

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA



Casa Abierta al Tiempo

**"CARACTERIZACION E IDENTIFICACION BIOQUIMICA DE UN
PRODUCTO DE FERMENTACION SOLIDA, CON ACTIVIDAD
PROBIOTICA"**

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA**

P R E S E N T A

Q. F. B. MARCOS MENESES MAYO

DIRECTOR DE TESIS: DR. GERARDO SAUCEDO CASTAÑEDA

CO-ASESOR: DR. GUSTAVO VINIEGRA GONZALEZ

ASESOR EXTERNO: DR. ANGEL RAFAEL TRIGOS LANDA

MEXICO, D. F.

1998

AGRADECIMIENTOS:

A Dios:

Por permitirme relizar una meta más en este maravillo mundo.

A mis padres y hermano:

CON EL CARIÑO DE SIEMPRE, agradeciendo el milagro de mi existencia y sobre todo por creer en mi en cada una de las metas que he logrado.

A mis compañeros de la planta piloto 4 de biotecnología:

Alex, Martha, Jesús, Luciano, Tania, Cristobal, Araceli, Gerardo, Rosario, Ines..... Por su apoyo y compañerismo durante mi estancia en esta universidad.

A mis asesores de tesis:

Dr. Gerardo Saucedo Castañeda y Dr. Gustavo Viniegra González, agradeciendo su guía en este estudio y sobre todo por compartir sus conocimientos en mi formación profesional.

Muy especialmente al Dr. Angel Rafael Trigos Landa

Por compartir esta experiencia de investigación, agradeciendo las atenciones que se brindaron en el laboratorio de Biotecnología y productos naturales de la Universidad de las Américas Puebla.

Al Grupo de investigación de la planta piloto 4 de biotecnología:

Dr. Ernerto Favela Torres
Dr. Mariano Gutierrez Rojas
Dr. Sergio Huerta Ochoa

Agradeciendo su apoyo y momentos compartidos en este laboratorio de investigación.

CONTENIDO

Contenido	I
Indice de Figuras	VI
Indice de Tablas	VIII
 1. INTRODUCCION	 1
 2. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS	 5
2.1. Fermentación sólida (FS)	6
2.1.1. <i>Ventajas y desventajas</i>	6
2.1.2. <i>Sustratos y microorganismos empleados</i>	7
2.2. Pasta de copra	8
2.2.1. <i>Producción mundial de la pasta de copra</i>	10
2.3. Probióticos	11
2.3.1. <i>Importancia en la nutrición animal</i>	12
2.3.2. <i>Importancia industrial</i>	14
2.3.3. <i>Probióticos comerciales en México</i>	15
2.4. Rumiantes	17
2.4.1. <i>Definición y clasificación</i>	17
2.4.2. <i>Anatomía del conducto gastrointestinal de los rumiantes</i>	18
2.4.3. <i>Acidosis en rumiantes</i>	19
2.4.4. <i>Microorganismos ruminales y su entorno ambiental</i>	20

3. OBJETIVOS	23
3.1. Objetivo general	24
3.2 Objetivos específicos	24
4. MATERIALES Y MÉTODOS	25
4.1. Microorganismos empleados	27
4.1.1. Conservación y reactivación de cepas	28
4.2. Medios de cultivo	29
4.2.1. Medio de cultivo para hongos filamentosos y levaduras	29
4.2.2. Medio de cultivo para microorganismos anaerobios	30
4.3. Materias primas y sustratos utilizados	33
4.4. Condiciones de cultivo en columnas de fermentación con aireación forzada y difusión simple	33
4.5 Tratamiento de muestras de productos obtenidos por FS	36
4.5.1. Preparación de probióticos comerciales y productos de FS para el análisis de actividad probiótica	37
4.5.2. Técnica de ultrafiltración	39
4.6. Evaluación de la actividad probiótica	40
4.7. Tratamiento de muestras realizado para probar el efecto probiótico	40
4.8. Técnicas analíticas	41

4.8.1. <i>Conteo de esporas</i>	41
4.8.2. <i>pH</i>	42
4.8.3 <i>Pérdida de materia seca (PMS)</i>	43
4.8.4 <i>Actividad de agua (a_w)</i>	43
4.8.5. <i>Humedad</i>	44
4.8.6. <i>Biomasa (Densidad óptica)</i>	44
4.8.7. <i>Biomasa (Peso seco)</i>	45
4.8.8 <i>Acido L-Láctico</i>	46
4.8.9. <i>Acidos grasos volátiles</i>	47
4.8.10 <i>Análisis de gases (Metabolímetro)</i>	49

4.9. Identificación química de compuestos 49

4.9.1. <i>Extracción con disolventes de diferente polaridad</i>	50
4.9.2. <i>Purificación de compuestos</i>	52
4.9.3. <i>Identificación de compuestos</i>	55

5. RESULTADOS Y DISCUSION 56

5.1. Adaptacion y crecimiento de cepas de hongos filamentosos en dos medios de cultivo (PDA y PCS) 57

5.1.1. <i>Crecimiento radial en caja petri con medios PDA Y PCS</i>	57
5.1.2. <i>Crecimiento axial en columnas de FS, empleando difusión simple</i>	59
5.1.3. <i>Comparación de la velocidad crecimiento axial y radial</i>	61
5.1.4. <i>Producción de biomasa en caja petri</i>	63
5.1.5. <i>Isoterma de adsorción de agua</i>	64
5.1.6. <i>Conclusiones y discusión</i>	65

5.2. Fermentación sólida 66

5.2.1. <i>Resultados de la FS a diferentes porcentajes de humedad</i>	66
5.2.2. <i>Resultados de la FS con cepas de hongos filamentosos y levaduras</i>	67

5.2.2.1. Análisis de gases	68
5.2.2.2. Producción instantánea de CO ₂ con las cepas de estudio	68
5.2.3. Conclusiones y discusión	73
5.3. Evaluación de la actividad probiótica de Productos comerciales con productos de FS	74
5.3.1. Evolución del pH	74
5.3.2. Producción de biomasa	75
5.3.3. Consumo de ácido láctico	79
5.3.4. Producción de ácidos grasos volátiles	82
5.3.5. Balance de materia	84
5.3.6. Conclusiones y discusión	86
5.4. Evaluación de la actividad probiótica de extractos Obtenidos con diferentes disolventes	88
5.4.1. Extracción	88
5.4.2. Producción de biomasa	89
5.4.3. Evolución de pH	90
5.4.4. Consumo de ácido láctico	91
5.4.5. Producción de ácidos grasos volátiles	92
5.4.6. Balance de materia	92
5.4.7. Conclusiones y discusión	94
5.5. Evaluación de la actividad probiótica de fracciones obtenidas del extracto acuoso	95
5.5.1. Fraccionamiento en columna del extracto acuoso	95
5.5.2. Dosificación para la evaluación de fracciones obtenidas del extracto acuoso	96

5.5.3. Producción de biomasa	98
5.5.4 Evolución del pH	99
5.5.5. Consumo de ácido láctico	100
5.5.6. Producción de ácidos grasos volátiles	101
5.5.7. Conclusiones y discusión	102
5.6. Identificación química de compuestos provenientes de la fracción 5 del extracto acuoso	104
5.6.1. Identificación de compuestos	104
5.6.2. Conclusiones y discusión	106
6. CONCLUSIONES y PERSPECTIVAS	110
7. BIBLIOGRAFIA	113
8. ANEXOS	123

INDICE DE FIGURAS

Figura 4.1. Estrategia experimental	26
Figura 4.2. Columnas tipo Raimbault con o sin dispositivo para medir gases	33
Figura 4.3. Dispositivo empleado para la evaluación del crecimiento axial	35
Figura 4.4. Dispositivo utilizado en la fermentación en medio sólido conectado aun metabolímetro	36
Figura 4.5. Tratamiento de muestras de productos obtenidos por FS	37
Figura 4.6. Preparación de probióticos comerciales y productos de FS	38
Figura 4.7. Esquema del tratamiento de muestras provenientes del cultivo con <i>M.elsdenii</i> para la evaluación de la actividad probiótica	41
Figura 4.8. Curva patrón de conversión de densidad óptica (DO) a concentración de biomasa (en peso seco)	45
Figura 4.9. Extracción con disolventes	51
Figura 4.10. Cromatografía en columna gravitatoria	54
Figura 5.1. Crecimiento radial en medio PDA	57
Figura 5.2. Velocidad de crecimiento radial en medio PCS	58
Figura 5.3. Velocidad de crecimiento axial en columnas de fermentación	60
Figura 5.4. Velocidad de crecimiento radial en un cultivo de 120 h a 30° C	61
Figura 5.5. Velocidad de crecimiento axial en un cultivo de 180 h a 30° C	62
Figura 5.6. Cuantificación de biomasa en dos medios de cultivo	63
Figura 5.7. Isoterma de adsorción de agua	64
Figura 5.8. Gráficos representativos de análisis de gases en FS	69
Figura 5.9. Producción instantánea de CO ₂ con diferentes microorganismos	70
Figura 5.10. Producción total de Co ₂ de las cepas probadas en	71
Figura 5.11. Evolución del pH durante el cultivo de <i>M.elsdenii</i> con diferente producto probiótico y de FS	74
Figura 5.12. Producción de biomasa con probióticos comerciales.....	76

Figura 5.13. Producción de biomasa con productos de FS	77
Figura 5.14. Comparación de la producción de biomasa de 3 productos...	78
Figura 5.15. Consumo de ácido láctico al adicionar al cultivo de.....	80
Figura 5.16. Consumo de ácido láctico al adicionar al cultivo de <i>M.elsdenii</i>	80
Figura 5.17. Comparación del consumo de ácido láctico al adicionar 3 productos de FS y 2 productos comerciales	81
Figura 5.18. Concentración de biomasa de extractos obtenidos con disolventes de distinta polaridad	89
Figura 5.19. Evolución del pH en el cultivo de <i>M. elsdenii</i> adicionado con extractos obtenidos con disolventes de diferente polaridad	90
Figura 5.20. Consumo de ácido láctico de extractos obtenidos con disolventes de diferente polaridad	91
Figura 5.21. Secuencia de los fraccionamientos obtenidos de un	96
Figura 5.22. Producción de biomasa por adición de fracciones.....	99
Figura 5.23. Evolución del pH durante el cultivo de <i>M. elsdenii</i>	100
Figura 5.24. Consumo de ácido láctico durante.....	101
Figura 5.25. Estructura química del manitol	105
Figura 5.26. Espectro de RMN ¹ H del manitol	107
Figura 5.27. Espectro de RMN13C del manitol	108
Figura 5.28. Espectro DEPT del manitol	109

INDICE DE TABLAS.

Tabla 2.1. Principales microorganismos utilizados en procesos de FS.	8
Tabla 2.2. Composición de la pasta de copra	9
Tabla 2.3. Producción mundial de las siete principales oleaginosas.	11
Tabla 2.4. Probióticos comerciales en México.	16
Tabla 2.5. Condiciones ambientales del rumen .	21
Tabla 2.6. Principales microorganismos que habitan en el rumen agrupados según el sustrato que fermentan.	22
Tabla 4.1. Cepas empleadas durante el proceso de FS	27
Tabla 4.2. Composición del medio de cultivo para la propagación de <i>M. elsdenii</i> .	32
Tabla 4.3. Solución de sales para el medio de <i>M.elsdenii</i>	32
Tabla 4.4. Características de los disolventes utilizados	51
Tabla 5.1. Valores iniciales y finales de los parámetros evaluados a diferentes porcentajes de humedad en un proceso de FS con la cepa de <i>A. oryzae</i> 2094	67
Tabla 5.2. Comparación de parámetros finales de las FS con distinta cepa	72
Tabla 5.3. Porcentaje de ácidos grasos producidos al final del cultivo de 33 h, adicionando 2% de probióticos comerciales, productos de FS o testigos.	77
Tabla 5.4. Coeficientes estequiométricos en base al carbono al final del	85
Tabla 5.5. Porcentajes de AGV's al final del cultivo de 40 h	92
Tabla 5.6. Coeficientes estequiométricos en base al carbono al final del ...	93
Tabla 5.6a. Coeficientes estequiométricos en base al carbono al final del ...	93
Tabla 5.7. Fracciones agrupadas obtenidas del extracto acuoso	95
Tabla 5.8. Dosificación de fracciones en el cultivo de <i>M. elsdenii</i>	97
Tabla 5.9. Producción de ácido acético por adición de fracciones.....	102
Tabla5.10. Asignación de la señal de RMN ¹³ C del manitol	106

Introducción

INTRODUCCION

1. INTRODUCCION

Los avances científicos realizados en el desarrollo de la alimentación para animales durante últimos 20 años ha llevado a que una gran variedad de materias primas vegetales se hayan incorporado a la alimentación animal, haciendo de este un alimento balanceado compuesto a base de concentrados protéicos, granos de cereales, forrajes, pajas y rastrojos así como subproductos vegetales, entre otros (Wilson, 1983 y Flores- Menéndez, 1989).

Uno de los factores determinantes que ha impulsado a establecer nuevas estrategias de alimentación animal ha sido el crecimiento de la población; la cual exige a los productores de ganado, avicultores, porcicultores y criadores de diversas especies animales de importancia para consumo humano, obtener productos de mejor calidad y mayores rendimientos en los animales que lo consumen. En respuesta a esta problemática actualmente se buscan alternativas biotecnológicas que permitan obtener productos de alta calidad sin que se alteren los sistemas ecológicos, como es el caso de la fermentación sólida (FS), en la cual se utilizan productos de deshecho, sustratos agrícolas o residuos poco valorizados, obteniendo de ellos productos de alto nivel comercial como ácido cítrico, ácido gálico, penicilina entre otros metabolitos secundarios (Barrios, et al. 1988 y 1990; Raimbault, 1980; Hang y Woodadams, 1987).

Por otra parte en el sector pecuario se están aplicando productos derivados de la biotecnología, dando lugar al uso de organismos específicos para propósitos especializados basados en el aislamiento de microorganismos de su hábitat natural (Flores y García, 1995), contribuyendo en mejores rendimientos en carne y leche. Por ejemplo Williams, et al, en 1991 reportan resultados satisfactorios en la producción de 4.1 kg/día de leche en vacas.

En este sentido dentro del grupo de microorganismos específicos encontramos a los probióticos, que son microorganismos y/o sustancias que contribuyen al equilibrio microbiano intestinal. Los primeros cultivos microbianos utilizados como probióticos datan de principios de siglo con las investigaciones de Metchnikoff en 1907 sobre la longevidad de los habitantes de los países búlgaros debido a los altos consumos de leche fermentada con microorganismos como *Lactobacillus acidophilus* (Hoyos y Cruz, 1990).

Posteriormente Lilly y Stillwell en 1965 utilizan el término "probiótico" para describir sustancias producidas por un protozoario que estimulaba el crecimiento de otros microorganismos. Actualmente dentro del grupo de microorganismos con actividad probiótica se incluyen bacterias lácticas, hongos y levaduras, destacando su uso cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y *Aspergillus oryzae* (Campos y Viniegra, 1994; Nisbet y Martin, 1993). Estudios de Tapia, et al. en 1988 evaluaron la actividad probiótica para rumiantes con cepas de *Aspergillus niger*, *Trichoderma harzianum* y *Penicillium* sp.

En este contexto se propone una alternativa de alimentación animal, mediante el uso de un residuo agroindustrial la pasta de copra, ya que en recientes estudios se ha utilizado como complemento nutritivo en rumiantes y en este sentido se busca ser aplicado como sustrato de FS, ya que podría ser enriquecido en proteína y simultáneamente producir sustancias probióticas que posteriormente se emplearían en cantidades mínimas en forrajes para la alimentación animal (Roussos, et al. 1994; Pineda y Pérez, 1996).

