



**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

---

**CAMPUS TABASCO**

**POSTGRADO EN PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIAS EN EL TROPICO**

**ELABORACION Y CARACTERIZACION DE UN ADITIVO  
BIOLOGICAMENTE ACTIVO ATRAVES DE UNA FERMENTACION  
EN ESTADO LÍQUIDO**

**JAVIER HERNANDEZ CADENA**

**TESIS:**

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

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**H. CARDENAS, TABASCO**

**2010**

La presente tesis, titulada: **ELABORACION Y CARACTERIZACION DE UN ADITIVO BIOLÓGICAMENTE ACTIVO ATRAVÉS DE UNA FERMENTACION EN ESTADO LIQUIDO**, realizada por el alumno: **JAVIER HERNANDEZ CADENA**, 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. JESUS ALBERTO RAMOS JUAREZ**

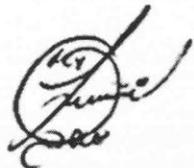
**ASESOR**

  
\_\_\_\_\_  
**DR. ARABEL ELÍAS IGLESIA**

**ASESOR**

  
\_\_\_\_\_  
**DRA. CONSUELO DEL C. BAUTISTA MUÑOZ**

**ASESOR**

  
\_\_\_\_\_  
**DR. DAVID HERNANDEZ SÁNCHEZ**

**H. Cárdenas, Tabasco, Diciembre 2010**

# ELABORACION Y CARACTERIZACION DE UN ADITIVO BIOLÓGICAMENTE ACTIVO ATRAVES DE UNA FERMENTACION EN ESTADO LÍQUIDO

Javier Hernández Cadena, MC.

Colegio de Postgraduados 2010

## RESUMEN

La melaza de caña de azúcar en el mercado internacional se comercializaba principalmente para la alimentación animal, actualmente tiene un mayor uso en la industria de la fermentación alcohólica y debido a su alto costo se ha venido limitado en la ganadería. Con el objetivo de establecer el nivel óptimo de melaza en un aditivo biológicamente activo (Vitafert), se estudió en diseño completamente al azar con arreglo factorial 3 niveles de melaza (5, 10 y 15%) y 8 tiempos de fermentación líquida (0, 1, 2, 3, 6, 9, 15 y 30 día), con 3 repeticiones por tratamientos para las variables bromatológicas y fermentativas. Para las variables microbiológicas se utilizó un diseño completamente al azar con 3 tratamientos (niveles de melaza) y 8 repeticiones por tratamientos para cada día de fermentación. Se usó como inóculo yoghurt natural y se mezcló con urea, sulfato de amonio, cereales, melaza y agua según tratamiento para realizar una fermentación líquida. Se tomaron muestras para realizar diluciones seriadas de  $10^{-1}$  hasta  $10^{-10}$  para la siembra de microorganismos y análisis bromatológico. El pH fue afectado ( $P < 0.001$ ) por los días de fermentación, los niveles más bajos se alcanzan en el día 3 (4.1) y posteriormente se estabiliza en los días posteriores, los niveles de melaza no afectaron el pH. En relación al crecimiento de las bacterias ácido lácticas hay un crecimiento lineal, alcanzando su máxima población en el día 3 ( $9.29 \times 10^{-9}$  Log. ufc/ml), lo cual coincide con los niveles más bajos de pH, estas poblaciones se mantienen hasta el día 15. Se concluye que a partir del día 15 las poblaciones de lactobacilos disminuyen en todos los tratamientos estudiados y que con el 15% de melaza se obtienen las mayores poblaciones de bacterias lácticas.

**Palabras clave:** Melaza, yoghurt, lactobacilos, levaduras, Vitafert, Probióticos.

## **ABSTRACT**

The sugar cane molasses in the international market is mainly marketed for animal feed. It is used currently the fermentation industry and due to its high cost has been limited in livestock. The aim was to establish the optimum level of molasses in a biologically active additive (Vitafert). A completely randomized design with factorial 3 levels of molasses (5, 10 and 15%) and 8 liquid fermentation times (0, 1, 2, 3, 6, 9, 15 and 30 days), with 3 replicates per treatment for dietetics was studied. For microbiological variables used a completely randomized design with 3 treatments (levels of molasses) and 8 replicates per treatment for each day of fermentation. Was used as inoculum natural yoghurt and mixed with urea, ammonium sulphate, grains, molasses and water as treatment for a liquid fermentation. Samples were taken for serial dilutions of  $10^{-1}$  to  $10^{-10}$  for growing microorganisms and chemical composition analysis. The pH was affected ( $P < 0.001$ ) for days of fermentation, the lowest levels are reached on day 3 (4.1) and then stabilized in the following days, the levels of molasses did not affect the pH. In relation to the growth of lactic acid bacteria growth is linear, reaching its maximum population on day 3 ( $9.29 \times 10^{-9}$  Log. cfu / ml), which coincides with the lower pH levels, these stocks are held until day 15. We conclude that from day 15 of the populations of lactobacilli decreased in all the treatments and that 15% of molasses is obtained the largest populations of lactic acid bacteria.

**Keywords:** molasses, yogurt, lactobacillus, yeast, Vitafert, Probiotics.

## **AGRADECIMIENTOS**

**A DIOS**, más que nada por darme la existencia y su protección, salud e inteligencia y por tener con migo a los seres más queridos gracias.

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

**Al Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco, por haberme dado la oportunidad de haber hecho uso de sus instalaciones.**

**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.

**Muy especial, al Dr. Jesús Alberto Ramos J.**, Por darme la oportunidad de ser su tesista, por su confianza y su gran apoyo en mi investigación.

**A la Dra., Consuelo del C. Bautista M.** por su paciencia y confianza por facilitarme su laboratorio y material para elaborar esta tesis.

**Al Dr. Arabel Elías I.**, Por transmitirme su filosofía, conocimientos, y ser un ejemplo a seguir por su gran sabiduría.

**Al Dr. David Hernández S.**, Por su confianza y comentarios y por su amistad gracias.

**Al Dr. Emilio M. Aranda I., Dr. Adolfo Bucio Galindo y a los Técnico del laboratorio el C. José Luis y Cesar Villareal.** Por brindarme su apoyo y confianza, por facilitarme sus laboratorios para realizar numerosas pruebas y análisis gracias.

**A mis compañeros (as)**, Por su apoyo para la realización de esta tesis y por su amistad les agradezco mucho (Isaías, Rigo, Javier, Ernesto, Juan Carlos y Víctor).

## DEDICATORIA

**Dedico esta tesis a mis padres**, primero que nada por darme la vida, su amor, sus desvelos, por las angustias que les hice pasar y por todo sus esfuerzos y consejos que me han brindado durante todos mis estudios, gracias.

**A Verónica** por darme algo tan valioso y único en la vida como lo es un hijo, por su paciencia, comprensión y su esfuerzo por salir adelante juntos, gracias por darme a **Xavier, LOS AMO**.

**A mis hermanas y hermanos, Evelyn, Martha, Fernando y Rafael**, porque sé que siempre cuento con ustedes en las buenas y en las malas.

**A mi sobrino Jesús Ramón**, por tomarme como un ejemplo de superación profesional y por el cariño que me tiene gracias.

**A mis tías Emma y Carmen**, por el apoyo que siempre me han brindado y sus buenos consejos gracias.

**A la familia Herrera Dagdug**, José Sabino y Walter Seiner y a las Señoras, Olga Leonor, Silvia y Shirley, por su apoyo incondicional y oportuno, por sus sabios consejos y al Sr. Walter Herrera R. (†) por ser para mí un ejemplo de fortaleza y tenacidad para la superación y por su gran amistad muchas gracias.

**Al MC. Jesús A. Tamayo Alcalá y al MC. Manuel Peregrino Mtz. de E.** Por su amistad, por sus certeros consejos y por su marcada insistencia para mi preparación académica gracias.

## CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
<b>OBJETIVOS GENERALES .....</b>	<b>3</b>
<b>OBJETIVOS PARTICULARES.....</b>	<b>3</b>
<b>HIPOTESIS.....</b>	<b>3</b>
<b>II. REVISIÓN DE LITERATURA.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1. La biotecnología en la producción de alimentos .....</b>	<b>4</b>
<b>2.2. Aplicación de la biotecnología.....</b>	<b>4</b>
<b>2.2.1. Biotecnología roja.....</b>	<b>4</b>
<b>2.2.2. Biotecnología verde .....</b>	<b>5</b>
<b>2.2.3. Biotecnología azul.....</b>	<b>5</b>
<b>2.2.4. Biotecnología blanca.....</b>	<b>5</b>
<b>2.3. Antecedentes de Fermentación.....</b>	<b>5</b>
<b>2.4. Fermentación.....</b>	<b>6</b>
<b>2.5. Conceptos comunes utilizados.....</b>	<b>6</b>
<b>2.5.1. Fermentación anaeróbica.....</b>	<b>6</b>
<b>2.5.2. Fermentación aeróbica.....</b>	<b>7</b>
<b>2.5.3. Respiración aeróbica.....</b>	<b>7</b>
<b>2.5.4. Respiración anaeróbica.....</b>	<b>7</b>
<b>2.6. Fermentación en estado líquido y en estado sólido.....</b>	<b>7</b>
<b>2.7. Factores que intervienen en el proceso de la fermentación líquida.....</b>	<b>8</b>
<b>2.7.1. Temperatura.....</b>	<b>8</b>
<b>2.7.2. pH.....</b>	<b>9</b>
<b>2.7.3. Concentración de nutrientes.....</b>	<b>9</b>
<b>2.7.4. Aireación.....</b>	<b>9</b>
<b>2.7.5. Fuente de carbón y la relación carbón/nitrógeno.....</b>	<b>10</b>
<b>2.8. Alimento funcional.....</b>	<b>10</b>
<b>2.9. Probiótico.....</b>	<b>10</b>
<b>2.9.1. Microorganismos utilizados como Probióticos.....</b>	<b>11</b>
<b>2.9.1.1. Lactobacilos.....</b>	<b>11</b>

2.9.1.2.	Levaduras.....	11
2.9.2.	Probiótico como aditivos en la alimentación animal.....	12
2.9.3.	Mecanismos de acción de los Probióticos.....	12
2.9.3.1.	Competencia por la adhesión en los receptores del epitelio intestinal.....	12
2.9.3.2.	Producción de sustancias antibacterianas.....	13
2.9.3.3.	Estimulación de la inmunidad.....	14
2.10.	Yoghurt y su uso en la alimentación animal.....	14
2.11.	Melaza de la caña de azúcar.....	14
2.12.	Vitafert.....	17
<b>III.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>18</b>
3.1.	Localización geográfica del área de estudio.....	18
3.2.	Tratamientos y diseño experimental.....	18
3.3.	Procedimiento experimental.....	20
3.3.1.	Preparación del Vitafert.....	20
3.4.	Indicadores microbiológicos.....	22
3.4.1	Muestreo y siembra.....	22
3.5.	Indicadores Fermentativos.....	23
3.6.	Indicadores Bromatológicos.....	23
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>25</b>
4.1.	Variables fermentativas.....	25
4.2.	Variables bromatológicas.....	25
4.3	Variables microbiológicas.....	28
4.4.	Costo de producción del Vitafert.....	31
<b>V.</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>32</b>
<b>VI.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>35</b>
<b>VII.</b>	<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>35</b>
<b>VIII.</b>	<b>LITERATURA CITADA.....</b>	<b>36</b>
<b>IX.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>42</b>

## INDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b>	Análisis de laboratorio en distintos tipos de yoghurt realizado por la PROFECO 2006 .....	15
<b>Cuadro 2.</b>	Composición química de la melaza de caña de azúcar.....	16
<b>Cuadro 3.</b>	Distribución de los tratamientos.....	19
<b>Cuadro 4.</b>	Porcentaje de ingredientes utilizado en la elaboración de Vitafert con 3 niveles de melaza.....	21
<b>Cuadro 5.</b>	Efecto del tiempo de fermentación y niveles de melaza en el pH del Vitafert. ....	25
<b>Cuadro 6.</b>	Efecto del tiempo de fermentación y niveles de melaza en la proteína cruda y proteína verdadera del Vitafert.....	27
<b>Cuadro 7.</b>	Efecto del tiempo de fermentación y niveles de melaza en los °Brix del Vitafert. ....	28
<b>Cuadro 8.</b>	Efecto del tiempo de fermentación y niveles de melaza en la dinámica de crecimiento del lactobacilos (Log. ufc/ml) en el Vitafert.....	29
<b>Cuadro 9.</b>	Efecto del tiempo de fermentación y niveles de melaza en la dinámica de crecimiento de levaduras (Log. ufc/ml) en el Vitafert .....	30
<b>Cuadro 10.</b>	Efecto del tiempo de fermentación y los niveles de melaza en la dinámica de crecimiento de bacterias totales (Log. ufc/ml) en el Vitafert.....	31
<b>Cuadro 11.</b>	Costos del Vitafert según los tratamientos estudiados incluyendo el yoghurt como inóculo.....	31
<b>Cuadro 12.</b>	Costos del Vitafert según los tratamientos estudiados no incluyendo el yoghurt como inóculo.....	32

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Descripción de bacterias residentes no patógenas (lactobacilos) pueden prevenir la colonización de patógenos (k88 E. coli) sobre la superficie intestinal. Adaptado de Mathew, 2001.....	13
<b>Figura 2.</b>	Ubicación geográfica del área de estudio.....	18
<b>Figura 3.</b>	Efecto del tiempo de fermentación y niveles de melaza en el porcentaje de materia seca del Vitafert.....	26

## IX ANEXOS

<b>ANEXO 1</b>	Efecto del tiempo de fermentación y niveles de melaza en el porcentaje de materia seca del Vitafert.....	42
----------------	--	----

## I. INTRODUCCIÓN

Dentro del campo de la nutrición animal, se han venido realizando avances biotecnológicos en la elaboración de productos alimenticios tendientes a mejorar la eficiencia alimenticia en las diferentes especies domésticas. En la actualidad no solo se elaboran raciones que cumplan con las necesidades propias de las diferentes etapas de los animales o aditivos que incrementen la palatabilidad de un alimento, si no que han suministrado en forma directa, o bien, incorporados al alimento o al agua, compuestos y/o microorganismos que modifican las condiciones del tracto digestivo, incrementando la utilización de los alimentos consumidos.

El auge sorprendente de la industria de los alimentos funcionales surgió en la década de los 90's. Las causas que originaron esta revolución son diversas, sugiere las siguientes: 1) el público que se preocupa más por su salud y compra alimentos con valor agregado a la nutrición, 2) las organizaciones encargadas de legislar en materia de alimentos están reconociendo los beneficios de los alimentos funcionales a la salud pública, 3) el gobierno está poniendo atención en este renglón ya que prevé el potencial económico de estos productos como parte de las estrategias de prevención de la salud pública. Otros factores que también contribuyen en el "boom" de los alimentos funcionales incluyen los grandes avances tecnológicos, entre ellos la biotecnología, así como la investigación científica que documenta los beneficios para la salud de estos alimentos (Jones *et al.* 2002).

Según Schrezenmeir y de Vrese (2001), los Probióticos son suplementos alimenticios a base de microorganismos vivos, los cuales mejoran la productividad y salud de los animales, al asegurar una microflora adecuada en su sistema digestivo. Los lactobacilos y *Streptococcus sp.*, y las levaduras pueden cumplir este objetivo, puesto que sobreviven en el paso a través del estómago y colonizan

el tracto intestinal, eliminando por exclusión competitiva, a patógenos al evitar que estos microorganismos se adhieran a las células intestinales del hospedero.

El Vitafert es un producto biológico obtenido por fermentación en estado líquido compuesto de bacterias, levaduras y sus metabolitos, que funciona como Probiótico, capaces de producir cantidades apreciables de ácidos orgánicos de cadena corta como láctico, acético, propiónico, succínico y pirúvico, vitaminas, enzimas y una fuente de carbono constituida por el 15% de melaza.(Elías y Herrera 2010).

Fajardo (2007), indica que la melaza de caña contiene sacarosa, glucosa, fructosa, azúcares invertidos, sales y otros compuestos solubles, la que la hace importante aprovecharla al máximo como materia prima para la producción de biomasa y para la obtención de diferentes productos biotecnológicos por vías fermentativas, sin embargo, la concentración de melaza en la fermentación puede afectar el crecimiento microbiano ya que según Vienegra (1984), la sacarosa no debe de ser menor del 5% porque es improductivo e insuficiente para el crecimiento de los microorganismos y no más del 18% por que causa inhibición del crecimiento, debido al aumento de la presión osmótica.

Castro *et al.* (2007), indican que actualmente, la melaza de caña de azúcar tiene un mayor uso en la industria de la fermentación alcohólica, lo cual ha incrementado su costo en el mercado nacional principalmente para la alimentación animal.

Por lo tanto en este proyecto se plantea utilizar melaza de caña de azúcar en tres niveles diferentes (5, 10, y15%) como fuente de carbono en la realización de un aditivo funcional hecho a base de una fermentación líquida.

## **OBJETIVO GENERAL**

Realizar una caracterización microbiológica y bromatológica de un aditivo (Vitafert) obtenido bajo fermentación líquida con diferentes niveles de melaza de caña de azúcar

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

Establecer el nivel óptimo de melaza en la dinámica de fermentación del Vitafert

Cuantificar la carga microbiana viable presente en el aditivo durante el proceso de fermentación en estado líquido

Determinar la concentración de la materia seca, pH, proteína verdadera, proteína cruda y nitrógeno no proteínico.

## **HIPÓTESIS**

Con el menor nivel de melaza se logra una mejor estabilidad química y biológica del Vitafert

## **II REVISIÓN DE LITERATURA**

### **2.1. La biotecnología en la producción de alimentos**

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

La FAO (2003), define a esta como “toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados, para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos”. Puede aplicarse a la producción de alimentos de mayor valor nutritivo para los animales a partir de recursos fibrosos con bajo contenido de proteína disponibles.

### **2.2. Aplicación de la biotecnología**

Según Ochave (2003), la biotecnología en relación a su uso, se puede dividir en roja, blanca, verde y azul.

#### **2.2.1. Biotecnología roja**

Se aplica en procesos médicos, como ejemplo se tiene el diseño de organismos para producir antibióticos, el desarrollo de vacunas más seguras y nuevos fármacos, los diagnósticos moleculares, las terapias regenerativas y el desarrollo

de la ingeniería genética para curar enfermedades a través de la manipulación génica (Camí, 2008).

### **2.2.2. Biotecnología verde**

Se aplica a procesos agrícolas. Un ejemplo de ello es el diseño de plantas transgénicas capaces de crecer en condiciones ambientales desfavorables o plantas resistentes a plagas y enfermedades (FAO 2002).

### **2.2.3. Biotecnología azul**

También llamada biotecnología marina, es un término utilizado para describir las aplicaciones de la biotecnología en ambientes marinos y acuáticos. Aún en una fase temprana de desarrollo sus aplicaciones son prometedoras para la acuicultura, cuidados sanitarios, cosmética y productos alimentarios (Comisión europea 2006).

### **2.2.4. Biotecnología blanca**

Conocida también como biotecnología industrial debido a que se aplica a procesos industriales. Un ejemplo de ello es el diseño de microorganismos para producir un producto químico o el uso de enzimas como catalizadores industriales, creación de nuevos materiales, como plásticos biodegradables y en la producción de biocombustibles (Frazzetto, 2003).

## **2.3. Antecedentes de Fermentación**

Ruiz *et al.* (2007) refiere a la fermentación como 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. Se ha utilizado para elaborar y conservar alimentos a partir de cereales, yuca, entre otros.

Vázquez (2007) menciona que el investigador francés Joseph Louis Gay-Lussac fue el primero en determinar una reacción de fermentación obteniendo etanol a partir de glucosa, a pesar de este logro los fundamentos de la fermentación alcohólica eran completamente desconocidos.

## **2.4. Fermentación**

Quintero (1974), define fermentación como un proceso catabólico de oxidación incompleta, siendo el producto final un compuesto orgánico el cual caracteriza los diversos tipos de fermentaciones, también menciona que se lleva a cabo por las levaduras, hongos, bacterias y sus metabolitos y que pueden ser naturales cuando las condiciones ambientales permiten la interacción de los microorganismos y los sustratos orgánicos susceptibles; o artificiales, cuando el hombre propicia condiciones y el contacto referido

Sin embargo SMITH (2006) menciona que el termino fermentación en biotecnología se denomina a la producción industrial de biomasa, enzimas o metabolitos en general mediante el crecimiento controlado de células, especialmente las bacterianas, en biorreactores.

## **2.5. Conceptos comunes utilizados**

Madigan *et al.* (2003), define Fermentación anaeróbica, Fermentación aeróbica, Respiración aeróbica y Respiración anaeróbica de la siguiente manera:

### **2.5.1. Fermentación anaeróbica**

Es la degradación de la glucosa y liberación de energía utilizando sustancias orgánicas como aceptores finales de electrones en donde algunos organismos como las bacterias y las células musculares humanas, pueden producir energía mediante la fermentación y consta de dos partes fundamentales; la primera parte es la glucólisis y la segunda difiere según el tipo de organismos.

### **2.5.2. Fermentación aeróbica**

Se explica que en la industria la fermentación puede ser oxidativa, es decir, en presencia de oxígeno, pero es una oxidación aeróbica incompleta, como la producción de ácido acético a partir de etanol, por un género de bacterias aeróbicas como lo son la bacteria *Acetobacter*, que transforma el alcohol en ácido acético, además con este tipo de fermentación se produce industrialmente el vinagre, ácido cítrico, enzimas, penicilina etc. Todos estos productos son el resultado de procesos microbianos y se llaman productos de fermentación.

