f
5.5	24	43.73 ^c	42.13 ^e	-1.60 ^d
11	24	42.82 ^d	45.70 ^c	2.87 ^b
		EE±0.092***	EE±0.067***	EE±0.070***

^{abcdefg} Medias con diferentes superíndice en la misma columna difieren a P<0.05 (Tukey 1980)

*** P<0.001

Referente a Fibra Detergente Neutra encontró interacción ($P < 0.001$) para esta variable. El mayor incremento en FDN se encontró con 0 % de Vitafert y 8 % de Melaza, sin embargo, con el tratamiento 11 % de Vitafert y 16 % de melaza hubo menor incremento en esta variable (cuadro 11).

Con respecto a la Hemicelulosa se encontró interacción ($P < 0.001$). El mayor incremento se encontró con 0% de Vitafert y 8% de melaza, sin embargo, con los tratamientos 5.5 % de Vitafert y 24 % de melaza, 5.5 % de Vitafert y 16 % de melaza y 11 % de Vitafert y 8 % de melaza hubo menor incremento en esta variable, sin diferencia entre 5.5 % de Vitafert y 24 % de melaza y 5.5 % de Vitafert y 16 % de melaza este último es diferente ($P < 0.001$) al tratamiento 11 % de Vitafert y 8 % de melaza (cuadro 12)

Con relación a la FDA encontró interacción ($P < 0.001$). El mayor incremento se encontró con 0 y 5.5 % de Vitafert y 24 % de melaza, sin embargo, con los tratamientos 0% de Vitafert y 8 % de melaza, 11 % de Vitafert y 24 % de melaza y 11 % de Vitafert y 16 % de melaza hubo menor incremento en esta variable, sin diferencia entre 0% de Vitafert y 8 % de melaza, 11 % de Vitafert y 24 % de melaza estos son diferentes ($P < 0.001$) al tratamiento 11 % de Vitafert y 16 % de melaza (cuadro 13)

Con respecto al contenido de PC se encontró interacción ($P < 0.001$). El mayor incremento en esta variable se encontró con 5.5 y 11 % de Vitafert y 24 % de melaza, sin diferencias entre ellos. Sin embargo, con los tratamientos 0% de Vitafert y 8 % de malaza y 0% de Vitafert y 24 % de malaza hubo menor incremento en esta variable (cuadro 14).

En relación al NNP * 6.25 encontró interacción ($P < 0.01$). El mayor incremento en el NNP * 6.25 se encontró con 11 % de Vitafert y 8 % de Melaza, sin embargo, con los tratamientos 0 y 5.5 % de Vitafert y 24 % de melaza y 0 % de Vitafert y 16 % de melaza hubo menor incremento en esta variable, sin diferencia entre 0 y 5.5 % de Vitafert y 24 % melaza, estos son diferente ($P < 0.001$) al tratamiento 0% de Vitafert y 16 % de melaza (cuadro 15)

Cuadro 11. Efecto de niveles de Vitafert y melaza en el contenido de Fibra Detergente Neutra de la pollinaza fermentada en estado sólido

Nivel de Vitafert, %	Nivel de Melaza, %	0 Horas Fibra Detergente Neutra, %	24 Horas Fibra Detergente Neutra, %	Diferencias
0	8	50.58 ^e	58.62 ^c	8.04 ^a
5.5	8	57.23 ^b	57.67 ^d	0.44 ^e
11	8	56.42 ^{bc}	53.40 ^g	-3.02 ^f
0	16	54.97 ^d	59.54 ^b	4.57 ^c
5.5	16	56.33 ^c	56.08 ^e	-0.25 ^e
11	16	60.27 ^a	51.08 ^h	-9.19 ^g
0	24	56.94 ^{bc}	62.48 ^a	5.54 ^b
5.5	24	56.27 ^c	57.87 ^d	1.60 ^d
11	24	57.18 ^b	54.30 ^f	-2.87 ^f
		EE±0.092***	EE±0.067***	EE ± 0.070***

^{abcdelg} Medias con diferentes superíndice en la misma columna difieren a P<0.05 (Tukey 1980)

*** P<0.001

Cuadro 12. Efecto de niveles de Vitafert y melaza en el contenido de Hemicelulosa de la pollinaza fermentada en estado sólido

Nivel de Vitafert, %	Nivel de Melaza, %	0 Horas Hemicelulosa, %	24 Horas Hemicelulosa, %	Diferencia
0	8	34.45 ^h	43.22 ^g	8.77 ^a
5.5	8	45.12 ^f	42.97 ^g	-2.15 ^{de}
11	8	46.01 ^e	42.67 ^g	-3.34 ^f
0	16	42.53 ^g	45.37 ^d	2.83 ^b
5.5	16	47.18 ^d	44.75 ^e	-2.43 ^e
11	16	48.02 ^c	43.84 ^f	-4.17 ^g
0	24	49.68 ^b	51.20 ^a	1.52 ^c
5.5	24	51.07 ^a	48.29 ^c	-2.77 ^{ef}
11	24	51.43 ^a	49.86 ^b	-1.56 ^d
		EE ± 0.072***	EE ± 0.063***	EE ± 0.092***

^{abcdelg} Medias con diferentes superíndice en la misma columna difieren a P<0.05 (Tukey 1980)

*** P<0.001

Cuadro 13. Efecto de niveles de Vitafert y melaza en el contenido de Fibra Detergente Ácida de la pollinaza fermentada en estado sólido

Nivel de Vitafert, %	Nivel de Melaza, %	0 Horas Fibra Detergente Ácida, %	24 Horas Fibra Detergente Ácida, %	Diferencia
0	8	16.12 ^a	15.39 ^a	-0.72 ^e
5.5	8	12.10 ^b	14.69 ^b	2.59 ^b
11	8	10.40 ^c	10.72 ^e	0.32 ^d
0	16	9.14 ^b	14.16 ^c	1.73 ^c
5.5	16	16.73 ^d	11.32 ^d	2.18 ^{bc}
11	16	12.24 ^b	7.23 ^g	-5.01 ^f
0	24	7.25 ^e	11.27 ^d	4.01 ^a
5.5	24	5.19 ^f	9.57 ^f	4.37 ^a
11	24	5.74 ^f	4.43 ^h	-1.30 ^e
		EE ± 0.062***	EE ± 0.054***	EE± 0.076***

^{abcdel} Medias con diferentes superíndice en la misma columna difieren a P<0.05 (Tukey 1980)
 *** P<0.001

Cuadro 14. Efecto de niveles de Vitafert y melaza en el contenido de Proteína Cruda de la pollinaza fermentada en estado sólido

Nivel de Vitafert, %	Nivel de Melaza, %	0 Horas Proteína Cruda, %	24 Horas Proteína Cruda, %	Diferencia
0	8	32.29 ^a	30.13 ^d	-2.16 ^f
5.5	8	30.48 ^b	30.66 ^b	0.18 ^d
11	8	30.77 ^b	30.59 ^{bc}	-0.18 ^d
0	16	26.64 ^d	27.93 ^e	1.29 ^c
5.5	16	27.88 ^c	30.19 ^{cd}	2.31 ^b
11	16	28.25 ^c	30.95 ^{ab}	2.70 ^b
0	24	26.97 ^d	25.91 ^f	-1.06 ^e
5.5	24	26.07 ^e	30.05 ^d	3.97 ^a
11	24	26.74 ^d	31.08 ^a	4.34 ^a
		EE ± 0.041***	EE ± 0.046***	EE± 0.051***

^{abcdel} Medias con diferentes superíndice en la misma columna difieren a P<0.05 (Tukey 1980)
 *** P<0.001

Cuadro 15. Efecto de niveles de Vitafert y melaza en el contenido de Nitrógeno No Proteínico * 6.25 de la pollinaza fermentada en estado sólido

Nivel de Vitafert, %	Nivel de Melaza, %	0 Horas Nitrógeno	24 Horas	Diferencia
		No Proteínico *6.25, %	Nitrógeno No Proteínico *6.25, %	
0	8	12.22 ^a	11.12 ^{bc}	-1.09 ^{de}
5.5	8	11.33 ^{cd}	10.56 ^{de}	-0.77 ^{cd}
11	8	11.80 ^b	12.59 ^a	0.79 ^a
0	16	11.47 ^c	10.18 ^e	-1.29 ^e
5.5	16	11.15 ^d	10.79 ^{cd}	-0.36 ^{bc}
11	16	11.33 ^{cd}	11.24 ^b	-0.08 ^b
0	24	10.89 ^e	8.89 ^g	-1.99 ^f
5.5	24	11.42 ^c	9.59 ^f	-1.82 ^f
11	24	10.82 ^e	10.52 ^{de}	-0.30 ^b
		EE ± 0.028***	EE ± 0.044***	EE ± 0.049**

^{abc} Medias con diferentes superíndice en la misma columna difieren a P<0.05 (Tukey 1980)

***P<0.001, ** P<0.01

Con relación a la PV se encontró interacción (P<0.001). El mayor incremento para esta variable se encontró con 5.5 % de Vitafert y 24 % de melaza, sin embargo, con los tratamientos 0 % de Vitafert y 8 % de melaza y 11 % de Vitafert y 8 % de melaza hubo menor incremento en esta variable (cuadro 16)

4.1.2. Parámetros Fermentativos

En relación a los contenidos de Amoniaco se encontró interacción (P<0.001). El mayor contenido de Amoniaco se encontró con 11 % de Vitafert y 8 % de Melaza y 11 % de Vitafert y 16 % de melaza, sin embargo en los tratamientos con 0% de Vitafert y 8 % de melaza hubo el menor contenido de amoniaco este diferente a los demás tratamientos estudiados (cuadro 17).