Con este propósito el presente estudio evaluó la actividad probiótica de productos obtenidos por FS empleando como microorganismo modelo la bacteria ruminal *Megasphaera elsdenii* (Ramírez-Islas, 1995), simultáneamente se realizaron estudios químicos para la elucidación de compuestos responsables del efecto benéfico mediante el uso de técnicas cromatográficas en capa fina, extracciones con disolventes de diferente polaridad, fraccionamiento en columnas de sílica y la identificación de moléculas mediante el empleo del equipo de resonancia magnético nuclear (RMN), Trigos, et al. 1995; Herrera, 1997).

Así al utilizar esta tecnología para producir probióticos vía FS, el concepto probiótico continuará aumentando debido a la investigación básica en este campo ya que en estudios realizados al respecto se ha demostrado que la adición de cultivos de hongos, levaduras y bacterias productoras de ácidos incorporadas a las dietas de animales domésticos puede alterar los patrones de su población microbiana, ya sea que se trate de aves o de mamíferos jóvenes (Soeyenbos, 1984).

Introducción

Por otra parte el alcance que tiene este estudio es contribuir a la identificación de los compuestos responsables del efecto probiótico de cultivos obtenidos por FS, ya que hasta el momento no se tiene información precisa sobre la naturaleza de las moléculas, enzimas, metabolitos u otra materia que este presente en el aditivo "probiótico", esperando obtener mayor información si se realizan a futuro estudios de ingeniería genética y química en donde se detecte esta capacidad para evaluar su potencial (Fuller, 1989).

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

2. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

2.1. Fermentación Sólida (FS)

La FS se define como un tipo de cultivo que emplea sustratos sólidos (bagazo, pasta de copra, residuos de café etc.), los cuales son materiales que retienen agua, son porosos y a partir de ellos se obtiene productos de interés comercial. Este sistema es considerado como una tecnología innovadora, limpia y con poco impacto sobre el medio ambiente. Esta tecnología es prometedora y en diversas partes del mundo tratan de desarrollar procesos empleando nuevas materias primas que sean transformadas en productos interesantes, además de ofrecer grandes ventajas como las que se muestran en la Sección 2.1.1 (Mudgett, 1986; Hesseltine, 1987)

2.1.1. Ventajas y desventajas

Ventajas:

- ✓ Los sustratos sólidos pueden requerir solo la adición de agua, aunque pueden añadirse también algunos nutrientes.
- ✓ El bajo contenido de humedad reduce los problemas de contaminación.
- ✓ Las condiciones del crecimiento fúngico son similares a las de su hábitat natural.
- ✓ La aireación es facilitada por los espacios entre las partículas del sustrato.
- ✓ El fermentado sólido puede extraerse inmediatamente por adición directa de disolventes o manteniéndolo en congelación antes de la extracción.
- ✓ Los productos obtenidos pueden incorporarse directamente en el alimento de animales.

Desventajas:

- ✗ Las fermentaciones con agitación pueden involucrar altos requerimientos energéticos y daños al micelio.
- ✗ La cantidad de inóculo puede ser grande y para su producción deben mantenerse condiciones de asepsia rigurosa.
- ✗ Los sustratos agrícolas pueden requerir algún tipo de pretratamiento.
- ✗ Problema de pérdida de humedad para las fermentaciones de larga duración.
- ✗ Elevación excesiva de la temperatura.
- ✗ Dificultad en la regulación de los parámetros de cultivo.

Por otra parte los procesos de FS se vienen implementado desde tiempo atrás, por ejemplo, el caso particular de los quesos madurados en Francia. Actualmente se aplica para obtener alimentos fermentados, producir de enzimas, metabolitos secundarios, ácidos orgánicos, producción de alcohol, entre otros (Saucedo-Castañeda, 1991; Lonsane, et al. 1991).

2.1.2. Sustratos y microorganismos empleados

Lo soportes empleados comúnmente deben tener la particularidad de absorber los nutrimentos que se encuentren en solución por ejemplo amberlita, vermiculita, esponja, poliuretano entre otros. También, es posible utilizar residuos agroindustriales como bagazo de caña, pulpa de café, pasta de copra (Barrios, et al. 1988; Aurla, et al. 1990; Saucedo, et al. 1991).

Los microorganismos empleados en este tipo de proceso son muy variados, y según su actividad biológica se pueden aplicar a distintos campos de la investigación como se aprecia en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1. Principales microorganismos utilizados en procesos de FS.

MICROORGANISMO	APLICACION	REFERENCIA
<i>Lactobacillus</i> sp	Alimentos fermentados	Saucedo-Castañeda, 1987
<i>Penicillium</i>	Metabolitos secundarios	Barrios, et al, 1988
<i>Aspergillus niger</i>	Ácidos orgánicos	Raimbault, 1980
<i>Saccharomyces</i> sp	Producción de alcohol	Gibbons y Wetsby, 1988
<i>Aspergillus oryzae</i>	Suplemento para ganado	Huber, 1991
Cultivos mixtos	Biorremediación	Ramírez-Islas, 1998
<i>Trichoderma</i>	Producción de enzimas	Roussos, 1985

2.2. Pasta de copra

De la palma del coco (*Cocos nucifera*) se obtiene la copra que es el nombre comercial que se le da al residuo del albumen del fruto de la palma del coco, que se obtiene al cortar a la mitad dicho fruto, extrayendo el líquido que contiene. Posteriormente, se asolea por varias semanas, hasta que alcanza un grado de humedad aproximado del 10%, determinado por los productores de copra por el olor, color, textura y sabor característicos. El producto obtenido se somete a un proceso industrial ya sea por prensado, vía enzimática o por la adición de disolventes, obteniéndose dos productos principales: aceite de coco y pasta de copra (Aguilar y Rueda, 1980; Flores-Menéndez, 1989).

Dada la composición de la pasta de copra resulta ser un alimento proveedor de proteínas importantes para la alimentación animal que podría ser utilizado en procesos de FS, (Flores y García, 1995), obteniendo un material rico en azúcares y con bajo contenido de grasas dependiendo de la extracción utilizada (Fernández, 1987).

Antecedentes Bibliográficos

En la Tabla 2.2 se aprecia que el aporte principal de este producto es la proteína (20%), y los carbohidratos (16.5%), por esto es aconsejable su uso como sustrato para la FS, además de que aportaría a la proteína como un subproducto obligado, y posiblemente la formación de metabolitos que sean más digeribles para el animal que lo consume.

Por otra parte dentro del grupo de aminoácidos esenciales de importancia se encuentran la arginina, fenilalanina, lisina e histidina, los cuales pueden ser utilizados por los microorganismos durante la FS y desdoblar a compuestos más simples, enriqueciendo de esta forma el fermentado; de igual forma no sería necesario agregar fuente de carbono externa a la FS ya que la cantidad de azúcares solubles de la pasta de copra lo aportaría.

Tabla 2.2. Composición de la pasta de copra (Maisons, 1991).

COMPONENTE	PORCENTAJE
Proteína	20
Carbohidratos	16.5
Arginina	2.26
Fenilalanina	0.78
Lisina	0.54
Histidina	0.36
Minerales	9.63
Glucosa	9.16
Humedad	7.01
Grasa	5.48
Fibra cruda	4.10

La pasta de copra contiene algo menos de proteínas que el pienso de gluten de maíz y más que el salvado de trigo, con un promedio de 21.3%, siendo estas de mejor calidad que las del pienso del gluten de maíz. Sin embargo, no debe suministrarse pasta de copra como único suplemento proteico en la dieta animal al menos que se adicione algún tipo de pasto.

Uno de los factores importantes para administrar una pasta de copra de buena calidad es la presencia de un color blanquecino o pardo muy ligero; en el caso contrario este reflejaría que la temperatura utilizada durante la extracción del aceite de coco fue demasiado elevada y por ende la pasta se torna de color oscuro disminuyendo así su valor nutritivo (Flores-Menéndez, 1987).

2.2.1. Producción mundial de la pasta de copra

La producción mundial de semillas oleaginosas como aceites, tortas y harinas permanecieron estables en 1996/1997, con una producción de 261 millones de toneladas, y en 1998 esta ascenderá a 281 millones de toneladas, es decir incrementará aproximadamente un 8 por ciento con respecto al año pasado (FAO, 03/1998). En la Tabla 2.3 se presentan el listado de las principales oleaginosas de interés mundial, así como el por ciento de producción de cada uno durante los años de 1994 a 1997, destacando que las importaciones netas de aceites y grasas en este año, serán producto de 6 países de importancia mundial (la India, Pakistán, México, Japón, la Unión Europea y la República de Corea).

Por lo que respecta a las importaciones netas de tortas y harinas oleaginosas, más del 81 por ciento de los envíos totales será adquirido por los nueve grandes importadores tradicionales (la Unión Europea, Japón, la República de Corea, México, Tailandia, Indonesia, Malasia, Filipinas y Egipto), además de China (FAO, 03/1998). En México, la producción de copra se localiza principalmente en los estados de Guerrero (40.25%), Colima (26.86%), Tabasco (15.18%), Oaxaca (5.65%), y Michoacán (3.83%), representando un 91.77% del total (INEGI, 1988; SARH, 1988 y 1992).

En otro sentido, resultados estadísticos mostraron que el consumo mundial de tortas y harinas oleaginosas aumentó 2.7 % como promedio al año, durante los dos últimos años y se prevé que llegará a unos 68 millones de toneladas de equivalente en proteína en 1998 (FAO, 03/1998).

En México, la pasta de copra tiene su principal destino en la alimentación animal, además de emplearse como aditivo en algunas mezclas alimentarias, ya sea a través de la elaboración de alimentos balanceados o concentrados proteícos, debido a que la pasta de copra tiene gran capacidad de absorción para las melazas.

Tabla 2.3. Producción mundial de las siete principales oleaginosas.

OLEAGINOSA	1994/1995	1995/1996	1996/1997
Soya	138.6	124	133.3
Semillas de algodón	35.9	35.9	34.3
Maní (cáscara)	28.4	28.4	28.7
Semillas de girasol	23.6	26.3	26.2
Semillas de colza	30.5	34.7	30.2
Almendras de palma	4.8	5.0	5.2
Copra	5.2	4.9	5.1
TOTAL (millones de toneladas)	265.7	259.2	263.0

2.3. Probióticos

El conocimiento de los efectos benéficos de algunas de las bacterias de la flora intestinal se inicia a principios de siglo con los trabajos de Metchnikoff; desde entonces, y a lo largo de estos casi 100 años de estudios, autores muy diversos se han esforzado en conocer las distintas funciones de los microorganismos que pueblan el tracto digestivo, a pesar de ello, algunas de sus acciones no están bien precisadas (Smith, 1991).

Por otra parte, una vez comprobado que algunas bacterias intestinales, adicionadas al pienso o al agua de bebida, determinaban una respuesta favorable en la producción animal se intentó enmarcarlas en un grupo específico (Gil-Rueda, 1997).

En 1965 Lilly y Stiwell usaron el término probiótico para describir las sustancias producidas por un protozoario que estimulaba el crecimiento de otros microorganismos.

Posteriormente, Parker en 1974 describe a los probióticos con tres palabras "para la vida", después en 1989 Fuller propone que los probióticos son un suplemento que tiene efecto benéfico sobre la flora intestinal de los animales. Actualmente, un probiótico es considerado como un aditivo usado en la dieta de hombre o animales, constituida por una mezcla de biomasa microbiana, metabolitos y enzimas que tienen efecto benéfico sobre la fisiología del huésped (Williams, 1991). Hay que destacar que el término probiótico surgió, en oposición al antibiótico cuyo significado "**contra la vida**" está bien definida y consiste en eliminar o en mantener a un bajo nivel la población de microorganismos patógenos o indeseables.

Los probióticos cuyo significado "**en favor de la vida**" pueden ser agrupados dentro de la categoría de compuestos promotores de crecimiento. Son todas las sustancias de carácter nutritivo, incluyendo los microorganismos e incluso los antibióticos que gozan de esa duplicidad antagónica de acción probiótica, según la especie animal.

En el mercado existen dos grandes grupos: probióticos para humanos y probióticos para uso animal, en la mayoría de los casos se desconoce el funcionamiento de los probióticos, esto se debe en parte a la gran diversidad de compuestos existentes y a la gran gama de procesos para producirlos. Sin embargo se han hecho estudios en humanos y su importancia radica en mejorar la digestión de alimentos; en algunos casos actúa como inhibidor de la carcinogénesis, incrementa en la resorción de calcio, decrece la intolerancia a la lactosa, ayuda en la síntesis de vitaminas y regula el sistema inmune (Havenaar y Josh, 1992; Havenaar y Spanhaak, 1994).

2.3.1. Importancia en la nutrición animal

El papel de los probióticos en la dieta de animales se centra en la digestibilidad de los alimentos así como de promover el crecimiento de bacterias presentes en el rumen incrementando la producción animal (Campos, et al. 1995).

Además participan en la degradación de alimentos pocos digeribles (muy fibrosos o con alto contenido de celulosa), actuando como degradador primario de la fibra, incrementando el número de bacterias celulolíticas del rumen contribuyendo por otra parte en una mejor calidad y producción de leche (Williams, et al. 1991; Wiedmeier y Arambel, 1987).

Durante años los aditivos biológicos, que se han venido incorporando a la dieta de animales (específicamente levaduras), deben tener la capacidad de adherirse y multiplicarse en las células epiteliales, así como colonizar del tracto digestivo (Gil-Rueda, 1997), por lo tanto los factores claves para utilizar los probióticos en forma exitosa son la presencia de microorganismos viables y en cantidades suficientes con alta capacidad de colonizar el tracto gastrointestinal y con la habilidad para crecer en el medio ambiente intestinal, donde el colonizante exitoso puede utilizar sustratos disponibles y resistir a agentes antibacterianos presentes en el medio.

Sin embargo no solo se han realizado estudios con levaduras como los reportados por Williams, et al. en 1991. También se han realizado estudios con hongos filamentosos como los estudios reportados por Males y Johnson, 1990; Tapia, et al. 1988 y Nisbet y Martin en 1990, en donde evalúan probióticos de cultivos fúngicos en rumiantes y proponen que los principales efectos asociados a la utilización de estos cultivos son los siguientes:

- a) Estimulan el crecimiento de los microorganismos del rumen.
- b) Incrementan la digestibilidad de los alimentos.
- c) Incrementan la producción de ácidos grasos volátiles de cadena corta, propiónico, acético y butírico.
- d) Promueven una mayor producción de leche.

En lo referente a los estudios de evaluación probiótica, solo se han realizado bioensayos con bacterias aisladas del líquido ruminal como es el caso de *Selenomonas ruminantium*, *Megasphaera elsdenii* y consorcios microbianos ontenidos del líquido ruminal, en donde se evalúa el crecimiento microbiano, producción de ácidos grasos volátiles, consumo de ácido láctico, estabilidad al pH entre otros (Martin y Nisbet, 1990; Campos, et al. 1995; Wiedmeier y Arambel, 1987; Fuller, 1992 y 1989; Ramírez, et al. 1994; Ramírez-Islas, 1995; Campos y Viniegra en 1995, Bryant, 1956 y Nisbet y Martin en 1991).

Los estudios de evaluación probiótica antes mencionados solo pueden dar información a cerca de las respuestas en producción de microorganismos benéficos y la producción de metabolitos de fermentación, ya que en su mayoría son estudios "in vitro" y en algunos casos se ha reportado incremento de 16 a 51% de la flora ruminal.

2.3.2. Importancia Industrial

En los últimos años, se han realizado avances en tecnología de probióticos, los industriales saben que la utilidad de estas sustancias dependen de que exista un número adecuado de microorganismos en ellas para que pueden formar una colonia en el tracto gastrointestinal, y establecer una selección simbiótica con el animal huésped, por consiguiente el industrial busca que el producto tenga una vida de anaquel adecuada y buenas características de mezclado; de manera que su presencia en el alimento sea homogénea, ya sea que, se adicione en raciones secas ó bien en el agua de bebida.

De tal forma que la base teórica que apoya el uso de probióticos en la alimentación animal indica que los microorganismos con acción probiótica estabilizan el equilibrio intestinal microbiano, favoreciendo la absorción de los nutrimentos en el intestino delgado.