### **2.5.3. Respiración aeróbica**

La respiración aeróbica es el conjunto de reacciones bioquímicas que ocurre en la mayoría de las células y en las células eucariotas esta respiración se realiza en las mitocondrias, en las que el ácido pirúvico producido por la glucólisis se desdobra a dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y agua (H<sub>2</sub>O) y se producen 36 moléculas de ATP. Su fórmula general es: C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> + 6 O<sub>2</sub> ----> 6 CO<sub>2</sub> + 6H<sub>2</sub>O y se liberan 36 moléculas de ATP.

### **2.5.4. Respiración anaeróbica**

La respiración anaeróbica es un proceso biológico de óxidoreducción de azúcares y otros compuestos en el que el aceptor terminal de electrones es una molécula, en general inorgánica, distinta del oxígeno. La realizan exclusivamente algunos grupos de bacterias. En la respiración anaeróbica no se usa oxígeno, sino que para la misma función se emplea otra sustancia oxidante distinta, como el sulfato o el nitrato.

## **2.6. Fermentación en estado líquido y estado sólido**

FAO (1998), describe que la fermentación puede mejorar el contenido nutritivo de los alimentos a partir de la biosíntesis de vitaminas, aminoácidos esenciales y proteínas. Las proteínas y las fibras son más digestibles, proporcionan más

micronutrientes y se degradan los factores anti-nutritivos; también enriquece la dieta a través de la producción de una variedad de sabores, texturas y aromas.

Los procesos fermentativos se pueden dividir en fermentación líquida o 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. En la FLS la cantidad de sustancia sólida, poca veces llega a ser mayor de 50 g/L y en la FES el contenido de sólido varía entre 20 y 70% del peso total (Mitchell *et al.* 2002).

En los últimos años, la FLS y FES ha mostrado ser muy prometedora en el desarrollo de algunos bioprocesos y productos, estos 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).

## **2.7. Factores que intervienen en el proceso de la fermentación**

Según Cañón (1988), existen factores físicos, químicos y ambientales, que pueden afectar el proceso de fermentación como lo son la temperatura, pH, concentración de nutrientes y la aireación, entre otros). Uno de los criterios de mayor importancia para el éxito en los procesos de fermentación, es la selección de la cepa y el sustrato conveniente (Pandey *et al.* 2001; Krishna, 2005).

### **2.7.1. Temperatura**

Es una de las variables que afectan la fermentación ya que es influenciada tanto por factores fisiológicos como por problemas físicos, como puede ser la pérdida de agua debida a la evaporación al trabajar con temperatura elevada.

### **2.7.2. pH**

Este es un factor importante en la fermentación, debido a su importancia en el control de la contaminación de bacterias patógenas como también al efecto en el crecimiento de las levaduras, en la velocidad de fermentación y en la formación de alcohol.

### **2.7.3. Concentración de nutrientes**

La presencia de sustancias nutritivas adecuadas es una condición necesaria para el crecimiento y desarrollo de microorganismos como bacterias y levadura, siendo su concentración un factor primordial en la actividad vital de los microorganismos. Las principales sustancias nutritivas y las más influyentes son el nitrógeno, fósforo, azufre, vitaminas y trazas de algunos elementos.

### **2.7.4. Aireación**

El aire es un factor decisivo en toda fermentación, ya que su presencia hace más vigoroso el crecimiento de la levadura y de bacterias facultativas además existen tres puntos de vista de gran importancia que favorecen el rendimiento debido a una buena aireación:

El libre y constante abastecimiento de oxígeno de cada célula en el sustrato.

La eliminación rápida del CO<sub>2</sub>, porque en concentraciones relativamente pequeñas inhibe el crecimiento.

El mantener en suspensión las células de levadura, a fin de que en la tumultosidad de la mezcla se renueve constantemente el contacto entre la membrana celular y el sustrato nutritivo.

### **2.7.5. Fuente de carbón y la relación carbón/nitrógeno**

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

### **2.8. Alimento funcional**

Según Roberfroid (2000), un alimento funcional puede ser cualquier alimento en forma natural o procesada, que además de sus componentes nutritivos, contiene componentes adicionales que favorecen a la salud, la capacidad física y el estado mental. El calificativo de funcional se relaciona con el concepto bromatológico de "propiedad funcional", o sea la característica de un alimento, en virtud de sus componentes químicos y de los sistemas fisicoquímicos de su entorno, sin referencia a su valor nutritivo. Además menciona que en Europa se define alimento funcional a aquel que satisfactoriamente ha demostrado afectar benéficamente una o más funciones específicas en el cuerpo, más allá de los efectos nutricionales adecuados en una forma que resulta relevante para el estado de bienestar y salud o la reducción de riesgo de una enfermedad.

### **2.9. Probiótico**

Según Lilly y Stillwell (1965), Probiótico es una palabra derivada del griego que significa "a favor de la vida" utilizada para describir sustancias secretadas por un microorganismo el cual estimula el crecimiento de otros, por otro lado Parker (1974) utilizó el término Probiótico para describir organismos y sustancias, las cuales contribuyen al equilibrio microbiano intestinal; sin embargo, Fuller (1989) definió Probiótico como un suplemento alimenticio que contiene microorganismos

vivos, el cual afecta benéficamente al hospedero animal al mejorar su balance microbiano intestinal.

Sanders (2003), recopiló una serie de trabajos donde la definición más reciente fue publicada en Octubre del 2001 en un encuentro de Expertos Consultores de la FAO y al Organización Mundial de la Salud (WHO) los cuales definieron a los Probióticos como “microorganismos vivos que cuando son administrados en cantidades adecuadas, confieren un beneficio saludable sobre el hospedero”.

### **2.9.1. Microorganismos utilizados como Probiótico**

Guillot (1998), menciona que la mayoría de las especies bacterianas usadas como Probiótico como los lactobacilos están presentes de manera normal en la microflora digestiva de los animales mientras que los las levaduras no son componentes normales de la microflora intestinal.

#### **2.9.1.1. Lactobacilos**

Según Ljungh (2009), también se conocen como bacterias del ácido láctico, siendo un género de bacterias Gram positivas anaerobias facultativas, denominadas así debido a que la mayoría de sus miembros convierte la lactosa y otros monosacáridos en ácido láctico, el cual hace que el ambiente donde se desarrollan sea ácido y por consiguiente se inhibe el crecimiento de bacterias dañinas, además menciona que normalmente son benignas e incluso necesarias y están presentes en el tracto gastrointestinal y en la vagina en el cuerpo humano y en animales.

#### **2.9.1.2. Levaduras**

Auclair (2001), señala que las levaduras son microorganismos eucariotas y sus propiedades son completamente diferentes a las de las bacterias además indica que las levaduras del genero *Saccharomyces cerevisiae* son las más importantes para las industrias como cervecería, destilería, industrias de combustible líquido

debido a su habilidad de convertir azúcar como glucosa y maltosa en etanol y dióxido de carbono.

### **2.9.2. Probiótico como aditivos en la alimentación animal.**

Según Chesson (1993), los resultados obtenidos con el uso de probióticos en la alimentación animal, han sido variables y puede deberse a la diferencia en las cepas usadas, cantidad de la dosis, composición de la dieta, estrategias de alimentación, tamaño de partícula al moler y a la interacción con otros aditivos alimenticios en la ración diaria, así mismo Fox (1994), menciona otros factores que influyen como la edad, raza, tipo de explotación, uso de antibióticos, estrés y el ambiente de la crianza.

Según Pollmann (1992), los rangos en la ganancia diaria de peso y conversión alimenticia han sido de -8.5 a + 10.5% y -1.4 a 21.4% en la conversión alimenticia.

### **2.9.3. Mecanismos de acción de los Probióticos**

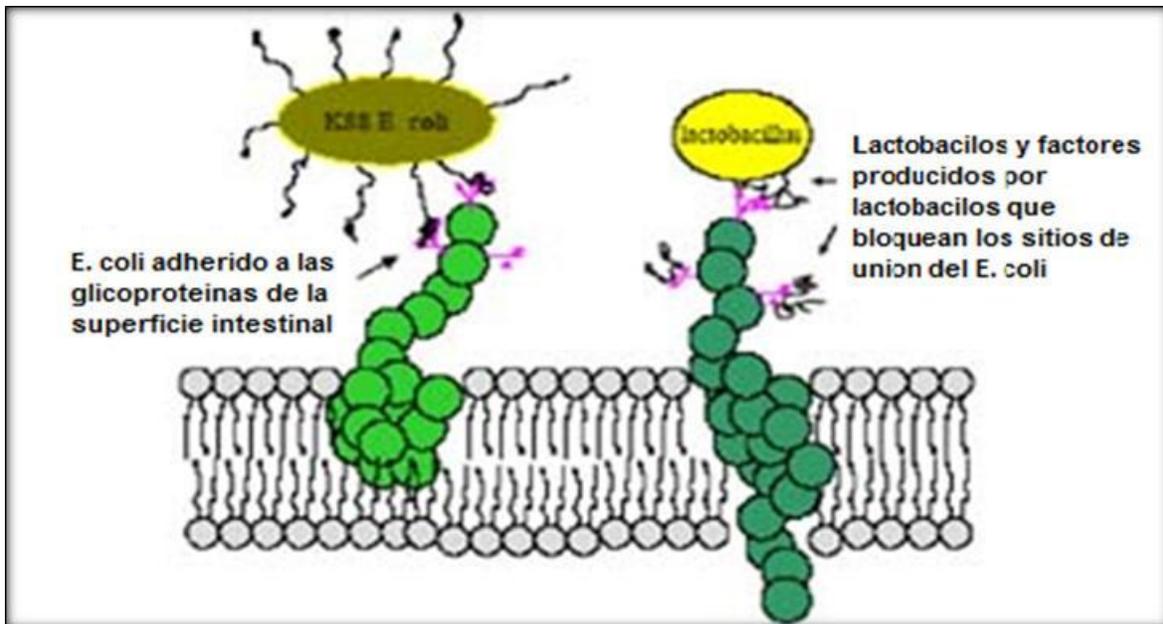
Según Fuller (1989), el mecanismo de acción de los Probióticos puede recaer en una o alguna de las siguientes áreas:

- A) Competencia por la adhesión en los receptores del epitelio intestinal y competición por los nutrientes
- B) Producción de sustancias antibacterianas
- C) Estimulación de la inmunidad.