Cuadro 16. Efecto de niveles de Vitafert y melaza en el contenido de Proteína Verdadera de la pollinaza fermentada en estado sólido

Nivel de Vitafert, %	Nivel de Melaza, %	0 Horas Proteína Verdadera, %	24 Horas Proteína Verdadera, %	Diferencia
0	8	20.06 ^a	18.72 ^e	-1.34 ^f
5.5	8	19.21 ^b	20.10 ^{bc}	0.88 ^d
11	8	19.16 ^b	18.37 ^e	-0.78 ^e
0	16	15.17 ^f	17.74 ^f	2.57 ^c
5.5	16	16.73 ^d	19.40 ^d	2.66 ^c
11	16	17.11 ^c	19.71 ^{cd}	2.59 ^c
0	24	16.08 ^e	17.01 ^g	0.92 ^d
5.5	24	14.65 ^g	20.45 ^{ab}	5.80 ^a
11	24	15.92 ^e	20.56 ^a	4.63 ^b
		EE ± 0.040***	EE ± 0.046***	EE ± 0.055***

^{abcdel} Medias con diferentes superíndice en la misma difieren a P<0.05 (Tukey 1980)

*** P<0.001

Cuadro 17. Efecto de niveles de Vitafert y melaza en el contenido de Amoniaco de la pollinaza fermentada en estado sólido.

Nivel de Vitafert, %	Nivel de Melaza, %	0 Horas NH3, %	24 Horas NH3, %	Diferencia
0	8	4.06 ^f	6.48 ^h	2.42 ^e
5.5	8	8.42 ^d	14.37 ^b	5.95 ^a
11	8	9.17 ^c	14.43 ^b	5.26 ^b
0	16	10.68 ^a	7.93 ^g	-2.75 ^g
5.5	16	7.89 ^e	13.05 ^c	5.16 ^{bc}
11	16	10.29 ^b	15.24 ^a	4.95 ^c
0	24	10.83 ^a	8.22 ^f	-2.61 ^g
5.5	24	10.06 ^b	10.31 ^e	0.26 ^f
11	24	8.52 ^d	12.68 ^d	4.17 ^d
		EE ±0.027***	EE ±0.019***	EE±0.02***

^{abcdelg} Medias con diferentes superíndice en la misma columna difieren a P<0.05 (Tukey 1980).

*** P<0.001

Se encontró interacción significativa de ($P < 0.001$) en los contenidos de Ac. Láctico. El tratamiento con 11 % de Vitafert y 16 % de melaza y 11 % Vitafert y 24 % de melaza mostraron el mayor contenido de Ac. Láctico, sin embargo los tratamientos 0 % de Vitafert y 16 % de melaza, y 0 % de Vitafert y 24 % de melaza se encontraron los contenidos más bajos de Ac. Láctico estos son similares entre sí pero diferentes al tratamiento 5.5 % de Vitafert y 16 % de melaza (cuadro 18)

En relación al pH el más bajo se obtuvo en los tratamientos con 11 % de Vitafert y 24 % de melaza, 5.5 % de Vitafert y 24 % de melaza sin embargo son diferentes entre sí con una probabilidad significativa de ($P < 0.001$) mientras que el tratamiento con 11 % de Vitafert y 8 % de melaza mostro el pH más alto a las 24 horas (cuadro 19)

Cuadro 18. Efecto de niveles de Vitafert y melaza en el contenido de Acido Láctico de la pollinaza fermentada en estado sólido.

Nivel de Vitafert, %	Nivel de Melaza, %	0 Horas A. Láctico, %	24 Horas A. Láctico, %	Diferencia
0	8	0.94 ^d	1.30 ^f	0.36 ^a
5.5	8	3.21 ^c	2.17 ^{de}	-1.04 ^d
11	8	4.70 ^b	3.74 ^c	-0.96 ^d
0	16	1.10 ^d	1.09 ^g	-0.01 ^b
5.5	16	6.00 ^a	2.05 ^e	-3.95 ^e
11	16	3.54 ^c	4.82 ^a	1.28 ^a
0	24	0.99 ^d	1.12 ^g	0.12 ^b
5.5	24	3.32 ^c	2.28 ^d	-1.04 ^d
11	24	4.58 ^b	4.11 ^b	-0.47 ^c
		EE ±0.059*	EE ±0.018***	EE ± 0.14**

^{abcdefg} Medias con diferentes superíndice en la misma columna difieren a $P < 0.05$ (Tukey 1980).

*** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$

Cuadro 19. Efecto de niveles de Vitafert y melaza en el indicador de pH de la pollinaza fermentada en estado sólido.

Nivel de Vitafert, %	Nivel de Melaza, %	0 Horas pH, %	24 Horas pH, %	Diferencia
0	8	7.9 ^a	6.22 ^b	-1.68 ^g
5.5	8	7.28 ^d	5.94 ^e	-1.34 ^f
11	8	6.8 ^f	6.32 ^a	-0.47 ^c
0	16	7.78 ^b	5.91 ^e	-1.87 ^h
5.5	16	7.07 ^e	6.04 ^{cd}	-1.03 ^e
11	16	6.5 ^g	6.08 ^c	-0.41 ^b
0	24	7.7 ^c	6.01 ^d	-1.69 ^g
5.5	24	6.81 ^f	5.9 ^e	-0.90 ^d
11	24	5.77 ^h	5.84 ^f	0.06 ^a
		EE ±0.005***	EE ±0.005***	EE ±0.004***

^{abcdehg} Medias con diferentes superíndice en la misma columna difieren a P<0.05 (Tukey 1980).

*** P<0.001

4.1.3.- Parámetros Microbiológico

Se encontró interacción (P<0.001) en los conteos de bacterias lácticas en el medio Agar Man, Rogosa y Sharpe (MRS). El tratamiento con 11 % de Vitafert y 16 % de melaza mostro el mayor contenido de bacterias lácticos, en relación a los otros tratamientos estudiados que no se encontró diferencias entre ellos (cuadro 20).

Con relación al conteo de la bacterias aeróbicas en el medio Agar Cuenta Estándar (ACE), se encontró efecto para los niveles de Vitafert y melaza estudiados, el 11 % de Vitafert disminuye las bacteria aeróbicas, así mismo, el 24 % de melaza (cuadro 21).

Cuadro 20. Efecto de niveles de Vitafert y Melaza en el crecimiento de bacterias lácticas (ufc/g) en la pollinaza fermentada aeróbica.

Nivel de Vitafert, %	Nivel de Melaza, %	24 Horas Bacterias Lácticas (UFC/g x 10 ⁸)
0	16	8.83 ^b
11	16	9.12 ^a
0	24	8.25 ^b
11	24	6.77 ^b
		EE ± 0.685 ***

^{ab} Medias con diferentes superíndice en la misma columna difieren a P<0.05 (Tukey 1980).

Datos transformados según log₁₀ x

*** P<0.001

Cuadro 21. Efecto de niveles de Vitafert y melaza en el conteo de UFC en las bacterias aeróbicas en la pollinaza fermentada en estado sólido.

Niveles en %	24 Horas Bacterias Aeróbicas (UFC/g x 10 ⁸)
Vitafert	
0	11.22 ^a
11	10.97 ^b
EE ±	0.218***
Melaza	
16	11.40 ^b
24	10.79 ^a
EE ±	0.218 **

^{ab} Medias con diferentes superíndice en las mismas filas difieren a P<0.05 (Tukey 1980).

Datos transformados según log₁₀ x

** P<0.01, ***P<0.001

El número de Ooquiste disminuyo por efecto del proceso de fermentación de 24 h, sin embargo con la adición del 11 % del Vitafert se encontró el menor numero de Ooquiste, la menor cantidad de Ooquiste observada a la hora 0 de fermentación en relación a la pollinaza sin tratar, pudiera deberse a la disgregación de la pollinaza de los tratamientos estudiados por la inclusión de Vitafert y Melaza (cuadro 22).