Aunque parece lógica la acción de estos aditivos resulta difícil interpretar las evaluaciones sobre su verdadero valor ya que existe una gran gama de variables que están involucradas en el proceso fermentativo de la digestión.

La documentación bibliográfica sobre el tema es en ocasiones positivo. Sin embargo, existen trabajos que señalan resultados contradictorios, es decir, no proporciona beneficio alguno, y en los que se muestran efectos positivos en ocasiones algunos investigadores no pueden confirmar sus resultados cuando repiten su experimento.

Por ejemplo, Adams, et al. en 1981 encontró en ensayo con novillos que se mejoró la ganancia en peso diaria, utilizando un probiótico comercial (Yea-sacc), sin embargo, sus diferencias no fueron significativas, caso contrario sucedió en los

estudios de Deaville y Galbraith en 1990, en donde utiliza cabras de engorda, toros, vacas y becerros alimentandolos con probióticos y pastura, observando que con el solo uso de la pastura mejoraba la ganancia en peso de 0.5 a 0.80 kg. Williams en 1991 y Gómez, et al. 1990 demostraron que con el uso del probiótico Yea-sacc y un extracto de *Aspergillus oryzae* puede haber un cambio pequeño en la composición de la dieta diaria de los animales mejorando su producción.

Por otro lado Chademana, et al. 1990, no observa cambios con el uso de levaduras como probióticos, en este sentido hasta el momento existen controversias si el uso de probióticos de tipo fúngico tiene o no efecto alguno sobre la digestión del rumiante.

Esto se debe principalmente a que existen pocos estudios que demuestren que los organismos de los extractos probióticos se encuentren viables en el momento en que se agrega al alimento, sin pensar que posiblemente los metabolitos producidos durante su cultivo son los responsables de tal efecto.

2.3.3. Probióticos comerciales en México

Actualmente se producen a nivel comercial probióticos compuestos en su mayoría por microorganismos vivos (*Aspergillus oryzae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecium*, *Bifidobacterium sp*, *Trichoderma harzianum* entre otros), enzimas y metabolitos los cuales se encuentran microencapsulados, en algunos casos están enriquecidas con cromo y selenio, los cuales tienen efecto sobre el animal que lo consume sea aves, cerdos ó rumiantes (Williams, 1991; Campos y Viniegra, 1994 y Hoyos, 1997).

Los principales probióticos comerciales en México son de exportación y el volumen comercializado (oferta) es difícil de evaluar ya que no existen fracciones arancelarias específicas que los identifiquen. Sin embargo se encuentran en el mercado los productos que se muestran en la Tabla 2.4 (Favela y Gutiérrez, 1992; Alltech de México, 1997).

Antecedentes Bibliográficos

En este estudio se probaron 3 probióticos comerciales, **Lacto-sacc** con un contenido de 10 millones de UFC/g de *Lactobacillus* y *Streptococcus* microencapsulados, enzimas y cultivo de levaduras con 100 millones de UFC/g de la cepa 1026, **Yea- sacc 8417** cuyo contenido principal son 100 millones de UFC/g de un cultivo de *Saccharomyces cerevisiae*, **Yea-sacc 1026**, con un contenido de 2.5 billones de células/g de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* 1026 y 8417 respectivamente.

Tabla 2.4. Probióticos comerciales en México.

PRODUCTO	MICROORGANISMO	DISTRIBUIDOR
Amaferm	<i>Aspergillus oryzae</i>	Apligen
Yea-Sacc	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Biozyme
Procreatin-7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Safmex
Lacto-sacc	<i>Lactobacillus</i> , <i>Streptococcus</i>	Alltech
Yea- sacc 8417	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Alltech
Yea- sacc 1026	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Alltech
Fastrack	Cultivos mbxtos	Conklin

En la mayoría de los casos las características que debe cubrir un probiótico antes de ser suministrado a la dieta animal cubren los siguientes aspectos (Hose y Sozzi, 1991; Smith, 1991; Tapia, et al. 1988; Hoyos, 1997).

- ✓ Ser **NO** patógeno para humanos y animales.
- ✓ Fácil proliferación *in vitro*.
- ✓ Fácil proliferación *in vivo*.
- ✓ Promover un mayor crecimiento en los animales que lo consumen.
- ✓ Estimular una mayor eficiencia en la utilización de nutrientes.
- ✓ Alta tolerancia a la bilis y acidez.
- ✓ Productores de ácido láctico.
- ✓ Alta tasa de sobre vivencia después del procesamiento (recuperación, liofilizado).
- ✓ Ser adicionado en pequeñas cantidades aprox 2%.

2.4. Rumiantes

2.4.1. Definición y clasificación

La palabra rumiantes procede de la palabra latina, **ruminare**, que significa volver a masticar; así, los rumiantes son mamíferos que rumian, con pezuñas y dedos pares. Los rumiantes se incluyen en la subclase denominada **ungulados** (mamíferos con pezuñas) y en el orden **Arteriodactyla** (dedos pares) y el sub-orden **ruminantia** (Church, 1988).

Existen muchas especies diferentes con diversos tamaños corporales, formas y colores, que se distribuyen sobre una amplia variedad de zonas climáticas y agrícolas. Su tamaño varía desde el ciervo-ratón **Hyemoschus o tragalus**, muy pequeño, que puede pesar de 2 a 5 Kg hasta jirafas con un peso aproximado de 1.9 toneladas (Church, 1988).

Uno de los rumiantes de interés para la industria alimentaria son los que pertenecen a la Familia: **Bovidae**; género **Bovidae taurus** o mejor conocido como ganado doméstico, es un tipo de animal que puede consumir alimentos indigeribles por el hombre, como celulosa y nitrógeno no proteico, convirtiéndolos en nutrimentos disponibles para el hombre gracias a los microorganismos que viven simbióticamente en el rumen herbario.

2.4.2. Anatomía del conducto gastrointestinal de los rumiantes

Las características anatómicas y fisiológicas que permiten la fermentación de los alimentos en el sistema digestivo son: capacidad de estómago o el intestino grueso, un tránsito lento de los alimentos y un ambiente líquido amortiguado y próximo a la neutralidad, así como la eliminación continua de productos solubles de la fermentación, Dukes y Swenson, 1970.

En este sentido la anatomía de los rumiantes se caracteriza por tener el tracto digestivo anterior al duodeno dividido en cuatro compartimentos: a) Rumen, b), Omaso, c) Abomaso y d) Retículo.

El retículo sirve como cavidad de fermentación intermitente, mientras que el omaso es otra cavidad de fermentación en donde se produce la mayor parte de la energía para el mantenimiento y crecimiento de microorganismos propios de este ambiente, la mayor parte de la conversión la realizan a través de carbohidratos, grasas y proteínas que dan origen a la producción de metano, ácidos grasos volátiles entre otros. El omaso sirve como cavidad de absorción de agua y nutrientes hidrosolubles, y el abomaso como cavidad para la digestión péptica Church, 1988.

Dentro de las funciones principales de la rumia que diferencia a los rumiantes de otros herbívoros se encuentran los siguientes aspectos: los materiales herbáceos son procesados dos veces dentro de la boca y dos veces dentro de los compartimentos del rumen antes de pasar al estómago; cuando la comida es primeramente ingerida, masticada, ensalivada y deglutida en esta condición entra en el rumen que contiene grandes cantidades de agua (10 a 15 lts), bacterias, hongos y protozoarias que degradan la celulosa y la convierten en azúcares y ácidos orgánicos, Brock, et al., 1987 y Josse, 1979.

Los animales monogástricos se diferencian por tener un solo estómago que únicamente es capaz de digerir carbohidratos en forma de azúcares simples que son absorbidos en su torrente circulatorio, ya que en él se encuentran grandes cantidades de glucosa pero no de ácidos grasos de cadena corta. Sin embargo en la sangre de los rumiantes el 90% de la energía la obtienen de los ácidos grasos ya que son utilizados por los tejidos corporales del rumiante, además de que juegan un papel decisivo para el suministro de precursores de la leche, Josse, 1979 y Kaufmann, 1983.

De esta forma los ácidos grasos producidos durante la fermentación tienen diferentes usos, por ejemplo el acetato provee de una fuente no específica de energía, y puede ser sintetizado en ácidos grasos o cuerpos cetónicos. El propionato regula la síntesis de la glucosa por el hígado y proporciona cerca de la mitad de glucosa total que entra al metabolismo, por lo tanto es una fuente específica de energía obtenida de carbohidratos y aminoácidos, no compartida por acetato y butirato. El butirato no es particularmente útil en la nutrición ya que puede dar origen a acetato a través de canales metabólicos y participar en la síntesis de glucosa, Josse, 1979.

2.4.3. Acidosis en rumiantes

La acidosis es una enfermedad relacionada con la dieta de los rumiantes, causada por un aumento súbito en el consumo de carbohidratos de fácil fermentación. Por otro lado existen cambios en la población microbiana del rumen y en los productos de la fermentación mismos que se absorben en grandes cantidades en forma de ácidos grasos volátiles y de ácido láctico, con lo cual pasan al torrente sanguíneo y provocan acidosis sistémica.

La prevención se centra en la adaptación gradual de dietas ricas en carbohidratos de fácil fermentación y en un manejo cuidadoso de la distribución de las mismas (Huntington, 1993 y Miller, 1989).

La acidosis esta definida como el estado de acidez patológicamente elevada de la sangre, en los rumiantes el término se amplía para incluir situaciones de acidez en el rumen, dando origen a problemas agudos, mismos que amenazan la vida del animal, o sub-agudo en donde se manifiesta un descenso en el consumo del pienso y en la ganancia en peso (Huntington, 1993).

La etiología de la acidosis tiene dos fases importantes:

- 1) Un aumento brusco en el consumo de carbohidratos de fácil fermentación, seguido de una fermentación rápida en el rumen con formación de ácidos que alteran el perfil de la población microbiana del rumen.
- 2) Absorción de ácidos hacia la corriente sanguínea que determina la acidosis.

En el caso 1 generalmente se manifiesta cuando el animal consume concentraciones elevadas de carbohidratos intracelulares, tubérculos o raíces que contienen azúcares, o cereales en grano que contienen almidón. En primera instancia actúan las bacterias amilolíticas, las cuales producen AGV's y lactato como productos de su fermentación.

Cuando aparece lactato en rumiantes alimentados con forrajes es predominante el L-Lactato, si hay un aumento súbito en el consumo de carbohidratos de fácil fermentación origina una acumulación de lactato en el rumen, y el cociente isomérico cambia en una relación 50:50 de L-Lactato:D-Lactato. Sin embargo el lactato puede ser absorbido y salir del rumen por la ingesta, o bien por el consumo de bacterias lactolíticas como es el caso de *Megasphaera elsdenii*. También pueden proliferar especies bacterianas y levaduras productoras de etanol; provocando una intoxicación lo que explicaría en parte el comportamiento de los rumiantes afectados por la acidosis.

En el caso 2 Los ácidos producidos en el rumen son absorbidos hacia la corriente sanguínea, donde se acumulan y constituyen la base de la acidosis sistémica. El pH de la sangre desciende y se produce un desequilibrio de electrolitos debido tanto a la pérdida hacia la luz del intestino como a elevadas concentraciones de ácidos. La alta osmolaridad del quimo y la diarrea determinan que la sangre pierda agua y el bazo libere eritrocitos en respuesta a un estrés fisiológico general provocando hemoconcentración. En casos graves, la acidosis interfiere sobre la función renal y transporte de oxígeno, produciendo la rotura de arteriolas periféricas, particularmente en las extremidades, hecho que se manifiesta como laminitis, infuosa, ó acidosis láctica (Huntington, 1993 y Miller, 1989).

2.4.4. Microorganismos ruminales y su entorno ambiental

Los tipos de microorganismos que se desarrollan y se mantienen en el rumen son aquellos que se han adaptado a las condiciones específicas del ecosistema, en este sentido los microorganismos que predominan son principalmente los sacarolíticos, seguido de protozoarios, hongos y bacterias celulóticas, lactolíticas, amilolíticas, proteolíticas, metanogénicas, las que consumen lípidos, pectina, urea y otros sustratos; como se muestra en la Tabla 2.6, (Church, 1988; Hungate, 1969 y Tokoyama y Johnson, 1993).

Por otra parte Martín y Rusell en 1988 mencionan que una de las bacterias que se encuentran en mayor porcentaje (80%), del total de las bacterias del rumen son *Selenomonas ruminantium* y *Megasphaera elsdenii*. *Selenomonas ruminantium* fue aislada por Bryan en 1956, existiendo hoy diferentes variedades de este género,

Antecedentes Bibliográficos

entre las que destacan las fermentadoras de lactato, variedad lactilíticas, cepas HD4, PC18 y GA31, además de cepas no fermentadoras de lactato variedad bryantii reportada por Martín y Russell, 1988.

Por otro lado la baja concentración de oxígeno en el rumen estimula a los microorganismos a desarrollarse en ausencia de oxígeno, llamados anaerobios obligados. Sin embargo pueden encontrarse, aunque en menor cantidad anaerobios facultativos, entonces el rumen es considerado como una cámara de fermentación en la cual la población microbiana se encuentra en un medio de cultivo específico con las condiciones adecuadas para favorecer el crecimiento de la microflora presente. En la Tabla 2.5. se muestran las condiciones de crecimiento de microorganismos en el rumen.

Tabla 2.5. Condiciones ambientales del rumen
(Pérez-Gavilán, 1990 y Tokoyama y Jhonson, 1993).

Temperatura	38 a 42° C
pH	5.5 a 7.0
Atmósfera	Sistema anaerobio muy reductor, compuesta aproximadamente por 65% de CO ₂ , 27% de CH ₄ , 7% de N ₂ , 0.6% de O ₂ , 0.2% de H ₂ y 0.01% de H ₂ S.

Tabla 2.6. Principales microorganismos que habitan en el rumen, agrupados según el sustrato que fermentan.

MICROORGANISMO	SUSTRATO EMPLEADO
<i>Bacteroides succinogenes</i> <i>Ruminococcus flavefactens</i> <i>Ruminococcus albus</i> <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	Celulosa
<i>Bacteroides amylophilus</i> <i>Streptococcus bovis</i> <i>Succinimonas amyolytica</i> <i>Bacterioides ruminicola</i>	Amilosa
<i>Treponema bryantii</i> <i>Lactobacillus vitulinus</i> <i>Lactobacillus ruminus</i>	Utilizan azúcares
<i>Methanobrevibacter ruminantium</i> <i>Methanobacterium formicicum</i> <i>Methanomicrobium mobile</i>	Productoras de metano
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> <i>Bacteroides ruminicola</i> <i>Lachnospira multiparus</i> <i>Succinivibrio dextrinosolvens</i> <i>Treponema bryantii</i> <i>Streptococcus bovis</i>	Pectina
<i>Bacteroides ruminicola</i> <i>Succinivibrio dextrinosolvens</i> <i>Selenomonas sp</i> <i>Ruminococcus bromii</i> <i>Treponema sp</i> <i>Butyrivibrio sp</i>	Urea
<i>Bacteroides ruminicola</i> <i>Megasphaera elsdenii</i> <i>Selenomonas ruminantium</i>	Productoras de amoníaco
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> <i>Bacteroides ruminicola</i> <i>Ruminococcus sp</i>	Hemicelulosa
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> <i>Treponema bryantii</i> <i>Anaerovibrio lipolytica</i> <i>Eubacterium sp</i> <i>Fusocillus sp</i> <i>Micrococcus sp</i>	Lípidos
<i>Megasphaera elsdenii</i> <i>Selenomonas ruminantium</i>	Utilizan ácidos
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> <i>Bacteroides ruminicola</i> <i>Bacteroides amylophilus</i> <i>Streptococcus bovis</i>	Proteínas

Objetivos

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

* Contribución a la caracterización y evaluación de productos de FS como aditivos con actividad probiótica, empleando un bioensayo con la bacteria ruminal *Megasphaera elsdenii*.