#### **2.9.3.1. Competencia por la adhesión en los receptores del epitelio intestinal**

Según Fox (1994), es un mecanismo el cual se refiere a la capacidad de bacterias probióticas de competir con bacterias patógenas por un lugar en la pared intestinal y por nutrientes y menciona que la flora microbiana normal del tracto intestinal actúa como una barrera defensiva al impedir que el espacio del epitelio celular

quede disponible para los patógenos, o al crear un ambiente desfavorable para los mismos. Blomberg *et al.* (1993), reportaron que ciertos componentes indefinidos en un cultivo de lactobacilos *spp.* Inhibieron la adhesión de *E. coli* patogénico K88 en el cerdo. Ellos sugirieron que estos componentes producidos por lactobacilos *spp.* o éste por sí mismo limitan a los receptores para K88 en el intestino del cerdo de tal modo que previenen la colonización de *E. coli* patógeno (Fig. 1).



**Figura 1.** Descripción las bacterias residentes no patógenas (lactobacilos) pueden prevenir la colonización de patógenos (k88 *E. coli*) sobre la superficie intestinal. Adaptado de Mathew, 2001.

### 2.9.3.2. Producción de sustancias antibacterianas

Fox (1994), menciona que algunas bacterias probióticas son capaces de producir diferentes sustancias antimicrobianas del tipo de la bacteriocina, que inhibe los gérmenes que a menudo causan las infecciones además de producir ácido láctico, el cual “acidifica el medio intestinal”, creando un ambiente hostil para el desarrollo de bacterias nocivas, las cuales reducen significativamente su velocidad de multiplicación y comienzan a morir al no encontrar nutrientes.

### **2.9.3.3. Estimulación de la inmunidad**

Fuller (1989), reporto resultados y mostro que algunos lactobacilos usados como Probióticos son capaces de estimular el sistema inmune mediante dos vías: a) migración y multiplicación de los microorganismos Probióticos (como células viables) a través de la pared intestinal estimulando las partes más lejanas, y b) reconocimiento de organismos Probióticos muertos como antígenos que puedan estimular directamente el sistema inmune

### **2.10. El yoghurt en la alimentación animal**

Saloff-Coste, (1995), Amiot, (1991), Guarner *et al.* (1998), PROFECO (2006), mencionan que el yoghurt es un producto lácteo que se logra por la fermentación de la leche con microorganismos como *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacilos bulgaricus*, así mismo Varman *et al.* (1995), señala sus valiosas cualidades nutricionales ya que contiene energía, proteínas, vitaminas y minerales como calcio y fósforo por otra parte Shaasfma (2001), lo considera como alimento funcional ya que proporciona múltiples beneficios y ayuda a mejorar el estado de salud y bienestar. En el 2006 la PROFECO realizo análisis de laboratorios para comparar algunas características de varias marcas de yoghurt hechas en México (Cuadro 1).

### **2.11. Melaza de caña de azúcar**

Según la norma ICONTEC 587 de 1994, define la miel final o melaza (no cristalizable) al jarabe o liquido denso y viscoso, separado de la misma masa cocida final y de la cual no es posible cristalizar más azúcar por métodos usuales, Swan y karalazos (1990), por otra parte indican que el termino melaza se aplica al afluyente final obtenido en la preparación del azúcar mediante una cristalización repetida en el cual el proceso de evaporación y cristalización es usualmente repetido tres veces hasta el punto en el cual el azúcar invertido y la alta viscosidad de las melazas ya no permite una cristalización adicional de la sacarosa.

Cuadro 1. Análisis de laboratorio en distintos tipos de yoghurt realizado por la PROFECO (2006)

Denominación / Marca / Contenido neto / País de origen	Proteína Medida	Grasa	Bacterias lácticas vivas millones de ufc/g*
Yoghurt natural 0% Grasa sin azúcar/ <b>LaLa light</b> /150g./ México	4.2%	0.2%	830 a 860 <sup>1</sup>
Yoghurt natural/ <b>Santa Clara</b> /150g./ México	4.0%	2.1%	5300 <sup>1</sup>
Yoghurt natural/ <b>Alpura</b> /160g./ México	3.9%	4.3%	3200 <sup>1</sup>
Yoghurt natural/ <b>Normex</b> / 1L.	4.5%	3.1%	720 <sup>1</sup>
Yoghurt natural/ <b>Yoplait</b> /150g.	4.0%	2.7%	45000 <sup>1</sup>
Yoghurt natural sin grasa 0%/ <b>Vitalinea</b> <b>Danone</b> /150g./ México	4.5%	0.0%	320 <sup>1</sup>
Yoghurt light 0% grasa natural/ <b>D'</b> <b>CalidadChedraui</b> /1 kg./México.	2.9%	0.3%	40 <sup>1</sup>

ufc = \* unidades formadoras de colonia por mililitro, 1) Corresponde a la suma de *lactobacilos* y *Streptococcus*

Fajardo (2007), menciona que la melaza es una mezcla compleja que contienen sacarosa, azúcar invertido, sales y otros compuestos solubles en álcali que normalmente están presentes en el jugo de caña localizado, así como los formados durante los procesos de manufactura del azúcar. Además de la sacarosa, glucosa, fructosa y rafinosa, según Téllez (2004), también contiene minerales y aminoácidos (Cuadro 2).

Cuadro 2. Composición química de la melaza de caña de azúcar.

COMPONENTES	CONSTITUYENTES	CONTENIDO (p/p)	
<b>Componentes mayores</b>	Materia seca	78%	
	Proteína	3%	
	Sacarosa	60 - 63% (p/p)	
	Azúcares reductores	3 - 5% (p/p)	
	Sustancias disueltas (diferentes azúcares)	4 - 8%(p/p)	
	Agua	16%	
	Grasas	0.40%	
	Cenizas	9%	
	<b>Contenido de minerales</b>	Calcio	0.74%
		Magnesio	0.35%
Fósforo		0.08%	
Potasio		3.67%	
<b>Contenido de aminoácidos</b>	Glicina	0.10%	
	Leucina	0.01%	
	Lisina	0.01%	
	Treonina	0.06%	
	Valina	0.02%	
<b>Contenido de Vitaminas</b>	Colina	600 ppm	
	Niacina	48,86 ppm	
	Ácidopantoténico	42,90 ppm	
	Piridoxina	44 ppm	
	Riboflavina	4,40 ppm	
	Tiamina	0,88 ppm	

Fuente. Téllez, 2004.

Ariza y Gonzales (1997), indican que la melaza diluida es un substrato único para los procesos de fermentación ya que constituye un buen medio nutritivo para muchos microorganismos mesófilos y termófilos, tales como levaduras, hongos y bacterias, a pesar de su bajo contenido de fósforo.

Vega *et al.* (2007), indican que en el mercado internacional, la melaza se comercializa para alimento animal, la producción de alcohol, reprocesamiento industrial para extraer el azúcar contenida en ella y producciones industriales de levadura, ácido cítrico, lisina, entre otros.

## **2.12. El Vitafert**

Es un producto biológico obtenido por fermentación líquida, compuesto de bacterias lácticas, levaduras y sus metabolitos que funciona como Probiótico, capaces de producir cantidades apreciables de ácidos orgánicos de cadena corta como láctico, acético, propiónico, succínico y pirúvico, vitaminas y enzimas, elaborado a partir de yoghurt, melaza, agua y otros ingredientes. Además 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 la materia prima alimentaría sometida a su acción (Elías y Herrera, 2010).



Las variables microbiológicas se estudiaron bajo un diseño completamente al azar con 3 tratamientos (niveles de melaza) y 8 repeticiones por tratamientos, para cada día de fermentación. Lo anterior debido a que las diluciones para las siembras de los microorganismos difirieron entre los días de fermentación.

Cuadro 3. Distribución de los tratamientos.

FACTOR A Niveles de Melaza	FACTOR B Días de fermentación							
	0	1	2	3	6	9	15	30
5 % DE MELAZA	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
10 % DE MELAZA	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15	T16
15 % DE MELAZA	T17	T18	T19	T20	T21	T22	T23	T24

Para el análisis estadístico de la media de los datos se aplicó la dócima de Tukey (1953) y el procesamiento de los datos se realizó mediante el software R, Foundation for statistical computing, versión 2.10.1, 2009, para lo cual se utilizó el modelo siguiente en las variables fermentativas y bromatológicas:

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

Dónde:

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

$\mu$  = Media general

$A_i$  = Efecto del i-ésimo nivel del factor A (nivel de melaza)

$B_j$  = Efecto del j-ésimo nivel del factor B (días de fermentación)

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

$\epsilon_{ijk}$ =Error aleatorio

**Para las variables microbiológicas se utilizó el siguiente modelo:**

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \epsilon_{ij}$$

Dónde:

$Y_{ijk}$ =Variable de respuesta al i-ésimo tratamiento.

$\mu$ =Media general

$\tau_i$ =Efecto del i-ésimo nivel de melaza (5, 10 y 15%)

$\epsilon_{ijk}$ =Error aleatorio

### **3.3. Procedimiento experimental**

#### **3.3.1 Preparación del Vitafert**

Se elaboraron 10 litros (L) de Vitafert en 3 cubetas de plástico limpias con capacidad de 20L c/u con diferentes niveles de melaza (tratamientos) se prepararon por triplicado de acuerdo al cuadro 4. La pasta de soya y el pulido de arroz se compraron en la empresa ALBACA S.A de C.V. La urea y el sulfato de magnesio se adquirieron en la empresa de Fertilizantes y Productos Agropecuarios (FYPA) S.A. de C.V. Los minerales usados fueron de la marca FOSFORYSAL 70C la cual contiene según la etiqueta mínimo 70 g/kg de fosforo, 4 g/kg de zinc, 15 g/kg de hierro, 0.45 g/kg de cobre, 0.01g/kg de iodo, 140g/kg de calcio, 10g/kg magnesio, 4 g/kg de manganeso, 0.02g/kg de cobalto y 300g/kg máximo de sal, además de melaza de caña y salvado de trigo. El yoghurt utilizado

como inóculo de bacterias lácticas fue de la de la marca Yoplait natural y para completar el 100% se agregó agua purificada.

Se preparó 10 L de los diferentes tipos de Vitafert (tratamientos) con los porcentajes de los ingredientes indicados en el cuadro 4, estos fueron mezclados y agitados manualmente durante 5 minutos cada 2 horas (h) en las primeras 24 h, posteriormente se agitó manualmente cada 2 h en el día durante los días de fermentación estudiados.

Cuadro 4. Porcentaje de ingredientes utilizado en la elaboración de Vitafert con 3 niveles de melaza.