Cuadro 22. Efecto del Vitafert y Melaza en Conteo de Ooquiste en heces (g de MS) a las 0 y 24 hora de fermentación en estado sólido.

Nivel de Vitafert, %	Nivel de Melaza, %	0 Horas N° Ooquiste (g de MS)	24 Horas N° Ooquiste (g de MS)
0	16	845	589
11	16	701	28
Testigo		N° de Ooquiste	pH
Pollinaza Sin Tratar		979	7.99

V. DISCUSIÓN

La disminución de la MS en los tratamientos con 11 % de Vitafert y 16 % de Melaza, 5.5 % de Vitafert y 24 % de Melaza y 11 % de Vitafert y 24 % de Melaza, durante el proceso de FES, pudiera deberse a la fermentación de cierta cantidad de azúcares (sacarosa, glucosa, fructosa), que predominan en la Melaza adicionada y a la hidrólisis de la urea de la pollinaza por los microorganismos que se desarrollan en el sistema durante sus procesos metabólicos para síntesis celular, oxidándolos a ácidos grasos, CO₂ y agua, como productos finales. Parte del agua producida durante la oxidación de las moléculas, pudiera evaporarse por el calor metabólico que se genera durante el proceso de FES (Pandey *et al.*, 2001 y Mitchell *et al.*, 2002).

En otro estudio Ramos (2005, 2006, 2007), al comparar la MS inicial y final en la fermentación con diferentes alimentos y diferentes niveles de Vitafert, encontró resultados similares a estos donde la MS disminuyó durante las 24 h. Por otra parte Rodríguez (2005), en otro tipo de alimento, boniato (Sacchaboniato), encontró que la MS disminuyó conforme se prolongó el tiempo de fermentación. Así también (Elías *et al.*, 1990) encontró disminución de la MS en el tiempo de fermentación (0 y 24) horas, en la obtención de la Saccharina.

El descenso del pH observado a las 24 h de fermentación en los tratamientos estudiados, pudiera deberse a los ácidos orgánicos producidos por los microorganismos durante la fermentación y al consumo de iones de amonio (Rodríguez *et al.*, 2001 a y b; Elías y Herrera, 2008), 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). De acuerdo a Pelczar y Reid (1958), el descenso del pH según el tiempo de fermentación, puede ser consecuencia de la producción de bacterias lácticas y los ácidos grasos de cadenas cortas (AGCC), que inhiben o eliminan los microorganismos que crecen a pH más neutros y en los tratamientos estudiados se observó que a las 24 h con el 11 % de Vitafert y 16 % de Melaza tiene mayor contenido de bacterias lácticas en relación a los demás tratamientos con un $9.12 \text{ UFC/g} \times 10^8$.

De acuerdo a Fuller (1992), los microorganismos provenientes de la pollinaza, por lo general, son anaerobios, anaerobios facultativos y microaerofílicos. Acorde al estudio realizado por Stanier *et al.* (1992), al incorporar oxígeno al medio de fermentación mediante la agitación a un sustrato con pollinaza, el crecimiento de estos microorganismos como la *Escherichia coli* puede reprimirse. Esto explicaría la disminución del número de Ooquiste con 28 heces (g de MS) a las 24 h durante la fermentación aeróbica en relación a las 0 h.

La disminución de Ooquiste observada, cuando se le aplica el Vitafert en la pollinaza fermentada, pudiera deberse a la mayor población de lactobacilos (cuadro 20) y la mayor producción de ácido láctico (cuadro 18). Aunque el pH con el tratamiento sin Vitafert son similares a las 24 h de fermentación, a la 0 h el pH es mas bajo en el tratamiento con Vitafert y la caída del pH podrían darse en la ultima etapa de fermentación. De acuerdo a Hazan *et al.* y Schüller *et al.* (2004) que el ácido láctico, al igual que el ácido acético, son ácidos débiles y pueden ser tóxicos para los microorganismos, lo cual dependerá de los valores de pH en el sistema, ya que a bajo pH se encuentran en forma no disociada y pueden penetrar a la célula por difusión pasiva. En el citoplasma del microorganismo se disocian debido al pH más neutro y se liberan los protones, bajando el pH del citoplasma, lo cual interfiere con algunos senderos metabólicos.

El incremento en el contenido de PC en todos los tratamientos estudiados durante el proceso de fermentación aeróbica, pudiera estar relacionada con la disminución del pH (cuadro 19), lo que pudo haber ocasionado que el NH_3 presente en la pollinaza (Panisello *et al.*, 2000) se transformara a NH_4 el cual, en esta forma, no es volátil y se retuvo en el sistema, como efectivamente se muestra en el cuadro 21. Estos resultados coinciden con los reportados por Ramos (2005), el cual realizó 2 experimentos donde adicionó Vitafert a la FES de la caña de azúcar con 2 y 0.4% de urea; en el primer experimento con 2% de urea y el 5% de Vitafert disminuyó el pH y la PC se incrementó, en el segundo experimento con 0.4% de urea y el 2.5% de Vitafert también disminuyó el pH y la PC se incrementó. Con respecto a los tratamientos, se observó que el que tuvo 0% de Vitafert disminuyó su contenido de

PC con el nivel mayor de melaza y esto se pudiera deberse a que este tratamiento tuvo los mayores valores de pH.

El incremento de la PV a las 24 horas, coincide con la disminución de la MO ya que posiblemente los carbohidratos presentes en esta fracción, son utilizados por los microorganismos para síntesis de proteína microbiana al respecto según Pandey *et al.*, (2001) la PV puede ser una vía indirecta de medir el crecimiento microbiano durante el proceso FES. Posiblemente el NH_3 de la pollinaza se transformó a NH_4 como fue explicado anteriormente y la enzima L-glutamato deshidrogenasa (L-GDH) lo pudo incorporar a la célula microbiana como sillares de aminoácidos (Metges y Loh, 2003) usando como fuente de energía los carbohidratos disponible de la melaza.

Elías *et al.*, (1990), Ramos *et al.*, (2006) y Becerra *et al.*, (2008) aunque han utilizado otros sustratos han encontrado incremento en la PV, relacionándolo al crecimiento de microorganismos que se desarrollan durante el proceso de FES.

Con relación al incremento en el contenido de las fracciones fibrosas (FDN y FDA) y hemicelulosa de este estudio, pudiera deberse a una concentración del producto final ya que los microorganismos que se establecen en el sistema utilizan los azúcares de la melaza que se encuentran en el contenido celular, de acuerdo a Ramos (2005), reportando disminución en los valores de pared celular cuando adicionó melaza en la FES de la caña de azúcar y lo atribuyó al efecto de disgregación de la miel final.

En cuanto a los contenidos de ácido láctico este disminuyó a las 24 horas, esto podría deberse a que fue poco el tiempo de fermentación que se le dio, por otro lado se muestra un mayor contenido en el día cero esto podría estar relacionado a que se le adiciono Vitafert, producto biológico compuesto de bacterias, levaduras y sus metabolitos, capaces de producir cantidades apreciables de ácidos orgánicos de cadena corta como láctico, acético, propiónico, succínico y pirúvico, vitaminas y enzimas (Elías y Herrera, 2008); considerando que antes de ser inoculado al alimento se encontraba en una fase exponencial de crecimientos de ácido láctico y otros ácidos orgánicos, que son los productos finales del proceso catabólico desarrollado por microorganismos como los *Lactobacillus* (van Winsen *et al.*, 2001).

Sin embargo, en los tratamientos se muestra una tendencia de mayor concentración de ácido láctico a medida que se incrementan los niveles de Vitafert. Cabe señalar que Rodríguez *et al.*, (2004), al estudiar los efectos de los niveles de nitrógeno ureico en la síntesis proteica de mezclas de caña y boniato, durante la FES, reporto disminución de ácido láctico alcanzando su valor máximo a las 72hrs y que posteriormente volvió a disminuir a los valores iniciales, a medida que ascendió el nivel de nitrógeno.

VI. CONCLUSIONES

En los tratamientos con los mayores niveles de melaza y vitafert hay una mayor retención de la PC en el sistema.

Durante el proceso de fermentación a las 24 h, el tratamiento con el 5.5 % de Vitafer y 24 % de Melaza, incrementa la PV en 5.8 unidades percentiles.

En todos los tratamientos estudiados el proceso de fermentación disminuye el pH. El alimento o el tratamiento con menor pH (5.84) es el que se le incluyo el 11 % de Vitafert y 24 % de Melaza.