3.2. Objetivos Particulares

* Obtener productos de fermentación sólida (FS) utilizando cepas silvestres y cepas tipo GRAS de hongos filamentosos y levaduras empleando como sustrato pasta de copra.

* Evaluar mediante un bioensayo con la bacteria *Megasphaera elsdenii*, el efecto probiótico de los productos obtenidos por FS, comparando con probióticos comerciales.

* Contribuir a la identificación de compuestos provenientes del cultivo en medio sólido como posibles candidatos de actividad probiótica, mismos que se podrían evaluar en estudios posteriores.

Materiales y Métodos

4. MATERIALES Y METODOS

En esta sección se presenta la metodología y materiales utilizados, así mismo en la Figura 4.1 se muestra en forma general la estrategia experimental usada para los diversos análisis realizados.

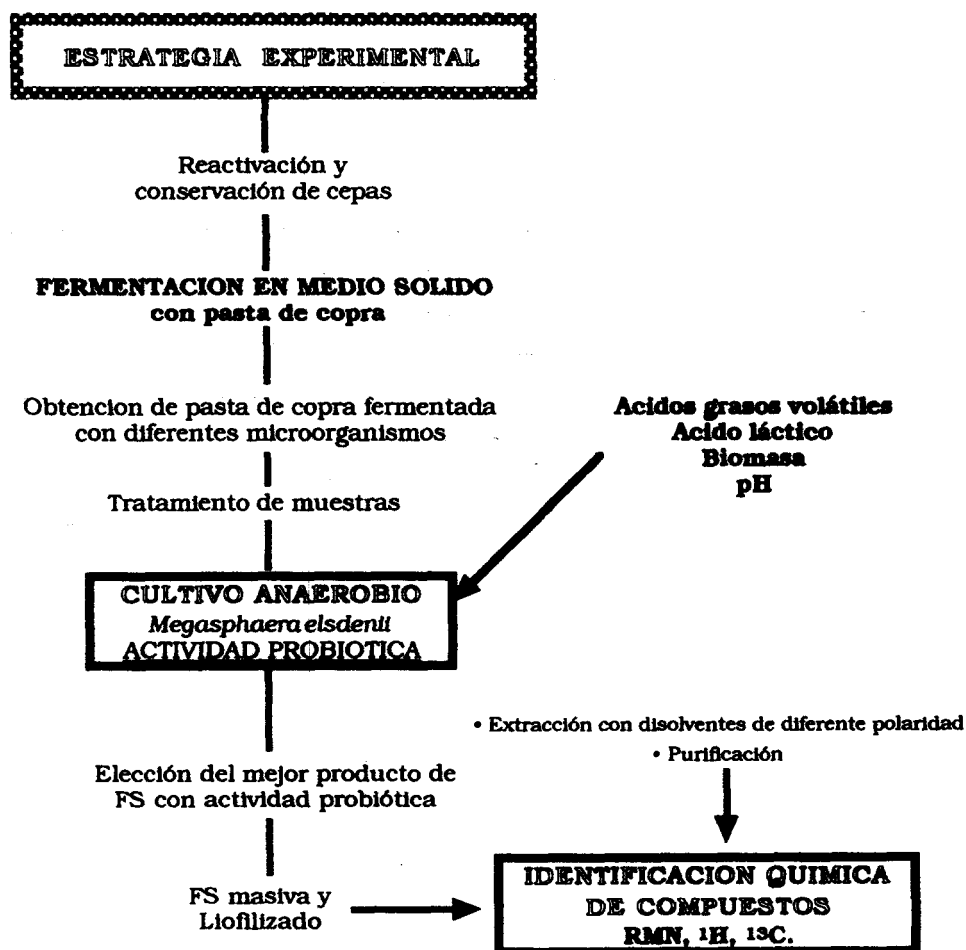


Figura 4.1. Estrategia experimental.

4.1. Microorganismos empleados

a) Hongos y levaduras

En este estudio se probaron 4 cepas de hongos filamentosos y 2 de levaduras. Las cepas **a** y **b** que se muestran en la Tabla 4.1 tienen certificación de cepas tipo GRAS, la cepa **c** fue aislada de pasta de copra en un estudio realizado por Flores y García en 1995, la cepa **d** fue aislada del queso roquefortil en un estudio realizado por Pineda y Pérez en 1996, la cepa **e** fue obtenida del cepario de CBS - 2863 de la Universidad Autónoma Metropolitana y la cepa **f** fue donada por el profesor Mariano García Garibay de esta misma Universidad.

Tabla 4.1. Cepas empleadas durante el proceso de FS.

CEPAS	GENERO	ESPECIE	ORIGEN
a	<i>Aspergillus</i>	<i>oryzae</i>	CECT 2094
b	<i>Aspergillus</i>	<i>oryzae</i>	CECT 2095
c	<i>Rhizopus</i>	<i>nigricans</i>	Pasta de copra
d	<i>Penicillium</i>	<i>roquefortii</i>	UAM
e	<i>Schwanntomyces</i>	<i>castelli</i>	CBS 2863
f	<i>Kluyveromyces</i>	<i>marxianus</i>	UAM

b) Bacteria ruminal

La evaluación de la actividad probiótica que se presenta en el Sección 7, se realizó con la cepa 390 de *Megasphaera elsdenii*, donada por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), es una bacteria de origen ruminal coco Gram negativo, se encuentra en un gran numero de animales (Stewart y Bryant, 1988). Crece en un intervalo de temperatura de 25 a 40° C, como fuente de carbono puede utilizar glucosa, fructosa y lactato en donde se presenta su mejor crecimiento; con glicerol, maltosa, manitol, sorbitol y sacarosa su crecimiento es variable, y no crece con arabinosa, celobiosa, dextrina, galactosa, inulina, manosa ni rafinosa. El pH final del cultivo con el empleo de glucosa o fructosa es de 4 a 5 y con lactato de 7.8 a 8 (Bergey's manual of determinative bacteriology, 1994)

4.1.1. Conservación y reactivación de las cepas

Las cepas de hongos y levaduras después de haberse propagado durante 72 h a 30° C sobre medio pasta de copra simple (PCS), se conservaron en glicerol al 50% a 4° C, Ver sección 4.2.1. Con este método de conservación se pueden almacenar durante 1 año aproximadamente sin que se alteren las estructuras de reproducción de los microorganismos (Aquiahuatl- Ramos, 1989).

Procedimiento:

- 1.- Preparar tubos de ensaye con tapa de rosca conteniendo medio PCS, esterilizar, inclinar el tubo y dejar solidificar.
- 2.- Inocular por picadura con cada una de las cepas e incubar durante un período de 72 h a 30° C.
- 3.- Colonizada la superficie del medio, agregar 5 ml de una solución de glicerol al 50% previamente esterilizado durante 15 min / 15 lbs 121° C.
- 4.- Sellar los tubos y almacenar a temperatura ambiente o de preferencia en refrigeración.

El cultivo de *M. elsdenii*, fue propagado por 48 h, se conservó en glicerol al 40%. Al glicerol utilizado se le acondicionó una atmósfera de CO₂ y N₂ durante 5 min y después se esterilizó 15 min 15 lbs 121° C. Posteriormente se adicionó, 1 ml de glicerol estéril a 1 ml de cultivo propagado bajo condiciones de esterilidad y se guardó a - 20°C.

La reactivación de la cepa de *M. elsdenii*, se realizó con el medio que se describe en la sección 4.2.2, realizando resiembras cada 24 h durante 72 h; para ello se tomó el 10 % del volumen del cultivo previo como inóculo, es decir después de 24, 48 y 72 h, utilizando el último inóculo de 72 h para re-inocular en cultivos posteriores.

4.2. Medios de cultivo

Las cepas de hongos y levaduras se cultivaron en dos medios enriquecidos: agar papa dextrosa (PDA) y medio pasta de copra simple (PCS), se inocularon por picadura y se incubaron durante 120 h a 30° C .

El cultivo de *M. elsdenii* se realizó en condiciones anaerobias durante 35 h a 37° C, con agitación continua. Se tomó como referencia el medio de cultivo 19 para *Peptococcus*, recomendado por la Colección Española de Cultivos Tipo. En este estudio el medio de cultivo fue modificado reduciendo el 75% de su fuente de nitrógeno y cambiando la fuente de carbono glucosa por ácido láctico. Ver Tabla 4.2 y 4.3.

4.2.1. Medio de cultivo para hongos filamentosos y levaduras

a) Medio PDA:

Se utilizó agar de la marca comercial Bioxón y se preparó según las indicaciones de la misma.

b) Medio PCS:

Se prepara siguiendo la metodología que a continuación se describe.

- 1.- Pesar 300 g de pasta de copra en un matraz erlenmeyer de 2000 ml adicionar 1.5 litros de agua destilada para obtener un volumen final de un litro de infusión.
- 2.- Calentar 15 minutos con agitación sin llegar a ebullición aprox 70° C.
- 3.- Filtrar con gasa para separar los sólidos más gruesos.
- 4.- Filtrar el contenido del matraz con papel filtro Whatman No 3.

- 5.- Pesar 16 g de agar-agar.
- 6.- Adicionar un litro de la infusión, mezclar y ajustar a pH = 5.4.
- 7.- Esterilizar en autoclave a 121° C, 15 lbs/plug² 15 min.
- 8.- Vertir el contenido del matraz en cajas petri y dejar solidificar.

Para inocular el sustrato pasta de copra (Sección 4.4b), se propagó cada cepa en 50 ml del medio PCS durante 72 h a 35° C en matraces de 250 ml, y se resuspendieron las esporas con 50 ml de una solución al 10% de Tween 80 estéril. Las esporas recolectadas se contaron en cámara de Neubauer, ver Sección 4.8.1.

4.2.2. Medio de cultivo para microorganismos anaerobios

El medio de cultivo se prepara según los componentes de las Tablas 4.2 y 4.3.

Procedimiento:

- 1.- Ebullición durante 30 min 1.1 litros de medio de cultivo en un matraz erlenmeyer de 2 lts.
- 2.- Introducir hasta el fondo del matraz una corriente de CO₂, flujo para desplazar el O₂ disuelto en la fase líquida, y se espera a que el medio vire a un color rosa, en ese momento adicionar 0.5 g de clorhidrato de cisteína y dejar de calentar.
- 3.- Agitar el contenido del matraz para solubilizar el reactivo adicionado e introducir un electrodo de pH y hacer mediciones a intervalos regulares de tiempo hasta alcanzar un pH entre 7-7.5. **NOTA:** El medio de cultivo debe estar incoloro, si persiste el color rosado calentar un poco más sin llegar a ebullición.

4.- Si el pH desciende muy rápidamente, por efecto del CO₂, adicionar unas gotas de NaOH 8N ó incorporar una corriente de N₂ para amortiguar el pH. Cuando el pH se encuentra en el intervalo antes mencionado y el medio esta incoloro, se retira la corriente de CO₂ .

5.- Colocar 50 ml del medio de cultivo en frascos serológicos con la ayuda de una pipeta, la cual deberá ser llenada con una atmósfera de CO₂; sellar con tapón de hule y arillo de aluminio. En el frasco serológico deberá introducirse previamente una corriente de CO₂ y ser llenado con el medio de cultivo. El llenado en frascos serológicos es únicamente para preparar el pre-inóculo y realizar las cinéticas de fermentación.

6.- Esterilizar 15 min, 15 lbs, 121° C.

7.- Corroborar que el contenido de los frascos serológicos estén en condiciones de anaerobiosis (sin color), para posteriormente inocular .

8.- Inocular el contenido del frasco serológico (50 ml) con 10 % de inóculo de *M. elsdenii*; obtenido así, el pre-inóculo, mismo que se incuba durante 24 h a 37° C.

NOTA: Algunos frascos serológicos fueron llenados con 100 ml de cultivo, mismos que se utilizaron para las cinéticas de fermentación a los que se les agregó (2 %) de probiótico, producto de FS o testigos, además del 10 % de un pre-inóculo de *M. elsdenii*.

9.- Adicionado el inóculo y el aditivo a cada frasco serológico (100 ml), se mezcla y se retiran 5 ml mismos que se introducen en tubos de ensaye con tapón de rosca (estériles y en condiciones de anaerobiosis) y se repite el mismo procedimiento hasta obtener los tubos necesarios para la realización de la cinética de fermentación.

Tabla 4.2. Composición del medio de cultivo para la propagación de *M. elsdenii*.

MEDIO BASAL	MEDIO MODIFICADO	MEDIO ORIGINAL
Peptona de caseína	2.5 g	10 g
Extracto de carne	0.75 g	3.0 g
Extracto de levadura	0.75 g	3.0 g
Acido láctico	10 g	10 g
Tween 80	1 ml	1 ml
Clorhidrato de cisteína	0.5 g	0.5 g
Solución de sales	40 ml	40 ml
Indicador de anaerobiósis Resazurina	1 ml	1 ml
Agua	c. b. p. 1 litro	c. b. p. 1 litro

Tabla 4.3. Solución de sales para el medio de *M. elsdenii*.

SOLUCION DE SALES	CANTIDAD
Mg SO ₄ . 7 H ₂ O	0.2 g
K ₂ HPO ₄	0.2 g
KH ₂ PO ₄	1.0 g
NaHCO ₃	10.0 g
NaCl	2.0 g
Agua	c.b.p. 1 litro

4.3. Materias primas y sustratos utilizados

a) Pasta de copra

Se obtuvo de la Hidrogenadora Nacional S.A. de C.V de la Cd. de México.

b) Probióticos comerciales

Se evaluaron 3 probióticos comerciales Lacto-sacc, Yea-sacc 1026 y Yea-sacc 8417, obtenidos de la industria Alltech de México.

4.4. Condiciones de cultivo en columnas de fermentación con aireación forzada y difusión simple

Los cultivos en fermentación sólida se realizaron en columnas tipo Raimbault, como las que se ilustran en la Figura 4.2, con la variante de poder analizar CO_2 y O_2 durante el tiempo de fermentación mediante un dispositivo para medir los gases de la fermentación.

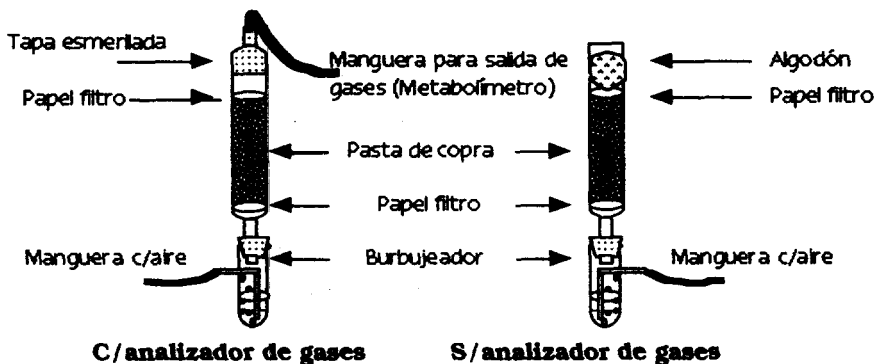


Figura 4.2. Columnas tipo Raimbault con o sin dispositivo para medir gases.

Las columnas se colocaron sobre un burbujeador por medio del cual se hacía pasar aire humidificado al interior de la columna, proporcionando así, condiciones aerobias al sistema. En la parte inferior de la columna se colocó una torunda de algodón y sobre ésta un papel filtro, que impedía que el material a fermentar pasara al orificio inferior de la columna.