<b>Ingredientes</b>	<b>Tratamiento I</b>	<b>Tratamiento II</b>	<b>Tratamiento III</b>
<b>Melaza</b>	<b>5%</b>	<b>10%</b>	<b>15%</b>
<b>Pasta de soya</b>	4%	4%	4%
<b>Pulido de arroz</b>	4%	4%	4%
<b>Sales minerales</b>	0.5%	0.5%	0.5%
<b>Sulfato de magnesio</b>	0.3%	0.3%	0.3%
<b>Urea</b>	0.4%	0.4%	0.4%
<b>Yoghurt</b>	5%	5%	5%
<b>Agua</b>	<b>80.8%</b>	<b>75.8%</b>	<b>70.8%</b>

### 3.4. Indicadores microbiológicos

#### 3.4.1. Muestreo y siembra de microorganismos

Para el aislamiento y conteo de unidades formadoras de colonias (ufc) de la flora microbiana (lactobacilos, levaduras y bacterias totales), se tomaron 100ml de

solución en fermentación de cada cubeta previamente agitada los cuales se llevaron a una campana de extracción previamente esterilizada para efectuar las siembras. Seguidamente se realizar una serie de diluciones decimales de  $10^{-1}$  hasta  $10^{-10}$  tomando 0.5 ml como volumen de transferencia y dos tubos por dilución con 4.5 ml de un regulador PBS (8g de  $\text{NaCl}_2$ , 0.2g de KCl, 1.15g de fosfatodisódico de hidrógeno, 0.2 g de fosfato potásico de hidrogeno, aforado a 1 L con agua destilada estéril, con  $\text{pH} = 7.3 \pm 0.2$  a  $25^\circ\text{C}$ ) esterilizados previamente en autoclave a  $121^\circ\text{C}$  durante 15 minutos (m).

Las siembras se realizaron por duplicado en agar MRS para conteo de lactobacilos con la técnica de vaciado en placas Petri, agar nutritivo (AN) para siembra y conteo de bacterias totales, y agar papa dextrosa (PDA) para siembra y conteo de levaduras.

Las placas con agar MRS y AN se incubaron a  $28^\circ\text{C}$  durante 48 h y las de PDA se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  durante 72 h. Las placas con el medio de cultivo gelificado se enumeraron con marcador permanente para su posterior identificación durante el conteo de ufc.

Los medios de cultivos se prepararon según la las indicaciones de la etiqueta de cada frasco, posteriormente se esterilizaron en autoclave a  $121^\circ\text{C}$  durante 15 m, luego se colocaron en baño María a  $45^\circ\text{C}$  para prevenir su gelificación y en seguida se procedió a vaciar los medios de cultivo en placas Petri de 100 x 15 mm dentro de una campana de extracción, la cual previamente se limpió con alcohol y esterilizó con luz ultravioleta durante 15 m para evitar la contaminación de las muestras y los medios de cultivos utilizados.

En los días 0, 1, 2 y 30 de fermentación del Vitafert se sembraron muestra por duplicados a las diluciones  $10^{-1}$   $10^{-2}$   $10^{-3}$  y  $10^{-4}$ , a los días 3, 6, 9 y 15 las muestras se sembraron a las diluciones  $10^{-6}$   $10^{-7}$   $10^{-8}$   $10^{-9}$  y  $10^{-10}$ , y dos tubos por dilución.

### 3.5. Indicadores Fermentativos

El pH de los diferentes tipos de Vitafert se midió a los días 0, 1, 2, 3, 6, 9, 15 y 30 de fermentación para lo cual fue utilizado un potenciómetro portátil marca ULTRA BASIC PROBIOTEK, calibrado con sustancias buffer de pH 4 y 7, para medir esta variable se tomaron 50 ml de los diferentes tipos de Vitafert previamente agitado.

### 3.6. Indicadores Bromatológicos:

**Materia seca:** Para determinar esta variable, se utilizó 100 ml de los diferentes tipos de Vitafert y se depositaron en vasos de precipitado de 200 ml y se incubaron en una estufa a 60 °C hasta peso constante, aproximadamente 8 días, calculadas con la fórmula propuesta por AOAC (1995).

**Proteína cruda (PC):** El residuo sólido de la muestra después de secado se molió en un molino de martillo marca Thomas - Wiley modelo 4, con criba de 1 mm de acuerdo a la metodología propuesto por AOAC (1995).

**NNP x 6.25:** Esta variable 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 ácido tricloroacético, el cual se preparó pesando 20 gramos de ácido tricloroacético diluyéndolo en 60 ml de agua destilada, se agitó a 80 ° C, posteriormente se aforó a 100 ml con agua destilada.

1.-Se pesó 2 g de muestra y se depositó en un matraz Erlenmeyer 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 ácido tricloroacético, 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 propuesto por AOAC (1995), posteriormente se procedió a realizar los cálculos.

**Proteína verdadera (PV):** Esta se calculó por diferencia ( $PC - NNP \times 6.25$ )

## IV. RESULTADOS

### 4.1. Variable fermentativa

En relación al pH, este fue afectado ( $P < 0.001$ ) por los días de fermentación. El día 0 y 1 tienen los mayores valores sin diferencias entre ellos. En los siguientes días estudiados disminuyó linealmente hasta el día 6 donde se estabiliza. Para los días 6, 9, 15 y 30 no hay diferencias significativas. En relación a los niveles de melaza estudiados, no se encontró diferencias significativas (Cuadro 5).

Cuadro 5. Efecto del tiempo de fermentación y niveles de melaza en el pH del Vitafert.

Días de Fermentación	pH
0	5.35 <sup>a</sup>
1	5.46 <sup>a</sup>
2	4.34 <sup>b</sup>
3	4.10 <sup>c</sup>
6	3.95 <sup>cd</sup>
9	3.87 <sup>d</sup>
15	3.81 <sup>d</sup>
30	3.86 <sup>d</sup>
	EE $\pm$ 0.119 <sup>***</sup>
% de Melaza	pH
5	4.33 <sup>a</sup>
10	4.37 <sup>a</sup>
15	4.34 <sup>a</sup>
	EE $\pm$ 0.119

<sup>abcd</sup> Medias con diferentes superíndices en las mismas columna difieren a  $P < 0.05$  (Tukey 1980).

<sup>\*\*\*</sup>  $P < 0.001$

### 4.2. Variable bromatológica

En relación al porcentaje de MS se encontró interacción ( $P < 0.05$ ). Los mayores valores se presentaron en los días 30, 3 y 9 con 15% de melaza, sin embargo, los valores del día 9 con 15% de melaza son similares a los encontrados en el día 1 con 15% de melaza y a su vez, el valor de este último fue similar al de los días 0, 6, 15 con 15% de melaza (anexo 1). Sin embargo, hay tendencia de que el nivel

de melaza influye en el porcentaje de MS, independiente del día de fermentación, ya que los menores valores de MS se agrupan con menor nivel de melaza estudiado (5%), los valores intermedio con el 10% de melaza y los mayores valores con el 15% de melaza (figura 3).

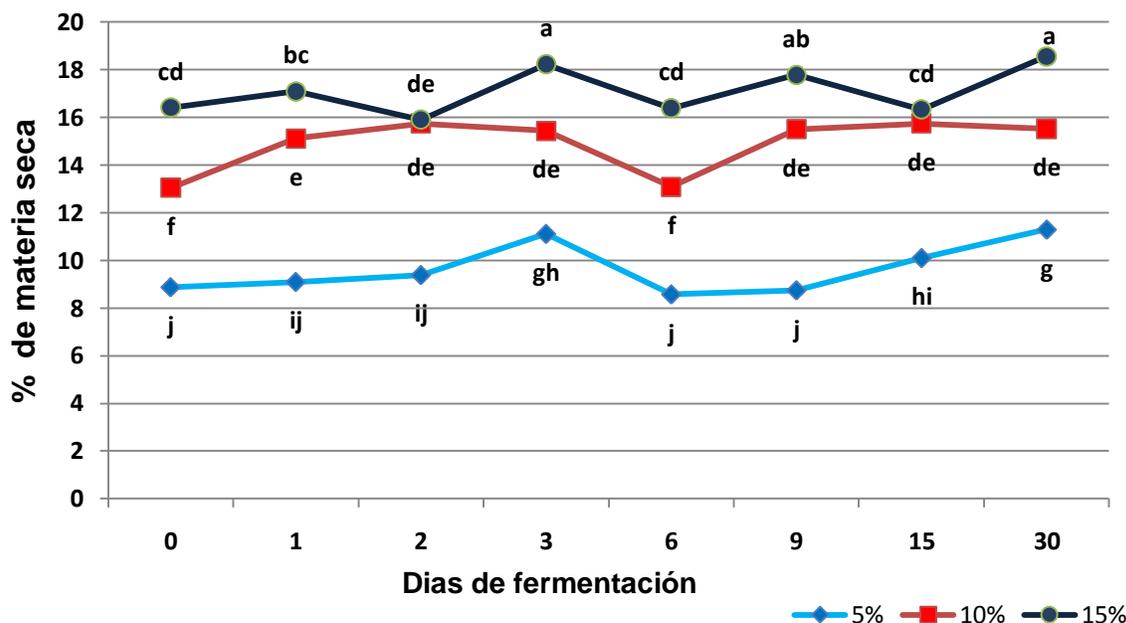


Figura 3.- Efecto del tiempo de fermentación y niveles de melaza en el porcentaje de materia seca del Vitafert

En relación al contenido de PC, esta es afectada ( $P < 0.001$ ) por los día de fermentación. Los mayores valores se obtuvieron en los días 0, 1 y 2, sin embargo, los valores obtenidos en el día 2 son iguales al día 3 y 15, no hay diferencias entre los días 3, 6, 9, 15 y 30. No se encontró diferencias significativas para los niveles de melaza estudiados (Cuadro 6).

La proteína verdadera fue afectada ( $P < 0.01$ ) por los día de fermentación. Tuvo un comportamiento similar a la proteína cruda, los mayores valores se obtuvieron en los días 0, 1 y 2, sin embargo, los valores obtenidos en el día 2 son iguales al día 15 y el valor de este último es igual a los días 3, 6, 9 y 30. En relación a los niveles de melazas estudiados, se encontró diferencias ( $P < 0.05$ ) entre tratamientos, el mayor valor de PV fue para el Vitafert con 15% de melaza en relación al Vitafert

con 5% de melaza. El Vitafert con 10% de melaza, tuvo valores similares al Vitafert con 5 y 15% de melaza.

A partir del día 3 se observó una disminución en el contenido de PB y PV cuyos valores se mantuvieron más o menos estables hasta el final del experimento con una relación de PV:PB de 94 %. El aumento en la concentración de melaza no produjo aumento en el contenido de PB pero si se observó incremento en el contenido de PV al aumentar la inclusión de melaza así como en la relación PV:PB (Cuadro 6).

En el relación al contenido de NNP x 6.25 este no fue afectado por los días de fermentación, sin embargo, fue afectado por los niveles de melaza ( $P < 0.001$ ), los mayores valores se encontró con 5 y 10% de melaza, sin diferencias entre ellos, pero si con respecto al 15% de melaza que presentó el menor valor (Cuadro 6).