La mayor población de bacterias lácticas se encontró en el tratamiento con 11 % de Vitafert y 16 % de Melaza. Con el 11 % de Vitafert disminuyo las bacterias totales, así mismo con la inclusión del 24 % de melaza durante la fermentación.

El proceso de fermentación de 24 h disminuyo el número de Ooquiste, pero este efecto es mayor en el tratamiento donde se incluye Vitafert.

VII. RECOMENDACIONES

Se recomienda aplicarle 5.5 % de Vitafer y el 24 % de melaza BS, con una fermentación en estado sólido a las 24 h. para obtener mayor Proteína Verdadera.

Se recomienda, profundizar en este tipo de investigación para obtener un producto enriquecido sin microorganismos patógenos para los animales rumiantes.

VIII. REFERENCIA

- AOAC. 1995. Official Methods of Analysis. 16th Ed. Off. Agric. Chem., Washington, D.C., U.S.A.
- AOAC. 1980. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists. Washington, D.C.
- 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
- Betancourt Maria, M. Martínez de Acurero, T. Clavero, R. Razz, S. Pietrosemoli y O. Araujo-Febres. 2003b. Efecto de la melaza, ácido fórmico y tiempo de fermentación sobre el contenido de proteína cruda y nitrógeno amoniacal en silaje de *Leucaena leucocephala*. Zootecnia Trop., 21(3):289-300. 2003.
- Betancourt María, Ing. Agr, Msc.; Caraballo Alfredo, Ing. Agr, Msc 2005. Henificación y ensilaje: aspectos operativos y tecnológicos. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Zulia. m_betancourt@inia.gov.ve, acaraballo@inia.gov.ve.
- Bernstein, J. 1983. Análisis de alimento. Eds. Wintra, A.L. y Winto, K.B. Tomo I. Ed. Pueblo y Educación. 84 p.
- Brandi-Dohrn, F. M., Dick, R. P., Hess, M., Kauffman, S. M., Hemphill, D. D. JR. & Selker, J. S. (1997): Nitrate leaching under a cereal rye cover crop. J. Environ. Qual., 26: 181 – 188.
- Bulut S.; Elibol M.; Ozer D. 2004. Effect of different carbon sources on l (+) –lactic acid production by *Rhizopus oryzae*. Biochemical Engineering Journal 21: 33–37.
- Calderón, A.J.O. 2005. Procesos biotecnológicos en residuales avícolas y sus efectos sobre el valor nutritivo y el comportamiento animal. Tesis presentada en opción al grado científico de Dr. En ciencias veterinaria. La Haban Cuba. Pp.122.

- 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
- Calderón Agüero Jesús O. y Elías Iglesia Arabel., 2006. Contribución a la Suplementación Ovina con Pollinaza Fermentada (Vitafert) y cuatro niveles de Melaza. Instituto de Ciencia Animal (ICA). San José de la Lajas. Apt. 24. La Habana. Vol. VII, N° 10, Octubre/2006
- Canziani, PO & DM Mielinicki. 2007. Cambio climático y desarrollo limpio en Argentina (1). Pp. 63-67 en: CAENA (ed.). I congreso Argentino de Nutrición Animal, Buenos Aires, Argentina.
- Carey J. B., R. E. Lacey y S. Mukhtar. 2004. A review of literature concerning odors, ammonia, and dust from broiler production facilities: 2. Flock and house management factors. J. Appl. Poult. Res., 13:509-513.
- Castellanos RAF, G. Cantón CJ, Murguía OML, Moguel OY. Ventajas y precauciones en el uso de la pollinaza como alimento para rumiantes. [Folleto divulgativo para productores]. 1999. INIFAP-SAGAR y Fundación Yucatán Produce, A.C. Mérida, Yuc. México.
- Castellanos Ruelas Arturo F, Murguía Olmedo María de la Luz y Moguel Ordoñez Yolanda B., 2000. Efecto del deshidratado sobre el valor nutritivo de la pollinaza y la presencia de microorganismos. Téc. Pecu. Méx. 2000;38(3) 219-230.
- Castellanos Ruelas Arturo F y Murguía Olmedo María de la L. 2002. Comportamiento de la contaminación microbiológica en alimentos balanceados para rumiantes elaborados con pollinaza. Rev Biomed 2002; 13:171-177.
- Castro, G. B., Bustos, V. G., Ramírez J, A. 2010. Aprovechamiento biotecnológico de la melaza de caña de azúcar para la producción de ácido láctico utilizando Lactobacillus Rhamnosus. Consultado: 09 de Marzo del 2010, 15:30 p.m. www.turevista.uat.edu.mx/.../Microsoft%20Word%20-%20RDU-10-Articulo%20de%20tesis%20_Brenda%20Argelia_-1%20_2_.pdf
- Church, C. D. 1988. El rumiante fisiología digestiva y nutrición Ed. Acriba. Zaragoza, España: 641 pp.

- Coma J. y Bonet J. 2004. Producción ganadera y contaminación ambiental. Xx curso de especialización fedna. Barcelona, 22 y 23 de Noviembre de 2004.
- Conway, E.J. 1957. Microanálisis and Volumetric Error. 4th. Ed. Crossly lock and Son Ltd. London.
- Del Pozo, P. P., Herrera, R. S. y García, M. 2002. Dinámica de los contenidos de carbohidratos y proteína bruta en el pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*) con la aplicación de nitrógeno y sin ella. Rev. Cubana Cienc. Agric. 36:275.
- Dougschies A, Najdrowski M. Eimeriosis in cattle: current understanding. Journal of Veterinary Medicine 2005; 52:417–27.
- Elías, A., Lezcano, O., Lezcano, P., Cordero, J. y Quintana, L. 1990. Reseña descriptiva sobre el desarrollo de una tecnología de enriquecimiento proteico de la caña de azúcar mediante fermentación en estado sólido (Saccharina). Rev. Cubana Cienc. Agric. 24:1.
- Elías, A. y Herrera, F. R. 2008. Producción de alimento para animales a través de procesos biotecnológicos sencillos con el empleo de Microorganismos Beneficiosos Activados (MEBA). Vitafert. Instituto de Ciencia Animal Habana Cuba. 82 p. en imprenta.
- Encarta, 2000. Enciclopedia Microsoft corporation. Director Editorial. Ramiro Sánchez Sanz
- Estrada, P. M. M. 2005. Manejo y procesamiento de la gallinaza. Revista Lasallista de Investigación, enero-junio, año/vol. 2, numero 001. Corporación Universitaria Lasallista. Antioquia, Colombia. Pp. 43-48.
- Fajardo y Sarmiento, 2007. Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. Pontificia Universidad Javeriana Facultad de Ciencias Básicas Microbiología Industrial BOGOTÁ, D.C. Agosto 2007.
- FAO, 1998. La fermentación en pequeña escala. En: Agricultura21. <<http://www.fao.org/ag/esp/revista/9812sp3.htm>> /Consultado: 7 de septiembre del 2005/.
- Figuroa, V. & Ly J. 1990. Alimentación porcina no convencional. GEPLACEA. PNUD. Serie Diversificación. C. México, México Forbes, J.M.] 986. The voluntary food intake oHarro animals. Butterworth Ed,. London, UKFordyce, G., Cooper, N.J., Kendall, LE., O'Leary, RM., Favery, 1. & De Favery, 1. 1996. Creepfeeding and

prepartum supplementation effects on growth and fertility of Brahman-crosscattle in dry tropics. *Aust. J. Exp. Agric.* 36:389

Fontenot, J.; Ayangbile, G.; Allen, V. 1996. Potential for recycling animal waste by feeding to reduce environmental contamination. In: *Nutrient Management of Food Animals to Enhance and Protect the Environment*. Ed. By E.T. Kornegay. Lewis Publishers. New York. EEUU. P. 199-217.

Fontenot, J. P. 1999. Nutrient Recycling: The North American Experience. *Review. J. Anim. Sci.* 12:642

Fuller, R. 1992. Problems and prospects. En: *Probiotics: The Scientific Basis* (Ed. Fuller, R.). Chapman & Hall, London, UK. p. 377

García, E. 1988. Modificación al sistema de clasificación climática de Köppen (para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana). Instituto de Geografía. UNAM. México, D. F.

García Yaneisy, Elías A. y Herrera F. R., 2005. Dinámica microbiana de la fermentación *in vitro* de las excretas de gallinas ponedoras *Instituto de Ciencia Animal, Apartado Postal 24, San José de las Lajas, La Habana. Revista Cubana de Ciencia Agrícola, Tomo 39, No. 1, 2005.*

Geros, H., Cassio, F. & Leao, C. 2000. Utilization and transport of acetic acid in *Dekkera anomala* and their implications on the survival of the yeast in acidic environments. *J Food Prot* 63, 96–101.