NOTA: En todos los casos la pasta de copra recibió un pretratamiento que consistió en un tamizado de partícula en una malla con tamaño de poro de 8 a 20, estandarizando así el tamaño en un rango no mayor de 2.36 mm., y se esterilizó a 121° C, 15 lbs durante 30 min, así mismo las columnas de fermentación fueron esterilizadas con un algodón y papel filtro en el interior de las mismas.

a) Aireación por difusión simple

• Humedad de la pasta de copra	65%
• pH inicial	5.4
• Cantidad de inóculo	Bocado de 1 cm ² medio PCS/con crecimiento micelial de 60 h de cultivo
• Densidad de empaque	0.85 g/cm ³
• a_w	0.992
• Temperatura de incubación	30° C
• Tiempo de incubación	180 h
• Aireación	Difusión simple
• Tamaño de partícula de la pasta de copra	> 2.36 mm
• g de material por columna de fermentación	130 g
• Diámetro de la columna	3.6 cm
• Altura de la columna	20 cm

El cultivo en esta etapa experimental, fue realizado dentro de una incubadora marca Felisa, bajo las condiciones arriba mencionadas. En la Figura 4.3. se ilustra el tipo de columna usada, así como la colocación de las mismas durante el experimento.

Materiales y Métodos

Estas condiciones fueron utilizadas para evaluar el crecimiento axial de los diferentes hongos filamentosos en FS, siguiendo la metodología descrita por Raimbault y Alazard en 1980.

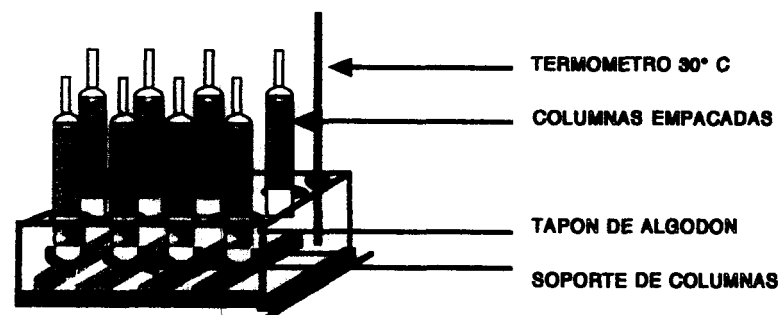


Figura 4.3. Dispositivo empleado para la evaluación del crecimiento axial en columnas.

La FS con aireación forzada se realizó bajo las condiciones de cultivo, que se presentan a continuación; utilizando el dispositivo que se ilustra en la Figura 4.4.

b) Aireación forzada

humedad de la pasta de copra	60%, o lo indicado en el texto
• pH inicial	5- 5.5
• Cantidad de inóculo	1×10^6 - 1×10^7 esporas/ml
• Densidad de empaque	0.7 g/cm^3
• a_w	0.992 ± 0.002
• Temperatura de incubación	30° C
• Tiempo de incubación	40 - 80 h (depende de cada cepa)
• Aireación	1 vkgm
• Tamaño de partícula de la pasta de copra	> 2.36 mm
• g de material por columna de fermentación	130 g
• Diámetro de la columna	3.6 cm
• Altura de la columna	20 cm

En la Sección 5 se realizó un estudio bajo estas condiciones de cultivo, variando el porcentaje de humedad a 50, 55, 60 y 65 %.

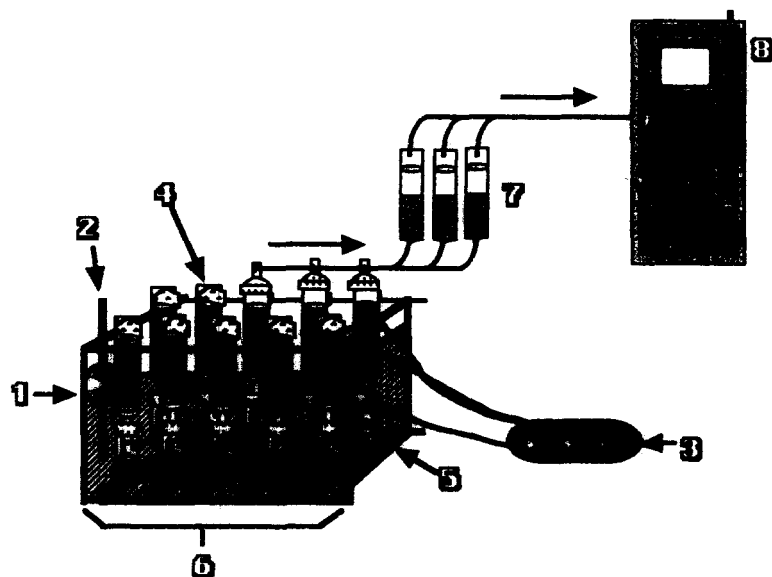


Figura 4.4. Dispositivo utilizado en la fermentación en medio sólido, conectado a un metabolímetro en donde: (1) Regulador de temperatura, (2) Termómetro, (3) Distribuidor de aire, (4) Columnas de fermentación, (5) Burbujeadores, (6) Baño de agua, (7) Columnas con sílica gel, (8) Metabolímetro.

La metodología empleada para analizar los gases producidos durante la fermentación se describe en la Sección 4.8.10.

4.5. Tratamiento de muestras de productos obtenidos por FS

Los productos de fermentación obtenidos recibieron un pretratamiento antes de realizar los análisis correspondientes, mismo que se detalla en la Figura 4.5.

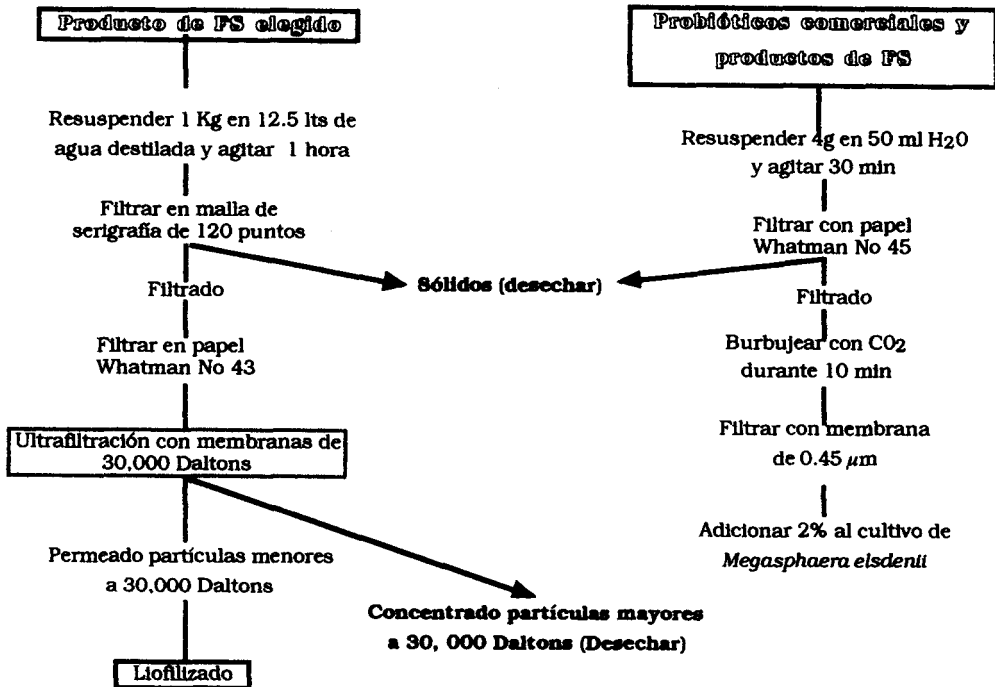


Figura 4.5. Tratamiento de muestras de Productos obtenidos por FS.

4.5.1. Preparación de probióticos comerciales y productos de FS para en análisis de actividad probiótica

Los productos obtenidos por FS, se secaron a temperatura ambiente hasta que perdieron su humedad. Los probióticos comerciales y productos de FS se prepararon bajo la técnica reportada por Nisbet y Martin en 1990, descrita a continuación e ilustrada en la Figura 4.6.

Procedimiento:

- 1.- Resuspender 4 g de probiótico ó producto de FS en 50 ml de agua destilada y filtrada.
- 2.- Agitar durante 1 h, y posteriormente filtrar en un matraz con papel Whatman No 45.
- 3.- Medir el pH de cada producto filtrado.
- 4.- El filtrado resultante se burbujea con CO₂ durante 10 min.
- 5.- El líquido burbujeado se esteriliza por filtración utilizando una membrana Millipore de 0.45 µm, mediante el empleo de una jeringa estéril de 5 ml.

NOTA: Todo el proceso se realiza en una atmósfera anaerobia y en condiciones de esterilidad.

- 6.- El filtrado se deposita en un frasco estéril que previamente se le acondicionó una atmósfera de CO₂.

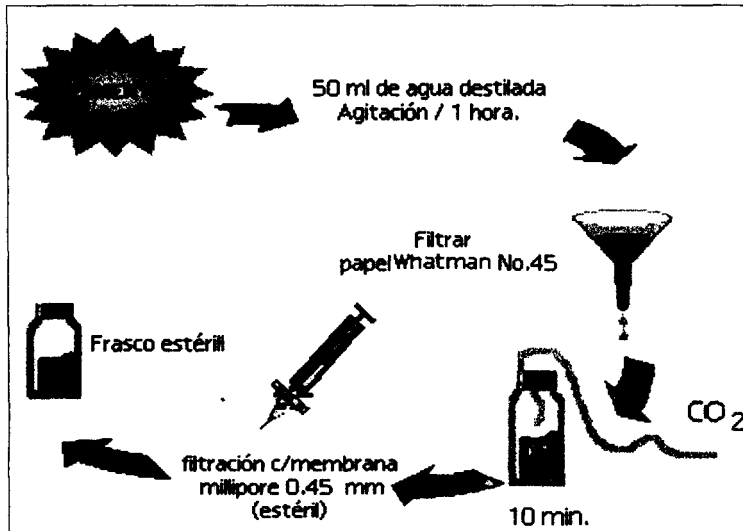


Figura 4.6. Preparación de probióticos comerciales y productos de FS.

Evaluados todos los productos de FS se eligió el que presentó mejor actividad probiótica realizando para ello una nueva FS (Ver sección 5.3). Así se obtuvo aproximadamente 1 Kg del nuevo material fermentado, mismo que se seco y se trató de la siguiente manera:

a) Se partió de un lote de 1 kg. de material fermentado y seco.

b) Se adicionaron 12,5 lts de agua destilada, se agitó por 1 h y se filtró al vacío en una malla de serigrafía de 120 puntos, encontrándose después del filtrado 28 g/l de sólidos solubles.

c) Posteriormente se filtró en papel Whatman No 43 y se obtuvieron 10 lts del filtrado que corresponden al 80 % de partículas en suspensión, el 20% restante fueron pérdidas.

Posteriormente los 10 lts obtenidos se filtraron con membranas de 30,000 Daltons usando la técnica de ultrafiltración, método que permite aislar los microorganismos de un líquido o de una suspensión, liberando únicamente partículas en solución.

4.5.2. Técnica de ultrafiltración

Esta metodología se utilizó como un paso previo al liofilizado del producto de FS elegido. Se utilizaron membranas de 30 000 Daltons (Superficie = 60 x 600 cm²), 18°C de temperatura y un flujo de 10 ml/min,

Procedimiento de la técnica:

1.- Colocar en la cámara que contiene el equipo un máximo de 10 membranas para ultrafiltración de 30,000 Daltons, intercalando en cada caso un separador de membranas.

2.- Cerrar la cámara a presión y colocar las mangueras de entrada y salida del filtrado.

3.- Realizar una prueba de integridad con agua destilada, este paso es de interés ya que se comprueba si el equipo esta libre de fugas, tanto en mangueras y manómetros. Si no existen fugas continuar con el paso 4, de lo contrario iniciar el proceso (el equipo trabajo con un presión de 10 lbs).

4.- Colocar la manguera en el recipiente que contiene el material a filtrar, encender la bomba y estabilizar el flujo de salida del permeado a 10 ml/min.

5.- Se obtienen dos soluciones: Un permeado que contiene partículas menores a 30,000 Daltons, y un concentrado que contiene partículas mayores a 30,000 Daltons.

6.- Apagar la bomba del equipo, desmontarlo y lavar las membranas en una solución de 0.05 NaOH y guardar en una solución de NaOH a la misma concentración.

Con este tratamiento de los 10 lts iniciales se recuperaron 5 lts (permeado), encontrándose inmersos sólidos solubles < a 30,000 Daltons. Posteriormente se liofilizaron los 5 lts obteniendo 150 g de sólidos solubles. El liofilizado se realizó en el centro de productos bióticos (CEPROBI) de la UNAM, en Yautepec, Morelos.

4.6. Evaluación de la actividad probiótica

Los experimentos con productos de FS y probióticos comerciales se evaluaron mediante el análisis de biomasa por densidad óptica, ácido láctico (equipo YSI modelo 2700), ácidos grasos volátiles, propiónico, acético y butírico (cromatografía de gases) y pH. Los experimentos se hicieron por duplicado tomando muestras a intervalos de tiempo regulares durante 35 h de cultivo. La temperatura de incubación fue de 37°C (Campos y Viniegra. 1995). Ver detalle de las técnicas en la Sección 4.8.2b, 4.8.6, 4.8.8, 4.8.9.

4.7. Tratamiento de muestras realizado para probar el efecto probiótico

Las muestras obtenidas del cultivo con *M. elsdenii* se procesaron siguiendo el esquema que se presenta en la Figura 4.7.

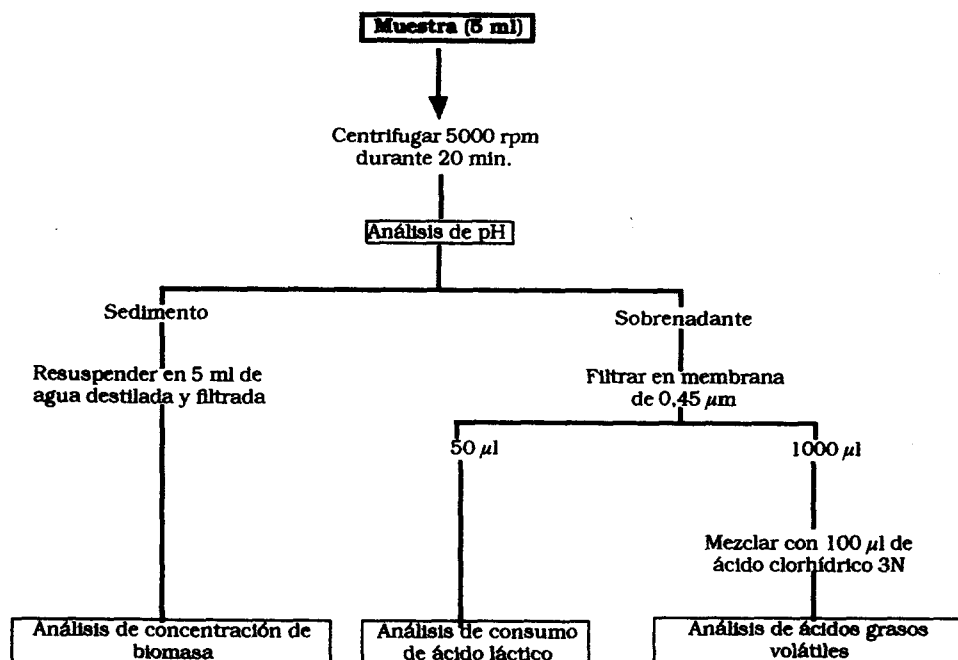


Figura 4.7. Esquema del tratamiento de muestras provenientes del cultivo con *M. elsdenii* para la evaluación de la actividad probiótica.

4.8. Técnicas analíticas

En esta sección se describen a detalle las técnicas analíticas utilizadas en este estudio.

4.8.1 Conteo de esporas. AOAC, (1987)

1.- Se parte de una suspensión de esporas contenidas en una solución al 10 % de tween 80.

2.- Se coloca una gota de la suspensión en ambos extremos de la cámara de Neubauer y se procede al conteo de esporas.

3.- Se cuentan las esporas en 9 cuadros al azar, de 1 campo de la cámara de Neubauer.

4.- Si la muestra esta muy concentrada se recomienda hacer diluciones y se procede al paso 3. Se recomienda que las esporas que se cuentan por cuadro no exceda de 20, ya que puede hacer un error en el conteo si se excede esta cantidad.