Cuadro 6. Efecto del tiempo de fermentación y niveles de melaza en la proteína cruda y proteína verdadera del Vitafert

<b>Días de Fermentación</b>	<b>Proteína cruda</b>	<b>Proteína verdadera</b>	<b>NNP x 6.25</b>
0	26.71 <sup>a</sup>	25.34 <sup>a</sup>	1.38 <sup>a</sup>
1	26.92 <sup>a</sup>	25.38 <sup>a</sup>	1.54 <sup>a</sup>
2	26.24 <sup>ab</sup>	24.75 <sup>ab</sup>	1.49 <sup>a</sup>
3	24.92 <sup>bc</sup>	23.43 <sup>b</sup>	1.49 <sup>a</sup>
6	24.56 <sup>c</sup>	23.10 <sup>c</sup>	1.47 <sup>a</sup>
9	24.23 <sup>c</sup>	22.73 <sup>c</sup>	1.50 <sup>a</sup>
15	25.22 <sup>bc</sup>	23.81 <sup>bc</sup>	1.41 <sup>a</sup>
30	24.07 <sup>c</sup>	22.67 <sup>c</sup>	1.40 <sup>a</sup>
	<b>EE ± 0.914***</b>	<b>EE ± 0.973**</b>	<b>EE ± 0.20</b>
<b>Nivel de Melaza (%)</b>			
5	25.04 <sup>a</sup>	23.47 <sup>b</sup>	1.58 <sup>a</sup>
10	25.44 <sup>a</sup>	23.82 <sup>ab</sup>	1.62 <sup>a</sup>
15	25.65 <sup>a</sup>	24.45 <sup>a</sup>	1.20 <sup>b</sup>
	<b>EE ± 0.914</b>	<b>EE ± 0.914*</b>	<b>EE ± 0.20***</b>

<sup>abc</sup> Medias con diferentes superíndices en las mismas columna difieren a  $P < 0.05$  (Tukey 1980).

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

Cuadro 7. Efecto del tiempo de fermentación y niveles de melaza en los °Brix del Vitafert.

Días de Fermentación	Niveles de Melaza		
	5%	10%	15%
0	4.75 ± 0.75	7.75 ± 0.75	11.5 ± 0.5
1	7 ± 0.1	8 ± 1.0	12.25 ± 0.75
2	7 ± 2.0	9.75 ± 1.25	10 ± 1.0
3	6 ± 1.0	10 ± 1.0	9.25 ± 0.25
6	5 ± 0.2	8.5 ± 0.5	9.5 ± 0.5
9	5 ± 0.3	8 ± 0.5	8 ± 1.0
15	3 ± 0.2	6 ± 0.6	4.5 ± 0.5
30	---	2 ± 0.3	2 ± 0.5

EE± = Error Estándar

### 4.3. Variables microbiológicas

En relación a la dinámica de crecimiento de las bacterias ácido lácticas en el Vitafert, en el día 0 se encontraron las menores poblaciones de lactobacilos y estas no fueron afectadas por los niveles de melaza estudiados. En el día 1 se observa un crecimiento sin diferencias para los tratamientos estudiados, en el día 2 los lactobacilos siguen creciendo en los tratamientos con 5 y 10% de melaza, sin embargo, en el tratamiento con 15% de melaza no se observó crecimiento. En el día 3 los tratamientos con 5 y 10% de melaza mostraron sus mayores poblaciones y estas se mantuvieron hasta el día 9, en el caso del tratamiento con el 15% de melaza, en el día 3 alcanzó su mayor población y esta fue mayor a la de los tratamientos con 5 y 10% de melaza y se mantuvo hasta el día 15. En el caso del tratamiento con 5% de melaza, en el día 15 se observa que las poblaciones de lactobacilos empiezan a disminuir y continúan disminuyendo drásticamente en el día 30. Para el caso de los tratamientos con 10 y 15% de melaza, en el día 30, las poblaciones de lactobacilos disminuyen, sin embargo, estas son mayores a las que se encontraron con el 5% de melaza (Cuadro 8).

Cuadro 8. Efecto del tiempo de fermentación y niveles de melaza en la dinámica de crecimiento del lactobacilos (Log ufc/ml) en el Vitafert

Días de Fermentación	Niveles de Melaza		
	5 %	10 %	15 %
0	$4.80 \times 10^4 \pm 1.69^a$	$4.70 \times 10^4 \pm 0.05^a$	$4.74 \times 10^4 \pm 0.03^a$
1	$5.81 \times 10^5 \pm 0.03^a$	$5.80 \times 10^5 \pm 0.02^a$	$5.28 \times 10^5 \pm 0.23^a$
2	$6.07 \times 10^6 \pm 0.04^b$	$5.75 \times 10^6 \pm 0.16^c$	$5.76 \times 10^5 \pm 0.11^a$
3	$8.54 \times 10^8 \pm 0.02^b$	$8.60 \times 10^8 \pm 0.03^b$	$9.29 \times 10^9 \pm 0.13^a$
6	$8.29 \times 10^8 \pm 0.04^b$	$8.53 \times 10^8 \pm 0.04^b$	$9.36 \times 10^9 \pm 0.13^a$
9	$8.15 \times 10^8 \pm 0.06^b$	$8.35 \times 10^8 \pm 0.02^b$	$9.15 \times 10^9 \pm 0.05^a$
15	$7.67 \times 10^7 \pm 0.04^c$	$8.04 \times 10^8 \pm 0.03^b$	$8.93 \times 10^9 \pm 0.04^a$
30	$4.93 \times 10^4 \pm 0.09^c$	$5.19 \times 10^5 \pm 0.08^b$	$8.75 \times 10^5 \pm 0.05^a$

EE  $\pm$

Log. = Logaritmo, ufc = unidades formadoras de colonia.

En relación al crecimiento de las levaduras en el Vitafert, en el día 0 se encontraron las menores poblaciones sin diferencias entre tratamientos. En el día 1 mostraron un crecimiento sin diferencias entre tratamientos. Al día 2, en el tratamiento con 5% de melaza las poblaciones de levaduras disminuyen y presenta el menor valor en relación a los otros tratamientos estudiados, en relación al tratamiento con 10% de melaza la población se mantiene y en el tratamiento con 15% de melaza hay un crecimiento en relación al día 1 y presenta el mayor valor en relación a los otros tratamientos. En los siguientes días de fermentación no se encontró levaduras ya que se utilizaron diluciones más altas debido a que se esperaban mayor crecimiento y esto no sucedió (Cuadro 9).

Cuadro 9. Efecto del tiempo de fermentación y niveles de melaza en la dinámica de crecimiento de levaduras (Log. ufc/ml) en el Vitafert.

Días de Fermentación	Niveles de Melaza		
	5 %	10 %	15 %
0	$4.12 \times 10^4 \pm 0.06^a$	$4.26 \times 10^4 \pm 0.04^a$	$5.42 \times 10^4 \pm 0.04^a$
1	$5.17 \times 10^5 \pm 0.07^a$	$5.55 \times 10^5 \pm 0.03^a$	$4.43 \times 10^5 \pm 0.63^a$
2	$4.29 \times 10^4 \pm 0.09^c$	$7.63 \times 10^5 \pm 0.15^c$	$3.65 \times 10^6 \pm 0.53^a$
3	-	-	-
6	-	-	-
9	-	-	-
15	-	-	-
30	-	-	-

EE ±: Error estándar

Log. = Logaritmo, ufc = unidades formadoras de colonia

Con relación al crecimiento de bacterias totales en el Vitafert, al día 0 en el tratamiento con 15% de melaza se encontró las menores poblaciones en relación a los tratamientos con 5 y 10% de melaza, los cuales no fueron diferentes estadísticamente entre ellos. En el día 1 no hubo diferencias entre los tratamientos estudiados, aunque en el tratamiento con 15% de melaza hubo un crecimiento en relación al día 0. En el día 3 en el tratamiento con 15% de melaza las poblaciones fueron similares a las del día 1, sin embargo, en los tratamientos con 5 y 10% de melaza no se encontraron poblaciones de bacterias totales a la misma dilución del tratamiento con 15% de melaza (Cuadro 10).

Cuadro 10. Efecto del tiempo de fermentación y los niveles de melaza en la dinámica de crecimiento de bacterias totales (Log ufc/ml) en el Vitafert

Días de Fermentación	Nivel de Melaza		
	5 %	10 %	15 %
0	4.56 x 10 <sup>4</sup> ± 0.04 <sup>a</sup>	4.31x 10 <sup>4</sup> ± 0.09 <sup>a</sup>	4.25x 10 <sup>3</sup> ± 0.02 <sup>b</sup>
1	4.82 x 10 <sup>4</sup> ± 0.02 <sup>a</sup>	4.60 x 10 <sup>4</sup> ± 0.13 <sup>b</sup>	5.0 x 10 <sup>4</sup> ± 0.03 <sup>a</sup>
2	-	-	4.19 x 10 <sup>4</sup> ± 0.08 <sup>a</sup>
3	-	-	-
6	-	-	-
9	-	-	-
15	-	-	-
30	-	-	-

EE ±

Log. = Logaritmo, ufc = unidades formadoras de colonia

#### 4.4. Costo de producción del Vitafert

En relación al costo de elaboración del Vitafert, es mayor a medida que se incrementan los niveles de melaza (Cuadro 11), pero estos se reducen cuando ya se tiene preparado el producto (Cuadro 12) ya que una vez obtenido el Vitafert fermentado en estado líquido contiene alta poblaciones de lactobacilos y ya no se requiere agregar el yoghurt.

Cuadro 11. Costos del Vitafert según los tratamientos estudiados incluyendo el yoghurt como inóculo.

Ingredientes	Costos, \$/kg	Costos de cada tratamiento		
		Tratamiento I 5% de melaza	Tratamiento II 10% de melaza	Tratamiento III 15% de melaza
Melaza	2.8	14.00	28.00	42.00
Pasta de soya	6.5	26.00	26.00	26.00
Pulido de arroz	2.4	9.60	9.60	9.60
Sales minerales	10	5.00	5.00	5.00
Sulfato de magnesio	5.1	1.53	1.53	1.53
Urea	9	3.60	3.60	3.60
Yoghurt	22	110.00	110.00	110.00
Agua	0	0	0	0
Costo (\$)de 100 litros de Vitafert		\$ 169.73	\$ 183.73	\$ 197.73
Costo (\$) en 1 litro de Vitafert		\$ 1.70	\$ 1.84	\$ 1.98

Cuadro 12. Costos del Vitafert según los tratamientos estudiados no incluyendo el yoghurt como inóculo

Ingredientes	Costos, \$/kg	Costos de cada tratamiento		
		Tratamiento I 5 % de melaza	Tratamiento II 10 % de melaza	Tratamiento III 15 % de melaza
Melaza	2.8	14.00	28.00	42.00
Pasta de soya	6.5	26.00	26.00	26.00
Pulido de arroz	2.4	9.60	9.60	9.60
Sales minerales	10	5.00	5.00	5.00
Sulfato de magnesio	5.1	1.53	1.53	1.53
Urea	9	3.60	3.60	3.60
Yoghurt	22	0.00	0.00	0.00
Agua	0	0	0	0
Costo (\$)de 100 litros de Vitafert		\$ 59.73	\$ 73.73	\$ 87.73
Costo (\$) en 1 litro de Vitafert		\$ .59	\$ .73	\$ .87

## V. DISCUSIÓN

El menor valor de MS que se encontró con los niveles más bajos de Vitafert (5%) con respecto a los mayores niveles (10 y 15%), pudiera deberse al efecto de dilución de la melaza en el agua, ya que el tratamiento con menos melaza, se le adicionaba más agua.