Hack-Ten-Broeke, M. J. D. De-Groot. W. J. M. & Dijkstra, J. P. (1996): Impact of excreted nitrogen by grazing cattle on nitrate leaching. *Soil use Manage.*, 12: 190 – 198.

Haug Anita, R.B. Williams, & S. Larsen, 2005. Counting coccidial oocysts in chicken faeces: A comparative study of a standard McMaster technique and a new rapid method. received in revised form 17 November 2005; accepted 24 November 2005. *Veterinary Parasitology* 136 (2006) 233–242.

Hazan, R., Levine, A., & Abeliovich, H. 2004. Benzoic acid, a weak organic acid food preservative, exerts specific effects on intracellular membrane trafficking pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology.* 70 (8): 4449-4457.

Hernández, J. 2002. Boletín informativo sobre el uso de subproductos avícolas. Costa Rica. Disponible en: hernandezj@rootnet.go.cr.

- Hyden, J. M. 2001. Control de Salmonellas y E. coli en avicultura: Alternativas terapéuticas. Rev. Tecnología Avícola en Latinoamérica, 14: 44.
- Ibáñez Andrés, Castillo, C. J. A, Peducassé, C. A y Vaca, R. J. L. 2006. Situación de la oferta nutritiva de gallinaza y pollinaza procesadas de granjas avícolas adyacentes a la Ciudad de Santa Cruz de la Sierra, Bolivia.
- Jacob, J.; Kunkle, W.; Tervola, R.; Miles R.; MATHER, F. 1997. Broiler Litter, Part 1: A feed ingredient for ruminant. University of Florida. Institute of Food Animal and Agricultural Science. Florida Cooperative Extension Service, PS-13, 1-5 p.
- Jay, J. M. 1994. Conservación de alimentos con agentes químicos. Antagonismo láctico. En: Microbiología moderna de los alimentos. Acribia. SA. Esp.5: 328-329.
- Jolley, MSc, William R. PhD. and Bardsley, MSc, Katherine D., 2006. Ruminant Coccidiosis. Vet Clin Food Anim., 22 (2006) 613–621.
- Julián R., Ramos S. 2007 Fermentación en estado sólido para la producción de alimento animal tecnología química Vol. XXVII, No. 3, 2007.
- Kwak, W. 1999. Effects of moisture levels on the fermentation characteristics of high moisture broiler litter added with different water absorbents. Kor. J. Anim. Sci. 41:537
- Latala A, Krzysko-Lupicka T, Grata K, Nabrdalik M. Microbiological contamination of poultry manure from poultry farms. Medycyna Weterynaryjna 1999; 55: 451-454.
- Leeson, S. y Summers J. 2000. Nutrición Aviar Comercial. Editorial Le`Print Club Express Ltda. Bogotá, Colombia. 43-45p.
- Levine, N. D. 1985. Veterinary protozoology. Ames (IA): Iowa State University Press; 1985.
- Leyla Ríos de Álvarez, Josefina de Combellas y Ramón Álvarez Z. 2005. Uso de excretas de aves en la alimentación de ovinos. Zootecnia Tropical, Vol. 23, No. 2, 2005, pp. 183-210
- Ley Federal de Sanidad Animal., 2007. Nueva Ley publicada en el Diario Oficial de la Federación el 25 de julio de 2007.
- Madigan M.T., Martinko J.M. y Parker J. (2004). Brook, Biología de los Microorganismos. Pearson Prentice Hall. Madrid. 1096 pp.

- Martínez-Ávalos AMM, Mendoza-Martínez GD, González-Muñoz S, Gómez-Vázquez A, Estrada-Botello M, De la Cruz-Lázaro E, Cruz-Hernández A, Brito-Manzano NP, Pinos-Rodríguez JM. 2008. *Evaluación in vitro de un ensilado de estiércol, rastrojo de maíz y melaza*. 24(3):247-250,2008.
- Marshall, W. A. 2000. Contribución al estudio de la ceba ovina estabulada sobre la base de heno y suplemento proteico con harina de soya y gallinaza. Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Veterinarias. Inst. Cienc. Anim. La Habana.
- Mayor Maldonado Juan. FENAPI, FONAV, Ministerio del Medio Ambiente. Revista. Guía Ambiental Para El Sector Avícola. Edición 2000, Págs. 10- 20- 26- 29- 33- 37- 44- 51- 60- 65.
- Méndez Novelo, R, Castillo Borges, E., Vázquez Borges, E., Briceño Pérez, O., Coronado Peraza, V., Pat Canul, R. y Garrido Vivas, P. 2009. Estimación del potencial contaminante de las granjas porcinas y avícolas del estado de Yucatán. Ingeniería 13-2 (2009) 13-21. *Fecha de recepción: septiembre de 2007 – Mayo de 2009*.
- Metges. C. C y 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. 579 – 592.
- Meyreles, L., Pound, B. y Preston, P.T. 1982. Uso de la leucaena o cogollo de caña como fuente de forraje en dietas de melaza/urea, suplementadas con gallinaza y/o afrecho de trigo. Prod. Anim. Trop. 7:98-103.
- McCullough, H. 1967. The determination of ammonia in whole blood by direct colorimetric method. Clin. Chem. 17:297-304.
- Ministerio de Agricultura y Ganadería y Ministerio de Salud., 2003. Reglamento sobre granjas avícolas. N° 31088-S, el 31 de marzo de 2003.
- 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.
- Moore PA, Daniel TC, Edwards DR, Miller DM. Evaluation of chemical amendments to reduce ammonia volatilization from poultry litter. Poultry Sci 1996; 75:315- 20.

- Morais, M. G., Tomich, T. R., Amorim Neto, J. R. P. & Gonçalves, L. C. 1999. Consumo voluntário e digestibilidade da silagem de milho associada ao esterco de ponedieras. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 51:115
- Nájera, H.F. 1990. Diseño de una estructura tipo para el control en el desalojo de los excesos de agua en los drenes del CEICADES-CP Tesis de licenciatura. UACH. Chapingo, México. 132 p.
- Ortiz, A. 2004. Evaluación de desechos de la industria cafetalera y azucarera como camas avícolas en Guantánamo y su aprovechamiento en la alimentación de ovinos. Tesis de Dr. Cienc. Vet. Instituto de Ciencia Animal. La Habana, Cuba.
- Pacheco A. J. Sauri, Ma. Rosa R. Cabrera, Armando S. 1997. "Impacto de la Porcicultura en el Medio Ambiente". Ingeniería, Revista Académica de la Facultad de Ingeniería. Yucatán, México. Vol 1 No. 3 Pp. 53-58.
- 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.
- Panisello PJ, Rooney R, Quantick PC, Stanwell-Smith R. Application of foodborne disease outbreak data in the development and maintenance of HACCP systems. *International Journal of Food Microbiology.* 2000;59:221-234.
- Pedraza, R. M., Crespo, L. M., Ramos, L. B. & Martínez, S. J. 1995. Bagazo seco enriquecido (Bagarip). Alimento para animales obtenido por fermentación en estado sólido de la caña de azúcar. Seminario Científico Internacional por el XXX Aniversario del ICA. p.183
- Pelczar, M.J. Jr. & Reid, R.D. 1958. *Microbiology.* McGraw-Hill Book Company, Inc. New York, EUA. 64 p.
- Piad, R. 2001. Evaluación de la actividad probiótica de un hidrolizado enzimático de crema de destilería en pollitas de reemplazo de ponedoras. Tesis Dr. Cs. Instituto de Ciencia Animal. La Habana, Cuba
- 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 Doctor en Ciencias Veterinarias. Instituto de Ciencia Animal. La Habana Cuba.
- Ramos, J. A., Elías, A., 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 Cienc. Agric. 40 (1) 1-8.
- Ramos, J. A., Aranda I, E. M., y Elías, A., 2007. Patrones de fermentación ruminal y digestibilidad *in situ* en bovinos alimentados con forraje y suplementos a base de caña de azúcar fermentada en estado sólido. Producción animal Tropical en II Congreso Internacional de Producción Animal, La Habana, Cuba.
- Reglamento sobre el Manejo y Control de Gallinaza y Pollinaza N° 29145-MAG-S-MINAE. Actualizado el 31 de enero del 2001.
- Rejo, Taimara., Virginia, Masdeu., Isis, Acosta. 1997. Evaluación *in vitro* del aislamiento de *Escherichia coli* frente a diferentes antibióticos. Rev. cubana. Cienc. Avíc. 21:21.
- 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, 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, Z., Boucourt, R., Elías, A. & Madera, M. 2001b. Dinámica de fermentación de mezclas de caña (*Saccharum officinarum*) y boniato (*Ipomea batata Lam.*). Rev. Cubana Cienc. Agric. 35:147.
- 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.
- 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 de Master en ciencias veterinarias. Universidad Agraria de la Habana. Instituto de Ciencia Animal. Habana, Cuba. 25.
- Roe, A. J., Byne, C., McLaggan, D. & Booth, I. R. 2002. Inhibition of *Escherichia coli* growth by acetic acid: a problem with methionine biosynthesis and homocysteine toxicity. Microbiology. 148:2215.
- Ruiz Rodríguez Manuel M. C. J. 2005. Los Bloques Multinutricionales (BMN), justificación, función, elaboración y respuesta animal. Memoria del VI Seminario

de Producción de Ovinos en el Trópico. Universidad Autónoma Chapingo. Centro regional universitario del sureste. Km. 7, carretera Teapa – Rio. Vicente Guerrero, Teapa, Tab. rurm15@latinmail.com

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.