5.- Obtenido el conteo se saca el promedio general de las esporas contadas.

Cálculos:

$$\text{No de esporas por cuadro (promedio)} \times 25 \text{ (No de cuadros de la cámara)} \times (10^4 \text{ volumen de a cámara}) \times (\text{dilución}) = \text{Esporas por ml de solución.}$$

4.8.2. pH. AOAC, (1987)

Se determinó con el uso de un potenciómetro Conductronic pH 20. Antes de usarse el potenciómetro se debe calibrar con soluciones standard de buffer de pH conocidos pH 4 y 7. Los electrodos del potenciómetro se lavan con agua destilada y se sumergen en la solución a medir. El pH se lee en la escala del aparato. Las instrucciones detalladas para el manejo de este equipo se presenta a continuación.

a) Muestras sólidas. AOAC, 1987.

Para el caso de las muestras provenientes de la fermentación sólida se procede de la siguiente manera:

1.- Se calibra el equipo con estándares de pH conocidos (4 y 7) y se lava el electrodo con agua destilada y se seca con papel absorbente.

2.- Resuspender 0.5 g de muestra en 5 ml de agua destilada y homogeneizar con la ayuda de un agitador magnético durante 1 minuto.

3.- Medir el pH directamente en la suspensión acuosa resultante.

4.- Lavar el electrodo con agua destilada y secar con papel absorbente y se continúa con el paso 3.

b) Muestras líquidas. AOAC, 1987.

Se realizan los mismos pasos que el inciso a, omitiendo el paso 2 para este tipo de muestras.

4.8.3. Pérdida de materia seca (PMS). AOAC, 1987.

- 1.- Pesar la columna de fermentación antes de empacar con el sustrato a fermentar.
- 2.- Pesar la columna con el material a fermentar.
- 3.- Pesar la columna con el material fermentado al final del proceso.

Para realizar los cálculos es necesario conocer también la humedad inicial y final del producto, para conocer la materia seca al final del proceso, ver Sección 4.8.5.

Cálculos: $MSI - MSF / MSI \times 100$.

En donde MSI= Materia seca inicial.
MSF= Materia seca final.

4.8.4. Actividad de agua a_w . AOAC, (1987)

Se realizó en un equipo marca AQUA-LAB modelo CX-2

- 1.- Calibrar el equipo con agua destilada (depositar en una charola provista por el equipo), hasta que en la pantalla indique una actividad de agua de 1.
- 2.- Colocar 1 g de muestra y extender en una charola.
- 3.- Introducir la charola en el orificio del equipo y cerrar el compartimento.
- 4.- Cuando se escuche la alarma que indica el término del proceso, el equipo reportará el resultado en la pantalla.

4.8.5. Humedad. AOAC, 1987.

- 1.- Pesar 1 g de material de estudio y depositarlo en un recipiente (vaso de precipitado ó charola de aluminio), que previamente se llevó a peso constante y anotar su peso.
- 2.- Colocar el recipiente en estufa a 70° C, y retirar transcurrido 24 h.
- 3.- Colocar el recipiente en un deshumidificador y esperar hasta que la muestra registre peso constante.
- 4.- Pesar el recipiente y anotar el resultado.

Cálculos: $P1 - P2/P1 \times 100$

En donde: P1= Peso del recipiente con muestra al inicio del proceso.

P2 = Peso del recipiente con muestra al final del proceso.

4.8.6. Biomasa (Densidad óptica)

Se cuantificó la producción de biomasa microbiana en un espectrofotómetro marca Shimatzu, empleando la técnica de turbidimetría a una longitud de onda de 660 nm reportada por Campos y Viniegra, 1995 y Ramírez-Islas, 1995. Se utilizó como testigo agua destilada y filtrada y se analizaron muestras a intervalos regulares de tiempo.

Procedimiento:

- 1.- Obtenida la muestra del cultivo con *M. elsdenii* (5 ml), colocar en un tubo su contenido y centrifugar a 5000 rpm durante 20 minutos.
- 2.- Separar el sobrenadante con la ayuda de una jeringa y guardar para estudios de AGV's y ácido láctico.

3.- Resuspender las células en 5 ml de agua destilada y filtrada, agitar con ayuda de un vortex.

4.- Programar el equipo y calibrar con agua destilada y filtrada para realizar lecturas a 660 nm.

5.- Colocar la muestra en un celda (aprox 1 ml), y colocarla en el receptor de muestras del equipo, cerrar el compartimento y registrar el resultado.

4.8.7. Biomasa (Peso seco). AOAC, (1987).

Para conocer la concentración de biomasa de *M. elsdenii* se realizó una curva patrón a partir de un cultivo de 20 h de incubación con un volumen de 500 ml, se tomaron muestras de 1 a 8 ml en tubos de centrifuga, que previamente se llevaron a peso constante. Los resultados de la curva patrón de conversión de (DO) en concentración de biomasa para el cultivo de *M. elsdenii*, se presentan en la Figura 4.8.

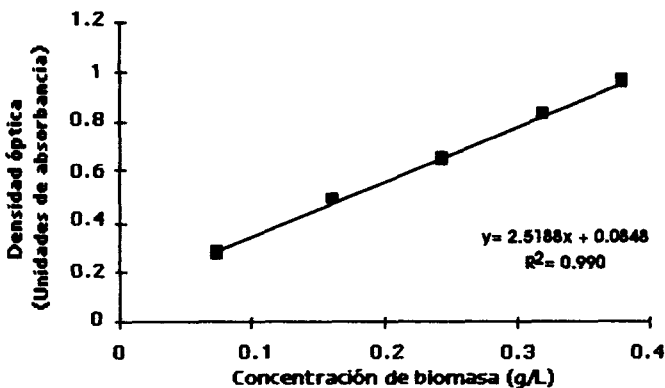


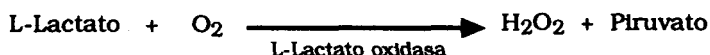
Figura 4.8. Curva patrón de conversión de densidad óptica a concentración de biomasa (en peso seco).

Con la obtención del peso seco de las células se construyó una curva patrón de peso seco de biomasa/ml contra la densidad óptica (D.O), en donde se observa que, en el rango de 0.075 - 0.39 g de biomasa/L y 0.24 - 1 unidades de absorbancia, la relación es lineal entre ambas. También se presenta la ecuación de regresión lineal con su correspondiente coeficiente de correlación el cual indica que el ajuste realizado es confiable.

4.8.8. Ácido L-Láctico

Se realizó con un equipo automatizado marca YSI, modelo 2700 que tiene la capacidad de medir ácido láctico y glucosa, detectando concentraciones a bajo de 0.5 g/L. El equipo posee controles de ácido láctico y glucosa; la muestra problema se introduce en un tubo capilar provisto por el equipo, el cual absorbe 20 μ l de muestra y reporta los resultados en un lapso no mayor a 2 min. El YSI posee un sensor enzimático que detecta una o muchas reacciones catalíticas que dan como producto final peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el cual es oxidado electroquímicamente. Dependiendo del análisis que se realice se cambia la membrana del equipo, en este estudio la enzima L-Lactato oxidasa fue inmovilizada en la membrana de L-Lactato del equipo YSI. **Ref.** Manual de operación del equipo YSI.

La reacción es la siguiente:



Procedimiento: (Equipo enzimático YSI).

1.- Obtenida la muestra del cultivo (5 ml), colocar en un tubo de centrifuga su contenido y centrifugar a 5000 rpm durante 25 minutos.

2.- Separar el sobrenadante con la ayuda de una jeringa y filtrar con membrana de 45 μ (colocar 1 ml en un tubo Eppendorf).

3.- Si se sospecha que la muestra tiene una concentración mayor de 0.5 g/L, se recomienda hacer una dilución; esto con el propósito de no rebasar la linealidad del equipo.

4.- Encender el equipo y calibrar con un estándar de glucosa 2.5 g/L y L-Lactato 0.5 g/L. El equipo indicará en la pantalla si esta listo para procesar.

5.- Insertar el tubo que contiene la muestra en el capilar el equipo y esperar a que aspire 20 μ l de su contenido.

6.- El equipo reporta automáticamente el resultado.

4.8.9. Ácidos grasos volátiles (AGV's). AOAC, (1987)

La cromatografía cuantitativa se basa en la separación de los componentes de una mezcla de sustancias a través de las diferencias de afinidad con el soporte con el que esta empacada la columna. En este estudio se midió la aparición de ácido acético, propiónico y butírico, producto del consumo de ácido láctico que se uso como fuente de carbono.

Se utilizó un cromatografo de gases marca Varian, provisto de un analizador automático adaptado para 48 muestras, conectado a un integrador marca Varian. Se utilizó un detector de ionización de flama y se utilizó una columna de aprox 1.6 m de largo que consiste en un tubo de acero inoxidable de 1/8 de pulgada, la columna fue llenada con porapac, las condiciones para el análisis fueron: 180° C en la columna, 270° C en el inyector, 260° C en el detector auxiliar (1) y 50° C en el detector (2).

Se utilizaron estandares de 0.5, 0.75 y 1 g/L de una mezcla de ácido propiónico, acético y butírico; las muestras se diluyeron a 0.5 g/L para prolongar la vida útil de la columna y se lavó la columna con una solución de acetona:ácido clorhídrico 3 N a intervalos de 4 muestras. Los tiempos de retención típicos de los ácidos grasos analizados y la técnica detallada se presenta a continuación.

Compuesto	Tiempo de retención (minutos)
Acido acético	0.87
Acido propiónico	1.55
Acido butírico	2.36

Procedimiento:

1.- Obtenida la muestra del cultivo (5 ml), colocar en un tubo de centrifuga su contenido y centrifugar a 5000 rpm durante 25 minutos.

2.- Separar el sobrenadante con la ayuda de una jeringa y filtrar con membrana de $45\ \mu$ colocar 1 ml del filtrado en un tubo con tapón de rosca, provisto de una membrana de hule para evitar la volatilización de los compuestos.

3.- Adicionar $100\ \mu$ l de una solución de HCL 3N a 1 ml del filtrado. Este paso se realiza para acidificar la muestra y disociar sus componentes, evitando que se retengan los compuestos en la columna.

4.- Se procede al encendido del equipo, abriendo las válvula del tanque de N_2 para estabilizar el equipo.

5.- Encender la flama del equipo, para ello se abren las válvulas de los tanques de hidrógeno y aire, oprimir la tecla Shift-Ignite (20 seg) y esperar a que en la pantalla aparezca que la flama esta encendida (verificar con la tecla Status).

6.- Dejar estabilizando el equipo por 12 h.

7.- Encender el integrador y programar atenuación = 16, velocidad de carta 0.5, tiempo de integración 3.5 min, Nivel 1000 ± 2 , observación del ruido no mayor a 50.

8.- Programar el equipo con la cantidad de testigos, muestras y lavados de la columna.

9.- Iniciar la programación y reportar los resultados.

4.8.10. Análisis de gases (Metabolímetro)

El metabolímetro o calorímetro es un sistema de medición que tiene como propósito medir el metabolismo basal de algún ser viviente (Durken, 1979), midiendo fundamentalmente las concentraciones de los gases fisiológicos (Oxígeno y bióxido de carbono) durante el ciclo de respiración; pensando que el metabolismo basal es principalmente un proceso de combustión observable por el consumo de Oxígeno y producción de bióxido de carbono (Cadena, et al. 1993).

El equipo utilizado fue desarrollado en la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa; consta de un detector infrarrojo para CO₂ y un detector paramagnético para O₂. Es un sistema de análisis térmico y deflexión basados en la fuerte afinidad de O₂ por un campo magnético y un medidor de flujo de la mezcla de gases que entra al sistema. El equipo esta provisto de una computadora que permite realizar la calibración automática de los detectores, la programación de la frecuencia del análisis y almacenamiento de datos de forma continua con capacidad para 11 muestras.

La calibración se realiza cada 4 h mediante el suministro de flujo de N₂, y de una mezcla de concentraciones conocidas de CO₂ y O₂. El programa almacena en forma de tablas los resultados del análisis de CO₂ y O₂ en porciento, y el flujo del gas en ml/min (Saucedo-Castañeda, 1991 y Saucedo, et al. 1996).

El análisis se llevó acabo en columnas de fermentación tipo Raimbault descritas en la Sección 4.4b, monitoreando la producción de CO₂ y O₂ durante un período de 120 h.

4.9. Identificación química de compuestos

La identificación de los componentes de una mezcla implica, primero, la separación de ellos en compuestos individuales y, segundo la caracterización de cada uno de estos últimos, es por ello que la separación de los compuestos debe ser tan cuantitativa como sea posible para obtener idea aproximada del porcentaje real de cada componente.

Es por ello que los análisis químicos para determinar las estructuras o composición de un material de estudio deben ser selectivos o tener un grado de sensibilidad elevado para asegurar que los resultados sean confiables. Para la identificación de grupos funcionales de moléculas presentes en un probiótico se utilizaron las técnicas que a continuación se describen.

Para ello se partió de 120 g de un producto de FS elegido (fermentado sólido con *P. roquefortii*) realizando extracciones sucesivas con disolventes de diferente polaridad, purificación de compuestos e identificación química.

4.9.1. Extracción con disolventes de diferente polaridad

Se realizaron extracciones con Hexano, Acetato de etilo, Etanol y Agua (Ver Tabla 4.4), el método consiste en extraer mediante un extractor de flujo continuo los compuestos producidos durante la fermentación sólida siguiendo la presente técnica.

- 1.- Pesar 120 g del producto a extraer, y colocarlo en un cono de papel filtro.
- 2.- Colocar el cono en un soxtler, embonar el soxtler en un matraz bola de 250 ml que contiene perlas de vidrio (parte inferior), y en la parte superior del soxtler colocar un refrigerante, sujetar estos materiales a un soporte (Ver Figura 4.9).
- 3.- Adicionar 200 ml de Hexano (previamente destilado), y colocar el matraz bola en una parrilla y esperar a que el disolvente empiece a ebullición observando reflujo en el sistema.
- 4.- Si el disolvente ebulle pero no refluja, colocar papel aluminio en las paredes del soxtler para conservar la temperatura y permitir que se evapore el disolvente y empiece a recircular.
- 5.- Esperar 24 h a flujo constante y cambiar de disolvente (Acetato » ETOH y Agua), y realizar el mismo procedimiento a partir del punto 3.

6.- Recuperar el extracto de Hexano en un matraz bola de 250 ml y concentrar con la ayuda de un rotavapor, realizar el mismo procedimiento para las extracciones sucesivas

7.- Colocar el concentrado en un vaso de precipitado (previamente llevado a peso constante), y dejar evaporar el residuo de disolvente.

8.- Pesar el vaso de precipitado y por diferencia de peso obtener los gramos de extracto recuperado con Hexano, Acetato de etilo, Etanol y Agua.

Tabla 4.4. Características de los disolventes utilizados.

NOMBRE COMÚN	CLASE	ESTRUCTURA	PUNTO DE EBULLICION
Hexano	Alcano	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$	68° C
Acetato de etilo	Ester	$\text{CH}_3\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	77° C
Etanol	Alcohol	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$	78° C
Agua		H_2O	92° C

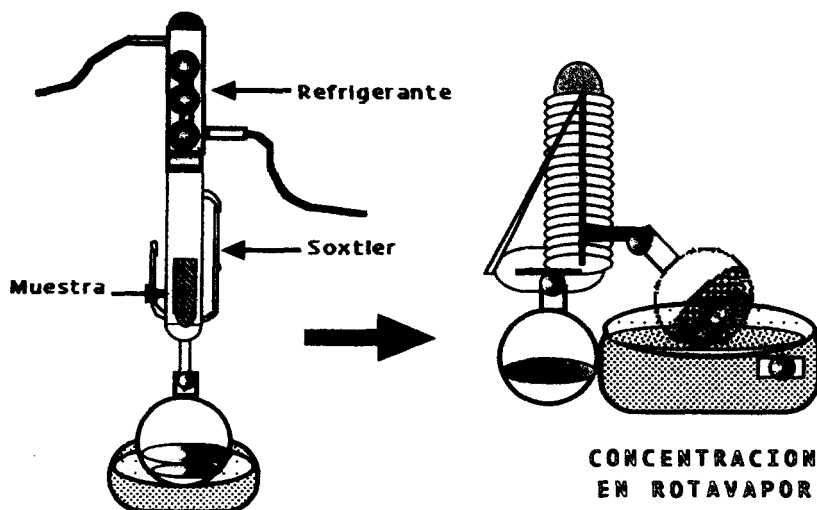


Figura 4.9. Extracción con disolventes.