La disminución del pH que se observó durante los días de fermentación líquida del Vitafert, pudo deberse a la producción del ácido láctico que producen los lactobacilos como producto final de su metabolismo (Canibe *et al.*, 2001; Madigan *et al.*, 2004); a pesar de que esta variable no fue posible medirla en este estudio, se encontró que las poblaciones del lactobacilos se incrementaban con el tiempo de fermentación hasta el día 15 lo cual coincide con el tiempo de estabilización del pH de nuestro estudio.

Sahlin (1999) y García *et al.* (2008), mencionan que existe una fuerte correlación entre el pH y el crecimiento de los lactobacilos, las correlaciones encontradas por García *et al.* (2008) fue de  $r = 0.79^{***}$  en la fermentación líquida de la melaza de caña de azúcar con urea y pollinaza fresca, el pH disminuyó de 6.3 a 4.2 a las 24 h de fermentación y coincidió con el incremento de las bacterias ácido lácticas.

Por otra parte, van Winsen *et al.* (2001), demostraron que además del ácido láctico, los ácidos grasos volátiles (ácido acético, butírico, propiónico, entre otros) pueden disminuir el pH de los productos fermentados. Canibe *et al.* (2003), mencionaron que tras aproximadamente tres días de fermentación en un alimento líquido, el aumento de los lactobacilos y la concentración de ácido láctico coincide con un descenso del pH por debajo de 4.5, además en otros estudios realizados por Elías y Lezcano (1993), Lezcano *et al.* (1994), Castillo (2009) y Martínez (2010), se obtuvieron resultados similares y efectivamente, en nuestro estudio se puede corroborar.

Por otro lado, la tendencia al incremento del pH en el día uno, pudiera estar relacionado a la adición de la urea, ya que se ha encontrado en otros estudios Elías *et al.*, (1990) Elías y Herrera (2010) y Martínez (2010) que el amoníaco proveniente de la urea incrementa el pH, sin embargo el porcentaje de urea que se le agregó al Vitafert en este estudio fue bajo (0.4 %), por lo cual posiblemente no se detectó diferencias estadísticas.

En relación a las levaduras, a partir del día 3 no incrementaron su población ó disminuyeron, ya que no se encontraron en las diluciones más altas estudiadas, esto pudiera deberse a la inhibición de su crecimiento por la disminución del pH del medio. García *et al.* (2008), indica que el crecimiento de las levaduras puede inhibirse ante la presencia de altas concentraciones de ácidos.

Según Pandey *et al.* (2001), cada microorganismo posee un rango de pH en el que puede vivir adecuadamente (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).

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 (Hazan *et al.* 2004 y Schüller *et al.* 2004).

En relación a las bacterias totales al día 2 no se encontraron en los tratamientos con 5 y 10% de melaza, posiblemente porque en estos tipos de Vitafert la fermentación fue más rápida lo cual fue verificado por la consistencia, color, olor y sabor. Posiblemente el pH afectó a las bacterias totales de la misma forma que fue explicado anteriormente para las levaduras. Al respecto, Feoli *et al.* (1995) indica que a mayor concentración de sacarosa la velocidad de crecimiento del microorganismo es menor.

La disminución de los °Brix durante el tiempo de fermentación, según (Feoli *et al.*, 1995) está asociado a la utilización de la sacarosa del sustrato y esto pudo haber influido en la disminución de las poblaciones de lactobacilos de nuestro estudio en el día 30 de fermentación ya que también se observó una disminución de los °Brix.

Con respecto a los altos niveles de PC y PV al inicio de la fermentación en los tratamientos estudiados, pudiera deberse al aporte de estos nutrientes que hace la pasta de soya, pulido de arroz, urea y la melaza, principalmente durante la preparación del Vitafert.

Aunque el descenso del pH durante el proceso de fermentación independientemente del nivel de melaza estudiado afectó la concentración de PB y PV de forma negativa, el descenso fue 2.67 % igual para ambos indicadores, lo que pudo estar relacionado con volatilizaciones de fracciones de Nitrogeno, probablemente  $\text{NH}_3$ , durante el proceso de manipulación y secado de las muestras y a su vez por el efecto negativo que se produjo sobre la población de las bacterias totales y las levaduras.

En relación a los resultados obtenidos en este estudio, en general, podemos decir que el Vitafert es un aditivo biológicamente activo preparado con urea, pasta de soya, pulido de arroz, Sales minerales, Sulfato de magnesio, Agua, yoghurt natural de la marca comercial Yoplait como fuente de bacterias ácido lácticas y Melaza de caña de azúcar como fuente de carbono, fermentado en estado líquido, con un

valor de pH alrededor de 4, cuenta con una población de lactobacilos de  $9.29 \times 10^9 \pm 0.13$  y  $3.65 \times 10^6 \pm 0.53$  de levaduras por mililitro de Vitafert, presenta un 18 % de materia seca, 24.92 % de proteína cruda, 23.43 % proteína verdadera y 1.49 % de nitrógeno no proteínico, el cual se recomienda utilizar a partir del día tres de su preparación cuando ya está fermentado. El litro de Vitafert tiene un costo de 1.98 pesos y varía según los costos de sus ingredientes, reduciendo los costos a 0.87 pesos después del día 15 cuando se recomienda guardar un 20 % del Vitafert fermentado y tomarlo como fuente de inóculo, para realizar nuevamente el aditivo y así solo se agregarían los demás ingredientes y el agua sin el yoghurt.

## **VI. CONCLUSIONES**

A partir del día 15 hay disminución en las poblaciones de lactobacilos en todos los tratamientos estudiados.

El vitafert con 15 % de melaza presento mayores contenido de bacterias acido lacticas y mayor porcentaje de materia seca en relacion a los otros tratamientos.

Con los menores niveles de melaza (5 y 10 %) la fermentacion del vitafert es mas acelerada en los primeros días, pero lapoblación de lactobacilos disminuye más rápido durante en el tiempo de fermentación con el menor nivel de melaza.

## **VII. RECOMENDACIONES**

Para volver a preparar el Vitafert antes de los 15 días, se recomienda agregar todos los ingredientes indicados en el cuadro 4 sin el inóculo (yoghurt natural), dejando el 20% del Vitafert inoculado.

Agregar inóculo (yoghurt natural de la marca Yoplait) despúes de los 15 días de haber preparado el Vitafert para repoblar las poblaciones de lactobacilos .

## VIII. LITERATURA CITADA

- AOAC., 1995. *Official Methods of Analysis*. 16th Ed. Off. Agric. Chem., Washington, D.C., U.S.A.
- Ariza B. y González M., 1997. Producción de proteína unicelular a partir de levaduras y melaza de caña de azúcar como sustrato. Tesis de pregrado Bacteriología. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de ciencias, Departamento de Bacteriología. Bogotá. Colombia. 22-27p.
- Auclair E., 2001. Yeast as an example of the mode of action of probiotics in monogastric and ruminant species. In Brufau J. (ed). Feed manufacturing in the Mediterranean region. Improving safety: From feed to food. Zaragoza. 45-53p.
- Bernstein J., 1983. Análisis de alimento. Eds. Wintra, A. L. y Winto, K. B. Tomo I. Ed. Pueblo y Educación. 84.
- Blomberg L. Conway P., 1991. Influence of raffinose on the relative synthesis rate of K88 fimbriae and the adhesive capacity of *Escherichia coli* K88. *Microb Pathog.* Aug;11(2):143–147
- Camí, J. Méndez V. R. Suñén P. Redes E., 2008. *Evolución de la productividad científica de España en Biomedicina (1981-2006)*.; 10: 24-9 (<http://www.prbb.org/bac/publicacions/Redes.pdf>)
- Canibe N. and Jensen B. B., 2003. Fermented and non-fermented liquid feed to growing pigs: Effect on aspects of gastrointestinal ecology and growth performance. *J. Anim. Sci.* 81: 2019-2031.
- Canibe N. Miquel N., Miettinen H., and Jensen, B. B., 2001. Effect of addition of formic acid and starter cultures to liquid feed on pH, microflora composition, organic acid production and ammonia production. 15th Forum for Applied Biotechnology, Gent, Belgium, 24-25 September, Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent, 66/3b: 431-434.
- Cañón G., Aldama O., 1988. Estudio de la fermentación alcohólica por cochada empleando reactores de lecho fijo. Proyecto de grado para optar por el título de Ingeniero Químico, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Casas., 1991. Potencial de la investigación biotecnológica agrícola en México. *Revista Mexicana de Sociología UNAM* vol. 50 no.1 pp 121-146.

- Castillo, Yamicela, 2009. Fermentación “in vitro” para obtener la levadura *Candida norvegensis* en mezclas de alfalfa con bagazo de manzana fermentado y sus efectos sobre la actividad microbiana ruminal. Tesis de doctor en Filosofía. Universidad Autónoma de Chihuahua, México.
- Castro, G. B., Bustos, V.G., Ramírez J, A. 2007., Aprovechamiento biotecnológico de la melaza de caña de azúcar para la producción de ácido láctico utilizando *Lactobacillus Rhamnosus.*, U.A.M. Mante – UAT. Cd. Mante, Tam.. Dpto.de Ciencia y Tecnología, U.A.M. Reynosa-Aztlán –UAT. Reynosa, Tam.
- Chesson A., 1993. Probiotics and other intestinal mediators. In *Principles of Pig Science*, (Ed. DJA Cole, J Wiseman and MA Varley), Nottingham University Press, Loughborough-Nottingham, U.K. 197–214p.
- Comisión Europea., 2006. Hacia una futura política marítima de la Unión: perspectiva europea de los océanos y mares. Luxemburgo: Oficina de Publicaciones Oficiales de las Comunidades Europeas.
- Eláis, A. y Herrera, F.R. 2010. Producción de alimento para animales a través de procesos biotecnológicos sencillos con el empleo de Microorganismos Eficientes Benéficos Activados (MEBA). Vitafert. Instituto de Ciencia Animal, La Habana, Cuba.
- Elías A., Herrera R., 2008. Producción de alimento para animales a través de procesos biotecnológicos sencillos, con el empleo de microorganismos beneficiosos activados (MEBA). Vitafert. Primera versión. (Aun en imprenta).
- Elías, A. y Lezcano O., 1993. Efecto de la fuente de N y algunos factores de crecimiento en la población de levaduras que se establecen en la producción de Saccharina. *Rev. Cubana Cienc. Agríc.* 28:319.
- Elías, A., Lezcano, O., Cordero, J. y uintana, 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.
- FAO., 1998. (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). La fermentación en pequeña escala. En: *Agricultura21*. <<http://www.fao.org/ag/esp/revista/9812sp3>. Consultado: 7 de septiembre del 2005.