Sancho, R. 2004. VI de indicadores de ciencia y tecnología Iberoamericana/Interamericano. Buenos Aire, Argentina.

SIGMA. 1990. Lactate, quantitative, enzymatic determination of lactate in whole blood at 340 nm (Procedure No. 826-uv) USA. 31 p.

Sikkema, J., De Bont, J. A. & Poolman, B. 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol Rev* 59, 201–222.

Stanier, R., Ingraham, J., Wheelis, M. & Paintier, P. 1992. Métodos de la Microbiología. Ed. Reverté S.A. 3ra. Ed. España. vol. 2 p. 24

Schüller, C., Mamnun, Y. M., Mollapour, M., Krapf, G., Shuster, M., Bauer, B. E., Piper, P. W. & Kuchler, K. 2004. Global phenotypic analysis and transcriptional profiling defines the weak acid stress response regulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *MBC Online*. 15 (2):706-720.

Sosa R. E, Sansóres L. L, Zapata B. G, Ortega R. L. 2000. Composición botánica y valor nutricional de la dieta de bovinos en un área de vegetación secundaria en Quintana Roo. *Téc Pecu Méx* 2000;38(2):105-117.

Software R, 2009. Foundation for statistical computing, versión 2.10.1.

Tukey, J. 1953. *The Problem of Multiple Comparisons*. Unpublished manuscript. Princeton University.

Tuquia, S. M. & Tam, N.F.Y. 2000. Fate of nitrogen during composting of chicken litter. *Environmental Pollution*. 110:535

Tesa Panisello Monjo. 2005. La patología y el medio ambiente en las granjas de Broilers. Jornadas profesionales de avicultura de carne 2005. Valladolid, 25 – 27 de abril.

Tobías Carlos y Vargas Emilio. 2000. Evaluación de la excreta de pollo de engorde (pollinaza) en la alimentación animal. I. Disponibilidad y composición química.

Agronomía costarricense, enero – junio año / vol. 24, numero 001. Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. Pp. 47 – 53.

UGRJ, 2008. Utilización de bloques de pollinaza y melaza para ganado en pastoreo. Derecho reservado a la Unión Ganadera Regional de Jalisco. Esta publicación está autorizada por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. www.snitt.org.mx/pdfs/tecnologias/Alimenta/ARCHIVO25.pdf. Consultado: 31 de Enero del 2009.

Van Winsen, R.L., B.A.P. Urlings, L.J.A. Lipman, J.M.A. Snijders, D. Keuzenkamp, J.H.M. Verheijden, F. Van Knapen. 2001. Effect of fermented feed on the microbial population of the gastrointestinal tracts of pigs. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:3071-3076.

Van Soest, P. J., Robertson, J. P. & Lewis, B. A. 1991. Symposium: carbohydrate methodology, metabolism, and nutritional implications in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 74:3583 – 3597.

Valdivié, M. & Ortiz, A. 2003. *Camas Avícolas en Cuba: yacimientos y fuentes*. Editorial el Mar y la Montaña. Guantánamo, Cuba. Mayo. 74 p.

Zinn, R. A., Barajas, R., Montaña, M. and Sean, y. 1996. Protein and energy value of dehydrated poultry in diets for feedlot cattle. *J. Anim. Sci* 74:2331-2335.

Zuberer, D., 1998. *Biological Dinitrogen Fixation: Introduction and Nonsymbiotic*. En principles and applications of soil microbiology. New Jer- sey: Prentice Hall

IX. ANEXOS

8.1. Determinación de parámetros fermentativos.

Se utilizaron las siguientes técnicas de laboratorio.

8.1.2. PH

Se pesó 5 g de la muestra (0 y 24 h) y se depositó en un matraz Erlenmeyers de 250 ml que contenía 45 ml de agua destilada y se procedió a agitarlo durante 15 minutos con un equipo Griffin Flash Shaker. Posteriormente se filtró con gasa estéril recolectando la muestra en un vaso de precipitado de 50 ml, inmediatamente se midió el pH con un potenciómetro portátil marca WPA (Conway, 1957).

8.1.3. Amoniaco

Se utilizó la técnica descrita por Mc Cullough (1967). Del líquido filtrado se tomó 5 ml y se diluyó en 5 ml de Ácido clorhídrico valorado (0.14 N) y posteriormente se aforó con 15 ml de agua destilada, la muestra se guardó durante 2 meses en refrigeración a temperatura (-4°C) para su análisis posterior.

Equipo

Espectrofotómetro de luz ultravioleta visible CARY 1-E VARIAN

Reactivos:

- Solución de ácido meta fosfórico al 25% (Peso/volumen)
- Hipoclorito:
- 7.5 g de NaOH (pellet).
- 21.3 g de Na_2HPO_4 , anhidro (fosfato de sodio dibasico)
- 15 ml de Hipoclorito, 5% solución (blanqueador).

Nota: Hacer un litro con agua destilada y guardar en refrigeración.

- Fenol:
- 50 mg ($\text{Na}_2(\text{NO})\text{FeCN} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) nitroprusida de sodio.
- 10 g de fenol en cristales.

Nota: Hacer 1 litro con agua destilada

- Estándar, 3.82 g NH_4Cl (cloruro de amonio) en un litro de agua destilada y guardar a temperatura ambiente.

Procedimiento:

Pre-Tratamiento de la muestra.

Se toma 5 ml del filtrado que se utilizo para el pH, agregándole 5 ml de ácido clorhídrico al 50 % v/v y 15 ml de agua destilada, mezclando homogéneamente y se guarda en el refrigerador. De la mezcla se tomo un 1 ml se transfirió a viales, donde se centrifugo a 3500 rb x 25.

Tratamiento de la muestra

De la muestras se tomó 20 microlitros de los viales y se colocó en un tubo de 10 ml. Posteriormente se añadió 1 ml de fenol y 1 ml de hipoclorito de sodio, se incubaron los tubos a baño María a 37 °C durante 30 minutos y se adicionó 5ml de agua destilada con el fin de diluir las muestras. Se procedió a agitar las muestras en un vortex antes de ser leídas en espectrofotómetro de luz ultravioleta visible a 630 nanómetros (nm).

Preparación de la curva estándar

En primer término se procedió a desecar el NH_4CL (cloruro de amonio) en una estufa a 105 °C durante 1 hora. Posteriormente se pesó 3.82 g de NH_4Cl y llevarlo a 1 litro, y tomar alícuotas de 0.25, 0.5, 1, 1.5, 3, 4.5 y 6 ml y aforó a 100 ml, obteniendo así los puntos de la curva estándar. Se preparó un blanco como referencia con 1 ml de fenol y 1 ml de hipoclorito; siguiendo el mismo procedimiento que en las muestras problemas.

8.1.4. Ácido láctico

Para su determinación se utilizó la técnica descrita por Sigma, (1990). Para preparar la muestra, se tomó 8 ml de la muestra líquida y se le adicionó 2 ml de ácido metafosfórico al 25% y se guardó en refrigeración a temperatura (-4°C), para análisis posterior. Esta variable solo fue estudiada a las 24 horas de fermentación.

Reactivos:

- Sulfato de cobre deshidratado
- PhenylPhenol, 97%
- Alcohol etílico absoluto anhidro ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$)
- Milchaure lithium Salz. ZUR Syntheses ($\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COOLi}$)
- Ácido sulfúrico concentrado
- Agua destilada.

Preparación de la solución sulfato de cobre deshidratado

Se pesó 4 g de sulfato de cobre deshidratado y se diluyó en 60 ml de agua destilada, posteriormente se aforó a 100 ml en matraz volumétrico.

Preparación PhenylPhenol, 97%

Se pesó 1.5 g de 4- PhenylPhenol, 97% y se diluyó en 60 ml de alcohol etílico absoluto anhidro (CH₃CH₂OH) y se aforó a 100 ml en matraz volumétrico.