Del producto inicial (120 g), se recuperaron 0.32 g del extracto con hexano, 0.71 g del extracto con acetato de etilo, 7.42 g de extracto etanólico y 97.75 g de extracto acuoso. A cada uno de los extractos se les realizó el análisis de actividad probiótica descrito en las Secciones 4.8.2b, 4.8.6, 4.8.8 y 4.8.9.

4.9.2. Purificación de compuestos

Se utilizaron columnas gravitatorias compactadas en seco con gel de sílice marca Merck en dos tamaños de malla, 35-70 (0.2-0.5 mm) y 230-400 (0.040-0.063). Se emplearon disolventes de grado industrial y se purificaron por destilación a través de una columna de rectificación. La elución de los compuestos se hizo utilizando un gradiente de polaridades, comenzando con hexano puro y mezclas de hexano- acetato de etilo, acetato de etilo, acetato de etilo- etanol, etanol, etanol-agua y finalizando con agua.

Se realizaron cromatografías en capa fina sobre soporte de vidrio, empleando gel de sílice marca Merck 60 GF 254, revelando con luz ultravioleta de onda corta y onda larga (254 - 365 nm) y mediante el empleo de vapores de yodo.

La purificación consiste en el aislamiento de compuestos a partir de extracciones sucesivas con disolventes de distinta polaridad, para este fin se utilizó la técnica convencional de cromatografía en columna gravitatoria, cristalización y cromatografía en capa fina. La confirmación de un compuesto puro se realiza por el análisis de punto de fusión y se compara en tablas.

Obtenido el concentrado de interés se procede de la siguiente manera.

a) Cromatografía en columna gravitatoria

1.- En una columna cromatográfica de 50 cm de largo por 4 cm de diámetro (Ver Figura 4.10), colocar una cama de algodón de aprox 0.5 mm de espesor y empacar con gel de sílice marca Merck de tamaño de partícula entre 0.2 - 0.5 mm, hasta una altura de 5 cm.

2.- Agregar gel de sílice marca Merck de 0.040 - 0.063 mm hasta una altura de 20 cm aprox, y colocar una cama de algodón de 5 cm de espesor, colocando encima

de esta la cabeza de la columna (Mezcla del 80 g de extracto acuoso con una porción de gel de sílice).

3.- Agregar 500 ml de Hexano al 100% y abrir la llave de la columna y esperar a que fluya el disolvente.

NOTA: En este estudio se eluyó con las siguientes mezclas de disolventes: Hexano (100%), Hexano-Acetato (80:20), Hexano-Acetato (60:40), Hexano-Acetato (20:80), Acetato (100%), Acetato-Etanol (5:95), Acetato-Etanol (95:5), Acetato-Etanol (90:10), Acetato-Etanol (85:15), Acetato-Etanol (80:20), Etanol (100%), Etanol-Agua (80:20), Etanol-Agua (60:40), Etanol-Agua (40:60), Etanol-Agua (20:80), Etanol-Agua (80:20) y Agua (100%).

4.- Recibir 250 ml de cada elución en un matraz bola de 700 ml y concentrar en rotavapor. Este concentrado corresponde a una fracción.

5.- Colocar el concentrado en un vaso de precipitado (previamente llevado a peso constante), lavando 3 veces el matraz bola para recuperar los residuos de las paredes del matraz.

6.- Dejar evaporar el residuo de disolvente contenido en el vaso de precipitado.

La adición del disolvente debe ser de lo menos polar a lo más polar, considerando que la gel de sílice es polar y retiene a los compuestos con esta afinidad, por lo tanto los compuestos polares suelen ser los primeros en obtenerse.

Posteriormente se realiza una cromatografía en capa fina para observar los componentes presentes en cada fracción y poder agrupar algunas fracciones que presenten el mismo corrimiento en placa.

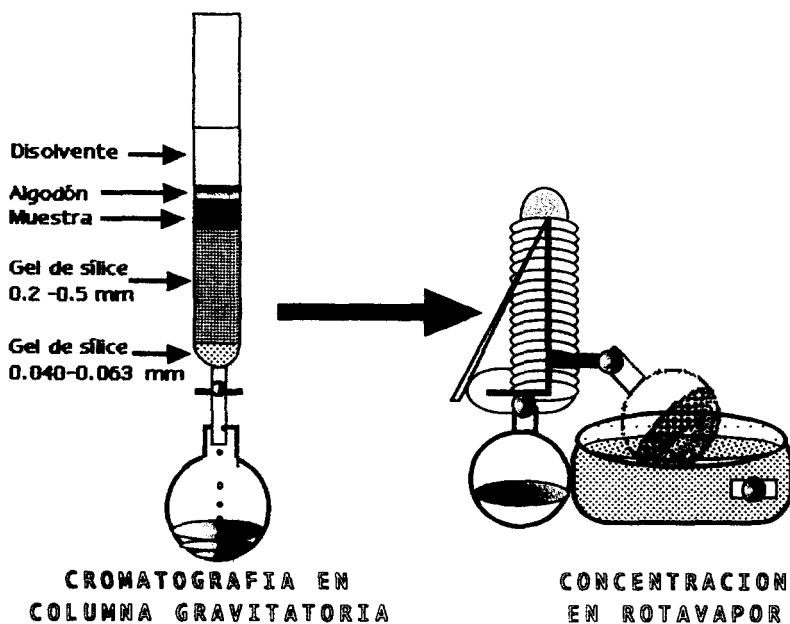


Figura 4.10. Cromatografía en columna gravitatoria.

b) Cristalización

La cristalización se puede observar cuando se ha evaporado por completo el disolvente contenido en el vaso de precipitado (Punto 6 de la técnica anterior). La cristalización no se presenta en la mayoría de los casos, pero es indicativo en ocasiones de la presencia de un compuesto puro y significa el final de la purificación. Cuando no se presentan cristales, se realiza una cromatografía en capa fina, en donde se pueden agrupar por bloques las fracciones que presenten las mismas características cromatográficas y se procede a una nueva purificación en columna gravitatoria. Obtenidos los cristales se somete la muestra a una análisis de RMN ^1H y ^{13}C .

c) Cromatografía en capa fina

Las placas cromatográficas se realizan empleando gel de sílice marca Merk 60 GF-254 sobre soportes de vidrio, la técnica se presenta a continuación.

1.- Preparar una placa cromatográfica con gel de sílice Merk GF-254.

2.- Seca la placa cromatográfica y con el uso de capilares se toman pequeñas muestras de las fracciones obtenidas, y se colocan en la placa. Las muestras deben eluirse con el disolvente adecuado según la polaridad de los productos a separar.

3.- Se coloca la placa en una cámara que contiene el disolvente indicado para eluir la muestra y se deja correr hasta una tercera parte de la placa cromatográfica.

4.- Se deja secar la placa y se observa en luz ultravioleta a dos longitudes de onda 365 nm y 254 nm. En la placa se observara los componentes de cada fracción representado por manchas de color fluorescente bien definidas.

5.- La placa cromatográfica también puede ser revelada con vapores de iodo, en donde se observan manchas de color café.

4.9.3. Identificación de compuestos

La elucidación estructural de los metabolitos aislados se efectuó mediante el empleo de técnicas espectroscópicas utilizando un equipo de resonancia magnético nuclear (^1H , ^{13}C), Gemini 200 marca Varian. Los puntos de fusión fueron leídos en un aparato Fisher-Johns y no están corregidos.

Resultados y Discusión

5.1. ADAPTACIÓN Y CRECIMIENTO DE CEPAS HONGOS FILAMENTOSOS EN DOS MEDIOS DE CULTIVO (PDA Y PCS)

En esta parte experimental se presentan los resultados de adaptación de 4 cepas de hongos filamentosos al cultivarse en medio PDA y pasta de copra simple (PCS) durante 120 h a 30° C. Se analizó el crecimiento radial, axial y la cuantificación de biomasa en ambos medios de cultivo. Así mismo se realizó una isoterma de adsorción de agua de pasta de copra para conocer la humedad y actividad de agua idónea para realizar cultivos en fermentación sólida.

5.1. 1. Crecimiento radial en caja Petri con medios PDA y PCS

En las Figuras 5.1 y 5.2 se muestra el crecimiento radial de 4 hongos filamentosos; cuyo objeto fue medir la capacidad de invasión micellar en un medio de cultivo para hongos (PDA) y en un medio de infusión pasta de copra simple (PCS), siendo el modelo de estudio cajas Petri de 10 cm de diámetro.

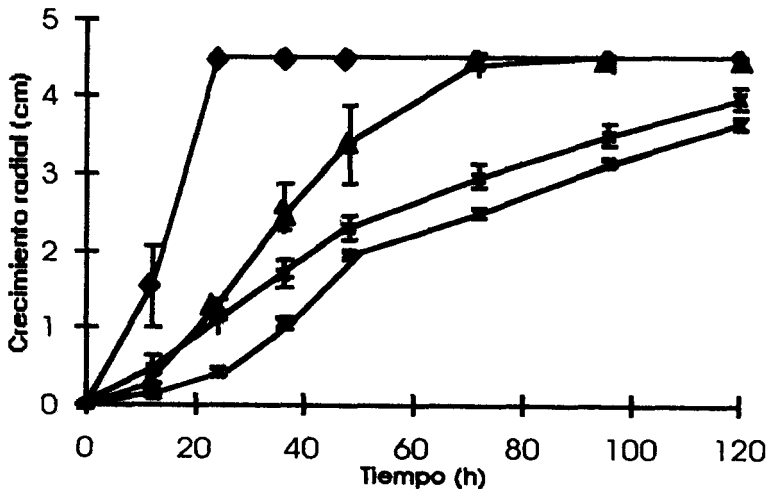


Figura 5.1. Crecimiento radial en medio PDA de (▲) *P. roquefortii*, (◆) *R. nigricans*, (X) *A. oryzae* 2094, (✱) *A. oryzae* 2095 incubados a 30° C en cajas Petri.

En la Figura 5.1 se observa que la cepa de *R. nigricans* es la que tiene una invasión micelar más rápida, teniendo un comportamiento similar la cepa de *P. roquefortii* misma que presenta su fase exponencial entre las 20 y 60 horas de cultivo. Respecto a las cepas de *A. oryzae* 2094 y 2095 mostraron un perfil muy similar durante el cultivo, siendo estas las de menor invasión micelar.

Hay que destacar que estos resultados coinciden con los reportados por Pineda y Pérez en 1996, en donde observan que la cepa de *R. nigricans* y *P. roquefortii* son las que invade en menor tiempo el sustrato, así mismo Flores y García en 1995 reportan que las cepas que tienen mejor velocidad de crecimiento radial son *Rhizopus* con 3.11 cm/día, *Aspergillus* 1.93 cm/día y *Penicillium* 0.14 cm/día.

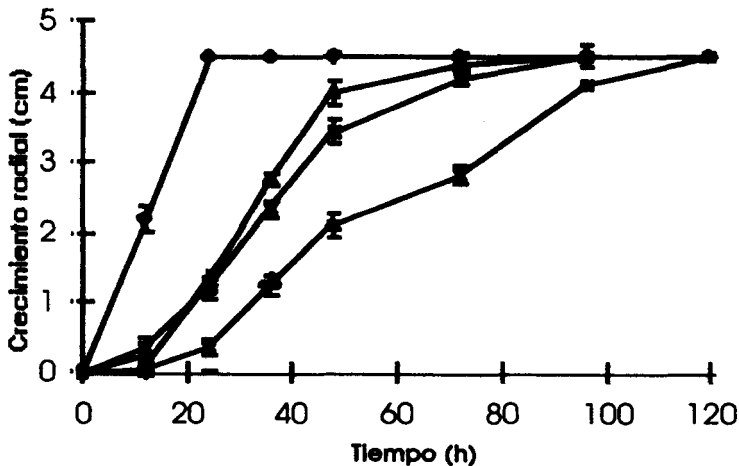


Figura 5.2. Crecimiento radial en medio PCS de (▲) *P. roquefortii*, (◆) *R. nigricans*, (X) *A. oryzae* 2094, (✱) *A. oryzae* 2095 incubadas a 30° C en cajas Petri.

En la Figura 5.2. se muestra el crecimiento radial en PCS en donde se observa que todas las cepas tienen un perfil de crecimiento micellar similar al de la Figura 5.1. Sin embargo hay que destacar que en todos los casos la invasión en caja Petri se manifiesta en un periodo de cultivo más corto (50-70 h), lo que indica que el medio PCS tiene probablemente más nutrientes disponibles, propios de los sólidos solubles de la pasta de copra.

El crecimiento radial expresado anteriormente es un método básico para estudiar la fisiología de los microorganismos. El diámetro de las colonias y la velocidad de crecimiento radial (VCR) son parámetros empleados en diversos estudios microbiológicos como los reportados por Trinci en 1969, en donde menciona que la velocidad de crecimiento hifal en hongos tiene un comportamiento lineal y que puede ser expresado en término de velocidad empleando para ello las pendientes propias de cada cepa, obteniendo así las velocidades reales de invasión micellar en cultivos de hongos filamentosos. En la Sección 5.3 se presenta la comparación de las velocidades de crecimiento radial de cada cepa evaluada en medio PDA y PCS.

5.1.2. Crecimiento axial en columnas de FS empleando difusión simple

La capacidad de invasión observada al realizar el análisis de crecimiento axial y crecimiento radial coinciden en ambos casos, sin embargo hay que resaltar que en el cultivo axial se esperaba una invasión total en las columnas, sin embargo no se presentó así debido posiblemente a que este tipo de análisis se realizó por difusión simple (sin aireación constante a 30° C), existiendo la posibilidad de que la humedad inicial (55%) del cultivo de la pasta de copra, se fuera perdiendo con el transcurso del tiempo, ello impidió posiblemente, que los microorganismos perdieran la capacidad de invasión, ya que es sabido que necesitan un mínimo de humedad y actividad de agua para realizar sus actividades metabólicas. Con ello se puede justificar que el crecimiento axial en columna no resultó el esperado (invasión completa).

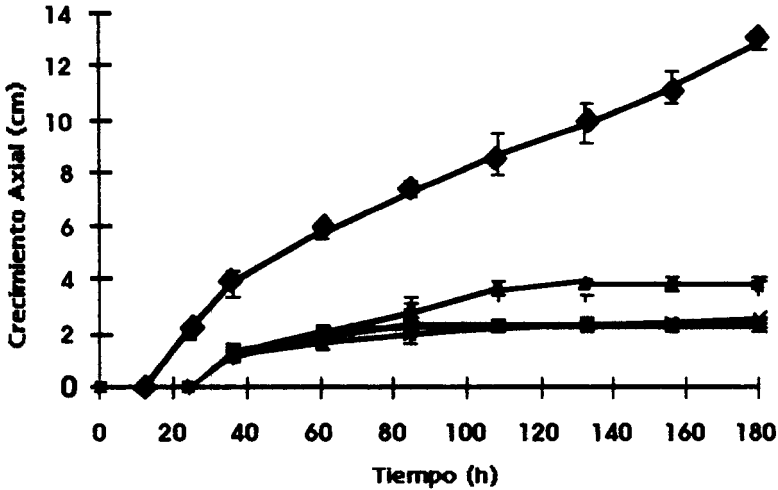


Figura 5.3. Crecimiento axial en columnas de fermentación, aireadas por difusión simple. En donde: (▲) *P. roquefortii*, (◆) *R. nigricans*, (X) *A. oryzae* 2094, (*) *A. oryzae* 2095.