- FAO., 2002. (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación) y la OMS (Organización Mundial de la Salud), PRIMER FORO GLOBAL DE LOS REGULADORES DE SEGURIDAD ALIMENTARIA Marrakech (Marruecos).
- FAO., 2003. (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). Estudio FAO investigación y tecnología 8. Biotecnología agrícola para países en desarrollo. Resultado de un foro electrónico. Roma. <[http://www.fao.org/documents/show\\_cdr.asp?url\\_file=/DOCREP/004/Y2729S/y2729s00](http://www.fao.org/documents/show_cdr.asp?url_file=/DOCREP/004/Y2729S/y2729s00). Consultado: 7 de septiembre del 2005.
- Fox S., 1994. Probióticos en la nutrición animal. Mundo Porcino – No 17 Ene-Feb 1994. 28-32p.
- Frazzetto G., 2003. White biotechnology». EMBO reports 4 (9): pp. 835-837 <http://www.nature.com/embor/journal/v4/n9/full/embor928.html>.
- Fuller R., 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66: 365-378.
- García Y., Elías A., Nereyda A., F.R. Herrera., Odalys N., y Oraida., 2008. Crecimiento de bacterias ácido lácticas y levaduras durante la fermentación líquida de excretas de pollos de ceba para la obtención de probióticos. *Rev. Cubana Cienc. Agríc.* 36:361
- Gauthier R., 2002. La Salud intestinal: clave de la productividad (El caso de los ácidos orgánicos). Segundo Precongreso Científico Avícola IASA. XXVII Convención ANECAWPDC. Puerto Vallarta. Jalisco, México.
- Guarner, F; Schaafsma, GJ., 1998. Probiotics, *Int J Food Microbiol*, 39:237- 238.
- Guillot J.F., 1998. Les probiotiques en alimentation animale. *Cahiers Agricultures*, 49-54.
- Hazan R., Levine, A., Abeliovich, H., 2001. Benzoid acid, a weak organic acid food preservative, exerts specific effects on intracellular membrane trafficking pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environm. Microbiol.* 70:4449
- Jensen B.B. and Mikkelsen L., 1998. Feeding liquid diets to pigs. In: *Recent Advances in Animal Nutrition*. (Eds.) P.C. Garnsworthy and J. Wiseman, Nottingham University Press.
- Jones Mark., 2002. Una evolución de la democracia presidencialista argentina: 1983 - 1995, en Scout Mainwaring y Matthew Shugart (Comps.) *Presidencialismo y democracia en América Latina*, Aires. Ed. Paidós, Buenos Aires.

- Krishna C., 2005 Critical Solid-State Fermentation Systems-An Overview Reviews in Biotechnology; ProQuest Agriculture Journals pp 30.
- Lezcano, P. Elías, A. Martí, J. y Rodríguez, Y. 1994. Nota sobre el efecto de la altura de la capa de fermentación de caña molida en la producción de Saccharina Rústica. . Rev. Cubana Cienc. Agric. 8:327.
- Lilly D.M., Stillwell RH., 1965. *Probiotics*. Growth promoting factors produced by micro-organisms. Science 147:747–8.
- Ljungh Åsa, Wadström Torkel E., 2009. Lactobacillus Molecular Biology: From Genomics to Probiotics. Caister Academic Press.
- López M., García, G., Quintero R., 2003. Biotecnología alimentaria, LIMUSA, Noriega Editores.
- Ludovico P., Sousa M.J., Silva M.T., Leão, C. y Côrte R. M., 2001. Saccharomyces cerevisiae commits to a programmed cell death process in response to acetic acid. Microbiol. 147:2409
- Madigan M. T, Martinko, J. M. y Parker J., 2004. Brock Biología de los Microorganismos, 10ª edición. Ed. Prentice-Hall, Madrid.
- Martínez, E. 2010. Efecto de niveles de Vitafert y carbonato de calcio en la obtención del Sacchapulido. Tesis de Ingeniero en Zootécnia. Univ. De la Chontalpa, Cárdenas, Tabasco, México.
- Mathew A., Jackson F. and Saxton A., 2001. Effects of antibiotic regimens on resistance of *Escherichia coli* and *Salmonella* serovar Typhimurium in swine. J. Swine Health Prod.
- Mitchell D.A., Berovic M. y Krieger N., 2002. Overview of solid state bioprocessing. Biotechnology annual Review. Elsevier Science. Animal Feed Science and technology. 8:183-200.
- Ochave J. M., 2003. EASEAN Task Force, PNUD, APDIP (ed.): «Genes, technology and policy». Consultado el 15/11/2007.
- Pandey A., Soccol C.R., Rodríguez L., J.A. and Nigam, P., 2001. Solid-state fermentation in biotechnology. Fundamentals and applications. Asiatech Publishers, Inc. New Delhi. 221 p.
- Parker, R. B. 1974. Probiotics, the other half of the antibiotic story. Anim. Nutr. Health. 29:4-8.

- Pollmann D. S., 1992. Probiotics in swine diets. In: D.A. Leger and S. K. Ho (Ed.) *Proceedings of the International Round Table on Animal Feed Technology. Biotechnology-Research and Scientific Regulation.* Agriculture Canada, Ottawa. 65-74p.
- PROFECO., 2006. (Procuraduría Federal del Consumidor). Pruebas realizadas diferentes marcas de yoghurt en México. De acuerdo a las normas de Reglamento de control sanitario de productos y servicios NMX-F-703-COFOCALEC-2004. Sistema producto, Leche y producto lácteo (o alimento lácteo) fermentado o acidificado. Denominaciones. Especificaciones y métodos de prueba.
- Quintero R., 1974. Ingeniería Bioquímica. Editorial Alhambra Mexicana, S.A. 1ra. Edición. México. Pág. 17-21.
- Roberfroid B., 2000. Prebiotics and probiotics: are they functional foods?. *American Journal of Clinical Nutrition* 71, 1682-1687.
- Roe A.J., Byrne O, McLaggan C. y Booth, I.R., 2002. Inhibition of *Escherichia coli* growth by acetic acid: a problem with methionine biosynthesis and homocysteine toxicity. *Microbiol.* 148:2215.
- Ruiz L., Rodríguez, J. Rodríguez H. Contreras E., 2007. Diseño de biorreactores para la fermentación en medio sólido. *Revista Mexicana de ingeniería química.* Volumen 6 Número 001 pp33-40.
- Sahlin P., 1999. Fermentation as a method of food processing production of organic acid, pH development and microbial growth in fermenting cereals. Licentiate thesis. Lund Institute of Technology y Lund University. USA.
- Saloff-Coste C., 1995. Fermented milk: effects on the immune system. *Denone world Newsletter*; 9:2-8. . *yogur: Elaboración y valor nutritivo.* Fundación española de la nutrición. Madrid .
- Sancho R., 2004. Indicadores de ciencia y tecnología Iberoamericana/Interamericano. Buenos Aire, Argentina.
- Sanders M. E., 2003. Probiotics: considerations for human health. *Nutr. Rev.* 61:91-99
- Schrezenmeir J. and de Vrese, M., 2001. Probiotics, prebiotics, and synbiotics – approaching a definition. *Am .J. Clin. Nutr.* 73 (suppl): 361s-364s.
- Smith J. E., 2006. Emeritus Professor of Applied Microbiology, University of Strathclyde, Glasgow and Chie.

- Swan, H. y Karalazos A., 1990. Las melazas y sus derivados. Revista Tecnológica. Geplacea. No. 19. España. 78 – 82p.
- Téllez D., 2004. Caracterización de las melazas empleadas en el proceso fermentativo de la destilería San Martín – Industria de Licores del Valle. Trabajo de grado. Universidad del Valle, Santiago de Cali.
- Tronconi G., 2003. Fermentaciones aplicadas a la industria de alimentos Universidad del Valle Contribución a la II Muestra Agroindustrial, Universidad del Cauca, Facultad ciencias agropecuarias, Popayán.([www.revistaindustriayalimentos.com/r20/tecnologia.htm](http://www.revistaindustriayalimentos.com/r20/tecnologia.htm) - 21k) pp.4
- van Winsen, R., Urlings, B.A.P., Lipman, L.J.A., Snijders, J.M.A., Keuzenkamp, D., Verheijden, J.H.M. & van Knapen, F., 2001. Effect of fermented feed on the microbial population of the gastrointestinal tracts of pigs. Appl. Environm. Microbiol. 67:3071
- Varman A. H., Sutherland J. P. 1995. Leche y productos lácteos. Tecnologías químicas ymicrobiológicas. Editorial Acriba, Zaragoza. Pp. 13-70.
- Vázquez H.J. 2007. Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas, INGENIERÍA Investigación y Tecnología VIII. 4. 249-259.
- Vega B. J., Delgado M. K., Sibaja B. M., Alvarado A. P., 2007. Uso alternativo de la melaza de la caña de azúcar residual para la síntesis de espuma rígida de poliuretano (ERP) de uso industrial. Technol. Ciencia Ed. (IMI) vol. 22 núm. 2, 101.
- Vienegra G., 1984. Lactic acid Fermentations. Basic principles and application. Mexico. 11 P: 1-24.

## IX. ANEXOS

Anexo 1. Efecto del tiempo de fermentación y niveles de melaza en el porcentaje de materia seca del Vitafert.

Días de fermentación	Nivel de melaza (%)	% de materia seca
0	5	8.88 <sup>l</sup>
0	10	13.05 <sup>f</sup>
0	15	16.41 <sup>cd</sup>
1	5	9.10 <sup>ij</sup>
1	10	15.11 <sup>e</sup>
1	15	17.10 <sup>bc</sup>
2	5	9.40 <sup>ij</sup>
2	10	15.75 <sup>de</sup>
2	15	15.90 <sup>de</sup>
3	5	11.10 <sup>gh</sup>
3	10	15.43 <sup>de</sup>
3	15	18.23 <sup>a</sup>
6	5	8.56 <sup>l</sup>
6	10	13.09 <sup>f</sup>
6	15	16.39 <sup>cd</sup>
9	5	8.75 <sup>l</sup>
9	10	15.50 <sup>de</sup>
9	15	17.79 <sup>ab</sup>
15	5	10.11 <sup>hi</sup>
15	10	15.74 <sup>de</sup>
15	15	16.34 <sup>cd</sup>
30	5	11.30 <sup>g</sup>
30	10	15.52 <sup>de</sup>
30	15	18.56 <sup>a</sup>

EE± 0.36\*

1) <sup>abcdeghij</sup> Medias con diferentes superíndices en las mismas columna difieren a P<0.05 (Tukey 1980).

2) \* P < 0.05