Preparación solución estándar de trabajo

Se colocó 10 ml de solución madre en un matraz volumétrico de 100 ml y aforó con agua destilada.

Preparación de la curva estándar

Se colocó 2, 3 y 1 ml de la solución estándar de trabajo (ya antes preparada) en unos tubos de 15 ml y se agregó agua destilada a cada tubo hasta obtener 4 ml de cada tubo.

El valor de la curva fue la siguiente:

Al tubo que se le agregó 2 ml de solución estándar de trabajo es 10.

Al tubo que se le agregó 3 ml de solución estándar de trabajo es 15.

Al tubo que se le agregó 1 ml de solución estándar de trabajo es 5.

Los Procedimiento son los siguientes.

Pre-Tratamiento de la muestra.

Se toma 8 ml del filtrado que se utilizo para el pH y se agrega 2 ml de ácido metafosfórico al 25 %, mezclando homogéneamente la muestra y conservándose en el refrigerador. De la muestra mezcla se toma 1 ml y se transfiere a viales, donde se centrifuga a 3500 rb x 25 min, conservándose en el refrigerador.

Procedimiento:

Se utilizó las muestras pre -tratadas para ácido láctico. Se realizó una dilución de 200 micras de muestra en 9.8 ml de agua destilada en tubos de 15 ml, se agitó en vortex, posteriormente, en otro tubo de 15 ml, se añadió 1 ml de la dilución agitada y se agregó 6 ml de ácido sulfúrico concentrado y se dispuso a agitarse.

Posteriormente, se colocó en el block digestor a 100 °C durante 10 minutos, paso seguido se enfrió a baño María durante 15 minutos, posteriormente se agregó 100 micras de sulfato de cobre y 200 micras de PhenylPhenol, se agitaron y dejó reposar durante 15 minutos. Las muestras se leyeron en un espectrofotómetro de luz ultravioleta visible CARY 1-E VARIAN a 530 nm.

8.2. Determinación de parámetros bromatológicos

8.2.1. Materia Seca (MS)

Para determinación de materia seca (MS) se pesaron 95 g de muestra en bolsas de papel de un kg de capacidad y se colocaron en una estufa a una temperatura de 60° C por 6 días. Posteriormente, se molió en un molino de martillo marca CULATII, con criba de 1 mm, para análisis bromatológicos

Para obtener el porcentaje de MS, primero se obtuvo el porcentaje de humedad con la siguiente fórmula:

$$\%H = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100$$

Dónde:

P_i= Peso inicial

P_f= Peso final

%H = Porcentaje de humedad

%MS= Porcentaje de materia seca

La MS se calculó con la formula siguiente:

$$\%MS = 100 - \%H$$

8.2.2. Cenizas

Considerando cuando una muestra se somete a una temperatura entre 550 y 600 °C en una mufla, toda la materia orgánica se quema. De esta manera se determina la materia inorgánica, o cenizas (A.O.A.C. 1975.), ya que esta no se volatiliza a estas temperaturas por lo que queda como residuo.

Equipo:

1. Mufla.
2. Estufa a 110° C,
3. Crisoles de porcelana (40 ó 100 ml).

Procedimiento

Colocar los crisoles que se van a utilizar en una estufa a una temperatura de 110° C durante una hora cuando menos. Sacarlos y ponerlos en un desecador hasta que se enfríen, pesar los crisoles en una balanza analítica tan rápido como sea posible, usando pinzas de metal. Pesar aproximadamente 2 a 5 g de la muestra sobre un papel, transferirla luego a un crisol. Colocar los crisoles en la mufla, y empezar a elevar la temperatura poco a poco hasta que llegue a los 550-600° C y dejarlos durante 12 horas o toda la noche. Dejar que se enfríe la mufla un poco

(aproximadamente unos 100° C) y pasar los crisoles a un desecador. Una vez fríos, péselos rápido para prevenir la absorción de humedad.

Para determinar la cantidad de cenizas presentes en la muestra se utiliza la fórmula:

$$\text{Ceniza} = \frac{(\text{peso de muestra} + \text{crisol seco}) - (\text{peso de crisol seco})}{\text{Peso de muestra residual}} \times 100$$

8.2.3. Materia orgánica

Se obtiene restando el 100 % de muestra al resultado del porcentaje de ceniza.

8.2.4. Proteína cruda (PC)

Se determinó mediante el método de Micro-Kjeldahl descrita según AOAC (1995), siguiendo el fundamento en el cual la determinación de proteína cruda, consiste en la conversión de proteína – nitrógeno a sulfato ácido de amonio durante la digestión de la materia orgánica con ácido sulfúrico y calor en la presencia de un catalizador; una vez que la materia orgánica se ha desintegrado completamente, se neutraliza con hidróxido de sodio, liberándose amoníaco el cual es destilado por arrastre con vapor dentro de una solución de ácido bórico, para formar un complejo boro-amoniaco (tetraborato de amonio). La cuantificación del nitrógeno se logra cuando una solución previamente valorado de ácido clorhídrico al 0.1 N, se añade a la solución, formando por cada equivalente de boro-amoniaco, un equivalente del sulfato-amoniaco (sulfato de amonio), en donde 1ml de ácido estandarizado neutraliza 0.014 g de nitrógeno en forma de ion amonio.

Equipo

- 1.- Aparato de digestión Micro - Kjeldahl.
- 2.- Matraces Kjeldahl de 30 ml.
- 3.- Destilador micro - Kjeldahl
- 4.- Matraces Erlenmeyers de 50 ml
- 5.- Bureta de 25 ml

Reactivos

- 1.- Ácido sulfúrico
- 2.- Solución de ácido bórico al 4%

Preparación de ácido bórico al 4 %

1.- se pesó 40 g de ácido bórico y se diluyó en 992 ml de agua destilada, esto con el fin de alcanzar 1 litro al agregar 8 ml de solución indicadora, que se preparó pesando 100 g de rojo de metilo y 200 g de verde de bromocresol que se diluyó con etanol aforando a 100 ml en matraz volumétrico.

1. Preparación de mezcla catalizadora

Se mezcló 93 g de sulfato potasio (K_2SO_4), 7 g de sulfato de cobre ($CuSO_4$) moliendo finamente en un mortero.

2. Preparación de hidróxido de sodio al 40 %

Se pesó 400 g de hidróxido de sodio y se diluyó en 1 litro de agua destilada.

3. Preparación de solución valorada de ácido clorhídrico al 0.1 N

Se procedió a convertir a volumen el peso requerido para obtener la concentración deseada, dividir la masa (3.6458) entre la multiplicación de la pureza (37 %) por la densidad (1.185), obteniendo 8.315 ml de ácido clorhídrico.

Se agregó 8.315 ml de HCl y se diluyó hasta 1 litro de agua destilada (8.315 ml HCl diluido en 991.685 ml de agua destilada), dando una solución cerca de 0.1 normal. Posteriormente se comprobó la valoración pesando 0.53 g de carbonato de sodio el cual se aforó a 100 ml con agua destilada en matraz volumétrico. Después se tomó 10 ml de la solución en un Erlenmeyers y se le agregó 2 gotitas de indicador y se tituló con HCl preparado.

Posteriormente se procedió al cálculo de la normalidad buscada dividiendo la normalidad del HCl puro (1.00317) entre el promedio de alícuotas de HCl elaborado gastado (7.3).

Procedimiento:

DIGESTIÓN

1.-Se pesó 0.3 g de muestra y se depositó en tubo de vidrio para nitrógeno cuidando que la muestra no quedara pegado en las paredes del tubo, se le adicionó 3 ml de ácido sulfúrico procurando quedara en íntimo contacto con la muestra, simultáneamente se corrieron blancos de reactivos.

2.-Se dejó en reposo durante 12 horas (pre-digestión). Posteriormente calentando suavemente al inicio de la digestión se agregó 1 g de la mezcla catalizadora, se metió nuevamente al block digestor aumentando la temperatura hasta alcanzar aproximadamente 360 a 390 ° C, después de una corta ebullición la mezcla se aclaró tornando un color de negro a color azul – verde claro cristalino.

4.-cuando se completó la digestión se dejó enfriar y se agregó aproximadamente 3 ml de agua destilada y se agitó vigorosamente para disolver el material soluble.

DESTILACIÓN

1.-Se transfirió el contenido del tubo o muestra al bulbo situado en la parte superior izquierda del destilador, se lavó el tubo con la mínima cantidad de agua.

2.- Se colocó en el tubo de salida situado en la parte inferior derecha del aparato de destilación, un matraz Erlenmeyers de 125 ml conteniendo 6 ml de ácido bórico al 4% con indicador.

3.-Se adicionó 10 ml de hidróxido de sodio en el bulbo mencionado en el paso 1, se conectó el flujo de vapor y se inició la destilación hasta obtener 25 ml del destilado, seguido de esto se lavó el condensador para iniciar nuevamente la destilación de la siguiente muestra.

TITULACIÓN

Se procedió a titular el contenido del matraz Erlenmeyers de 125 ml utilizando una bureta de 25 ml conteniendo ácido clorhídrico valorado a 0.1 N formando por cada equivalente de boro-amoniaco, un equivalente de sulfato-amoniaco (sulfato de amonio), en donde 1 ml de ácido clorhídrico neutraliza 0.014 g de nitrógeno en forma de ion amonio.

Los cálculos se realizaron utilizando la formula siguiente:

$$NT = \frac{(GHCL-GHCL \text{ Blanco}) (N \text{ HCL}) (1.4)}{\text{Peso de la muestra}}$$

Multiplicado por 6.25.

Dónde:

NT= Nitrógeno total

GHCL= Gasto acido clorhídrico

GHCL Blanco= Gasto acido clorhídrico Blanco

NHCL= Normalidad del acido clorhídrico

1.4= Factor de ajuste para Nitrógeno (0.014 mili equivalentes multiplicado por 100).

8.2.5. Nitrógeno No Proteínico (NNP x 6.25) y Proteína Verdadera (PV)

Se determinó mediante la técnica descrita por Bernstein (1983), para lo cual se utilizó el mismo equipo y reactivos mencionados en la metodología anterior, excepto el ácidotricloro- acético, el cual se preparó pesando 20 gramos de ácido tricloro-acetico diluyéndolo en 60 ml de agua destilada, se agitó a 80 ° C, posteriormente se aforó a 100 ml con agua destilada.

Procedimiento

1.-Se pesó 2 g de muestra y se depositó en un matraz Erlenmeyers de 125 ml, posteriormente se agregó 12.5 ml de agua destilada, se agitó y dejó reposar 1 hora.

2.-Seguido de esto se añadió 12.5 ml de ácidotricloro-acetico, se agitó y guardó en refrigeración durante 4 horas agitando cada hora.

3.-Posteriormente se filtró con gasa estéril y se tomó 10 ml del sobrenadante para centrifugar a 3500 revoluciones por minuto durante 10 minutos, se extrajo 3 ml y se depositó en tubos para nitrógeno y se le adicionó 3 ml de ácido sulfúrico y 1 g de mezcla catalizadora y se metió en el block digestor.

4.-Se realizó el mismo proceso de destilación y titulación, posteriormente se procedió a realizar los cálculos.

Cálculos:

$$P m F = P m i / 25 \text{ ml multiplicado por } 3 \text{ ml}$$

Dónde:

PmF= Peso muestra final

Pmi= Peso muestra inicial

25 ml= 12.5 ml H₂O destilada + 12.5 ml Acido Tricloro-acetico.

3 ml= Cantidad de muestra tomada del sobrenadante.

$$NNP = \frac{(GTHCL - GTHCLB) (NHCL) (1.4)}{PmF}$$

Dónde:

NNP= Nitrógeno no proteínico

GTHCL= Gasto total Ácido clorhídrico

GTHCLB= Gasto total Ácido Clorhídrico del Blanco

NHCL= Normalidad del Ácido Clorhídrico

1.4= Factor de ajuste para Nitrógeno (0.014 mili equivalentes multiplicado por 100) dividido entre peso muestra final.

El NNP obtenido con la formula anterior se multiplica por el factor 6.25 (factor para el cálculo de proteína).

La proteína Verdadera se obtiene por diferencia restando de la Proteína Cruda (PC) el valor del nitrógeno no proteínico (NNP).

$$PV = PB - NNP.$$

8.2.6. Fibra Detergente Neutro (FDN)

Para la determinación de la fracción fibrosa se utilizó la técnica descrita por Van Soest *et al.*, (1991), Siguiendo el fundamento en el cual este método del detergente neutro para constituyentes de paredes celulares es un método rápido para determinar la fibra total en alimentos de origen vegetal, divide la materia seca de los alimentos muy cerca al punto que separa los constituyentes solubles y

nutricionalmente disponibles (98%), de aquellos que son aprovechables de manera incompleta y dependen de la fermentación microbiana.

Equipo:

Matraz Volumétrico 1000 ml

Buretas 1000ml y 100ml

Plancha eléctrica Marca Thermolyne cimarec 2

Recipiente de peltre con capacidad para 5litros

Bolsitas de poliseda con las dimensiones de 6 x 3 cm

Ligas.

Reactivos

a) Agua destilada 1 litro

b) Lauril sulfato de sodio, U.S.P. 30 g

c) EDTA, G.R. 18.61 g

d) Fosfato acido disódico, anhidro, G.R. 4.56 g

e) Tetraborato de sodio deshidratado, G.R. 6.81 g

f) Etilen glicolmonoetil éter purificado, 10 ml

Procedimiento:

Preparación de la solución detergente neutro.

Se pesó EDTA, Fosfato Acido Disodico Anhidro y Tetraborato de Sodio Deshidratado en las cantidades indicadas anteriormente base 1 litro y se disolvió en 300 ml de agua destilada en un matraz volumétrico y se calentó hasta que se disolviera agitando ocasionalmente.

En otro matraz volumétrico se disolvió Lauril Sulfato de Sodio en 300 ml de agua destilada, agitando hasta su completa disolución. Terminado esto se añadió ésta última solución a la primera solución agitando para lograr la completa homogenización agregando finalmente Etilen Glicol MonoetilEter Purificado, y se aforó a 1litro con agua destilada, agitando vigorosamente y se comprobó que el pH de la solución final estuviera entre 6.9 y 7.1.

1.-Se pesó 0.40 g de muestra seca a 65°C, en estufa de aire forzado, y molida en una criba de 1 mm o su equivalente, colocándola en bolsitas de 6 cm por 3 cm y amarrando las con ligas.

2.-Posteriormente se añadió, 40 ml de la solución detergente neutro por cada muestra a temperatura ambiente.

3.-Luego se calentó la solución más muestra en plancha eléctrica a 90°C, y se dejó hervir durante 60 minutos.

- 4.-Posteriormente se lavó cada una de las muestras con abundante agua hasta retirar completamente la solución detergente neutro.
- 5.-Seguido se colocó en estufa a 60°C por 24 h
- 6.-Posteriormente se sacó y se pesó las bolsitas.

Calculo:

Los rendimientos de la fibra detergente neutro recuperado se expresó como porcentaje de constituyentes de la pared celular (CPC), usando la fórmula siguiente:

$$\text{FDN} = \frac{(\text{bolsa +muestra}) - (\text{peso final- p. bolsa})}{\text{Peso de la muestra}} \times 100$$

8.2.7. Fibra Detergente Acida (FDA)

El detergente en este procedimiento disuelve todo el contenido celular y además a la hemicelulosa, por lo que el residuo insoluble está formado por paredes celulares sin hemicelulosa, además de sílice.

Equipo:

Matraz Volumétrico 1000ml
Buretas de 1000ml y 100ml
Plancha eléctrica Marca Thermolyne cimarec 2
Recipiente de peltre con capacidad para 5 litros
Bolsitas de poliseda con las dimensiones de 6 x 3 cm
Ligas.

Reactivos:

Bromuro de Cetrilmetril Amonio (CBTA), 20 g
Ácido Sulfúrico grado reactivo, 27.17ml
Procedimiento

Solución Detergente Acida:

Disolver Bromuro de Cetrilmetril Amonio en las cantidades antes mencionadas base 1 litro en 300 ml de agua destilada en matraz volumétrico calentando y agitando en plancha eléctrica hasta disolver completamente.

Cuidadosamente se agregó el ácido sulfúrico y se aforó a un litro con agua destilada, agitando para homogenizar la solución.

- 1) Utilizando las muestras de FDN, se le agregan 40ml de la solución detergente acida a cada muestra a temperatura ambiente.
- 2) Calentar la solución con las muestras en plancha eléctrica y dejar hervir durante 1 hora, seguido esto se procede a lavar las muestras hasta retirar la solución detergente acida y secar en estufa a 60° C por 24 h.

3) Se sacan y pesan las bolsitas y se procede al cálculo.

Calculo:

Los rendimientos de la fibra ácido detergente se determina mediante el empleo de la fórmula siguiente:

$$\text{FAD} = \frac{(\text{bolsa +muestra final}) - (\text{p. bolsa})}{\text{Peso de la muestra}} \times 100$$

8.2.8. Hemicelulosa:

Se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Hemicelulosa} = \text{FDN} - \text{FDA}$$

Contenido Celular

Se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{CC} = 100 - \text{FDN}$$