En la Figura 5.3 se expresan los resultados de crecimiento axial en columna de FS con pasta de copra por difusión simple, observado que la cepa de *R. nigricans* invade completamente la columna al final del cultivo. Las cepas restantes presentan una invasión más lenta en una cuarta parte de la columna y no presentan invasión aparente desde las 60 h.

Con este estudio se pretendía conocer la adaptación de microorganismos al sustrato (pasta de copra), sin embargo los resultados hacen suponer que es necesario que los microorganismos se encuentre en un ambiente idóneo para realizar su funciones metabólicas y que la limitante en este tipo de procesos es entre otros, es la falta de una aireación constante durante el cultivo.

5.1.3. Comparación de la velocidad de crecimiento axial y radial

En esta sección se presenta la comparación entre las velocidades de crecimiento axial y radial de las 4 cepas probadas, tomando únicamente los valores de la pendiente en cada caso.

En la Figura 5.4 se muestra la velocidad de invasión radial en dos medios de cultivo PDA y PCS, mismas que se calcularon con el valor de la pendiente en la parte lineal de crecimiento; observando que las cepas que tienen mayor velocidad de crecimiento en caja petri son las mismas que invaden con mayor rapidez el sustrato (Figura 5.5).

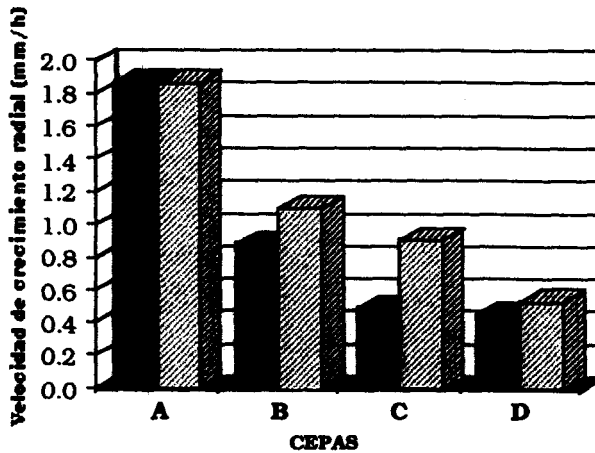


Figura 5.4. Velocidad de crecimiento radial en un cultivo de 120 h a 30° C de las cepas (A) *R. nigricans*, (B) *P. roquefortii*, (C) *A. oryzae* 2094 y (D) *A. oryzae* 2095. En donde: ■ medio PDA y ▨ medio PCS

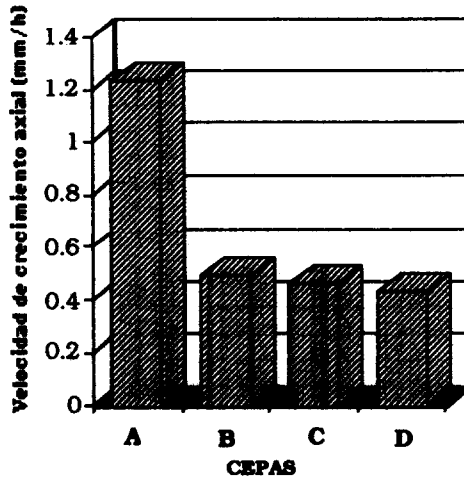


Figura 5.5. Velocidad de crecimiento axial en un cultivo de 180 h a 30° C en pasta de copra en donde: (A) *R. nigricans*, (B) *P. roquefortii*, (C) *A. oryzae* 2094 y (D) *A. oryzae* 2095.

Con el análisis de velocidad de crecimiento axial y radial expresado con valores de la pendiente es posible seleccionar las cepas de hongos filamentosos a utilizar en cultivos en medio sólido, así mismo es indicativo del comportamiento y adaptación de las cepas a un sustrato determinado, por ejemplo la velocidad de crecimiento radial en medio PDA y PCS, en donde se observa que hay diferencias al utilizar diferentes medios de cultivo, en donde el indicativo principal es la densidad de la colonia e invasión micelial. Según Trinci en 1969 menciona que existe una variación de la densidad de la colonia dependiendo del hábitat en donde se encuentre el hongo filamentoso, existiendo mayor extensión y diámetro de la colonia en sustratos con mejores nutrientes de donde adquieren la fuente de energía necesaria para realizar sus funciones metabólicas. Así mismo menciona que las colonias de hongos nunca tiene una densidad mayor que las bacterias o levaduras y la causa principal es probablemente porque en la fase hifal existe una limitación de oxígeno.

5.1.4. Producción de biomasa en caja petri

En la Figura 5.6 se expresa la producción de biomasa al final del cultivo en dos medios de cultivo, en donde se observa que existen diferencias marcadas al utilizar uno u otro medio, indicando que existe mejor adaptación de los microorganismos en medio PCS. También se puede apreciar que la producción de biomasa es de 2 a 3 veces mayor en el medio PCS que en el medio PDA. Sin embargo al relacionar densidad de biomasa con la velocidad de crecimiento radial no existe ninguna correlación, caso específico el de la cepa de *R. nigricans*, así mismo las 3 cepas restantes mostraron una velocidad de crecimiento más lenta pero su producción de biomasa fue mayor.

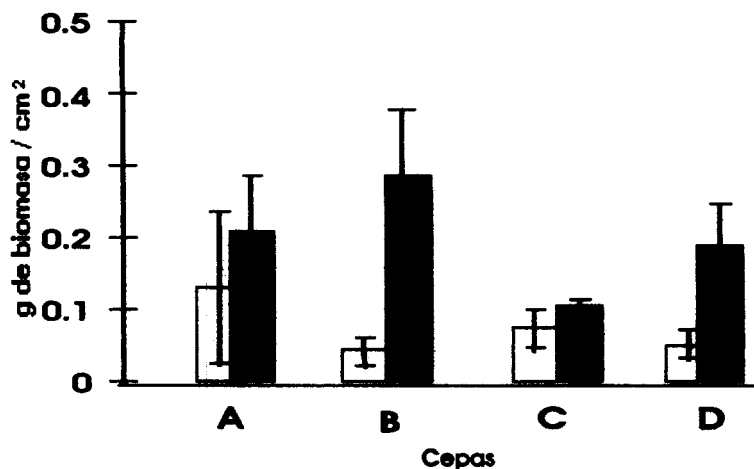


Figura 5.6. Cuantificación de biomasa en dos medios de cultivo (□) PDA y (■) PCS después de 120 h de cultivo en donde: A) *R. nigricans*, B) *P. roquefortii*, C) *A. oryzae* 2094, D) *A. oryzae* 2095.

El análisis de producción de biomasa es importante ya que muestra en primer lugar la adaptación de microorganismos a diferentes tipos de sustratos y en segundo la capacidad de reproducción de los mismos.

En procesos de FS se requiere que el microorganismo a utilizar tenga una alta producción de biomasa, con ello se garantiza que al mezclar el sustrato con el inóculo únicamente se encuentre presente el microorganismo de estudio.

5.1.5. Isoterma de adsorción de agua

La capacidad de adsorción de agua de un sustrato es indicativo de la capacidad de retener agua suficiente para que un microorganismo pueda realizar su funciones metabólicas en sistemas de baja actividad de agua. Esto es importante, puesto que el crecimiento, esporulación, producción de enzimas y metabolitos están directamente influenciados por la a_w (Gervais, et al. 1988).

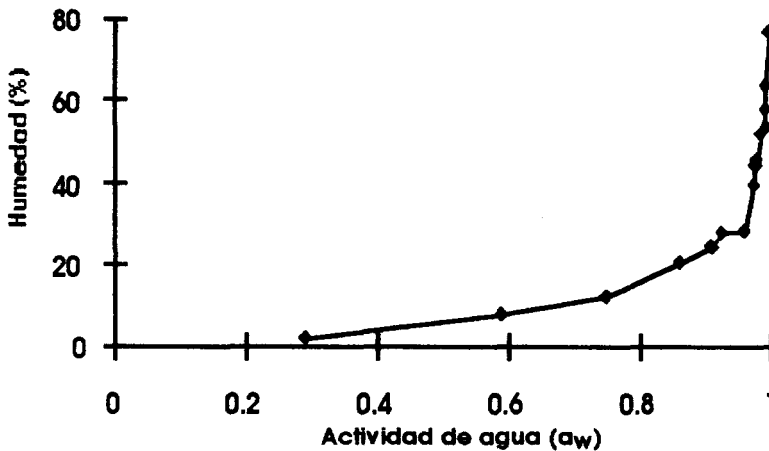


Figura 5.7. Isoterma de adsorción de agua.

En la Figura 5.7 se presenta la relación de humedad - actividad de agua en el sustrato pasta de copra, encontrando que el punto de saturación se presenta a 78% de humedad, registrando una actividad de agua de 0.995.

Con la isoterma se determinó la susceptibilidad del sustrato para ser utilizado en la fermentación sólida y con los resultados obtenidos se presume que la pasta de copra es un sustrato potencialmente atractivo para el desarrollo de hongos filamentosos; en base a este resultado se eligió la humedad de 60 % y a_w 0.991 para los procesos de fermentación sólida.

5.1.6. Conclusiones y discusión

- Las cepas probadas mostraron una mejor adaptación en el medio PCS que en PDA. esto puede deberse a que este tipo de sustratos tenga mejores nutrientes de los cuales el microorganismo adquieren la fuente de energía para realizar sus funciones metabólicas, Trinci, 1969.

- Al relacionar la velocidad de crecimiento radial y axial se observó que las cepas que tienen mayor velocidad de crecimiento en caja petri son las mismas que invaden el sustrato pasta de copra.

- Las cepas que mostraron mejor adaptación en el sustrato fueron las de *R. nigricans* y *P. roquefortii*, resultados que coincide con los reportes de Pineda y Pérez en 1996 y Flores y García, en 1995.

- La densidad de crecimiento de las cepas probadas no esta directamente relacionada con la velocidad de invasión micellar en el sustrato pasta de copra. Los resultados obtenidos concuerdan con la teoría de Trinci, 1969 ya que el cultivo con PCS se observó mejor densidad de biomasa que en el medio PDA y en el caso de la cepa de *P. roquefortii* se observó un incremento de biomasa 3 veces mayor en PCS que en PDA. Según Trinci en menciona que existe una variación de la densidad de la colonia dependiendo del hábitat en donde se encuentre el hongo filamentoso, existiendo mayor extensión y diámetro de la colonia en sustratos con mejores nutrientes.

- La isoterma de adsorción de agua de la pasta de copra determina la región de experimentación (% humedad - a_w), adecuada para este sustrato, encontrando que para valores cercanos a 60 % la a_w es relativamente alta (0.991).

5.2. FERMENTACION SOLIDA

En esta sección se presentan 2 grupos de resultados realizados en procesos de FS. En el primer grupo de resultados se presenta el análisis de pH y pérdida de materia seca evaluados al realizar un análisis con diferentes porcentajes de humedad - a_w , y elegir la mejor relación humedad - a_w para el proceso de FS; para ello se utilizó como sistema modelo pasta de copra inoculada con una cepa de *A. oryzae* 2094 en un cultivo de 64 h a 30°C, Sección 5.2.1.

El segundo grupo de análisis se realizó con el fin de observar el comportamiento del cultivo en FS con 6 cepas diferentes, evaluando en la pérdida de materia seca (PMS), pH, a_w y análisis de gases de 4 cepas de hongos filamentosos y 2 cepas de levaduras con certificación GRAS (Generally recognized as safe).

5.2.1. Resultados de la FS a diferentes porcentajes de humedad

Los resultados que se presentan a continuación se obtuvieron al evaluar el proceso de FS a diferentes porcentajes de humedad inicial (43, 49, 55, 60 y 66 %). En la Tabla 5.1 se indican los parámetros evaluados, así como los valores iniciales y finales obtenidos del proceso. Así mismo se puede observar que al variar las humedades al inicio del proceso la actividad metabólica cambia, esto se ve reflejado en los análisis de PMS; además se encontró que en el intervalo de 43 a 66 % se observa la mejor actividad microbiana y por consiguiente mayor afinidad para degradar el sustrato observando que la mayor pérdida de materia seca se obtiene a 55 % de humedad inicial.

En los valores de humedad de la Tabla 5.1 se observa un aumento de humedades al final del proceso; con humedades de 60 y 66 % inicial no se favorecen las condiciones de cultivo y como consecuencia disminuye la actividad microbiana, también se aprecia que en todos los casos los valores de pH incrementan en aproximadamente 2 unidades por la actividad microbiana del hongo.

Tabla 5.1. Valores iniciales y finales de los parámetros evaluados a diferentes porcentajes de humedad en un proceso de FS con la cepa de *A. oryzae* 2094.

% Humedad		a_w		pH		% Pérdida de materia seca
Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	
43	52	0.954	0.962	5.56	7.59	15
49	63	0.982	0.981	5.56	7.02	26
55	70	0.989	0.983	5.71	7.78	32
60	68	0.987	0.983	5.69	7.69	18
66	70	0.994	0.982	5.54	7.78	10

El análisis de pérdida de materia seca es asociado a la oxidación de la materia orgánica en bióxido de carbono que se pierde en la fase gaseosa. En este estudio la humedad a 55 % inicial resultó ser la mejor opción para el proceso de FS, ya que se observó una pérdida de materia orgánica de 32 %, seguido del análisis con una humedad inicial de 49% obteniendo una pérdida del 26%. Con estos resultados podemos decir que la PMS es consecuencia de la actividad metabólica del microorganismo mismo que se manifestó bajo condiciones controladas de cultivo que se mostró en la Sección 4.4 inciso a.

5.2.2. Resultados de la FS con cepas de hongos filamentosos y levaduras

Con los resultados obtenidos de la Sección 5.2.1 se realizaron 6 FS, 4 de ellas con hongos filamentosos y 2 con las levaduras *K. marxianus* y *S. castellii*. El cultivo partió de una humedad inicial de 55%, temperatura de 30° C y condiciones de cultivo reportadas en el inciso b de la Sección 4.4. El estudio fue monitoreado realizando análisis de gases, pH, pérdida de materia seca y actividad de agua. El tiempo de cultivo fue diferente para cada cepa encontrándose en un rango de 40 a 70 h, dependiendo la actividad metabólica de cada microorganismo, observado con el análisis de respirometría.

5.2.2.1. Análisis de gases

Para la evaluación de la formación de CO_2 y consumo de O_2 , se consideró que la concentración de estos compuestos en el aire es de 0.03% y 20.9% respectivamente.

En la Figura 6.1 se muestra un ejemplo típico de respirometría de la cepa de *A. oryzae* 2095 durante la FS. En el gráfico (A), se muestra la evolución de CO_2 en porcentaje a la salida de la columna de fermentación, mismo que fue registrado a la entrada del respirómetro (metabolímetro). El gráfico (C) muestra la producción total de CO_2 producido durante el cultivo expresado en mg de CO_2 /g de materia seca inicial, este calculo se obtiene tomando en cuenta el flujo de aire de entrada al respirómetro, representado en la Figura (D), de esta forma tenemos la producción total de CO_2 , que se puede comprobar con los resultados de pérdida de materia seca. El gráfico (B) muestra la tasa instantánea de producción de CO_2 , reportada en mg de CO_2 / h g materia seca inicial que se obtiene empleando los datos del flujo de aire de entrada durante el proceso de FS.

5.2.2.2. Producción instantánea de CO_2 con las cepas de estudio

La Figura 5.8 ilustra la tasa de producción instantánea de CO_2 , en donde se observa que la fase exponencial es diferente en cada tipo de microorganismo y nos da idea del estado fisiológico (fase de retardo, exponencial y estacionaria) del microorganismo de estudio en tiempo real sin interrumpir el cultivo ni toma de muestras destructivas, Saucedo- Castañeda, 1991.

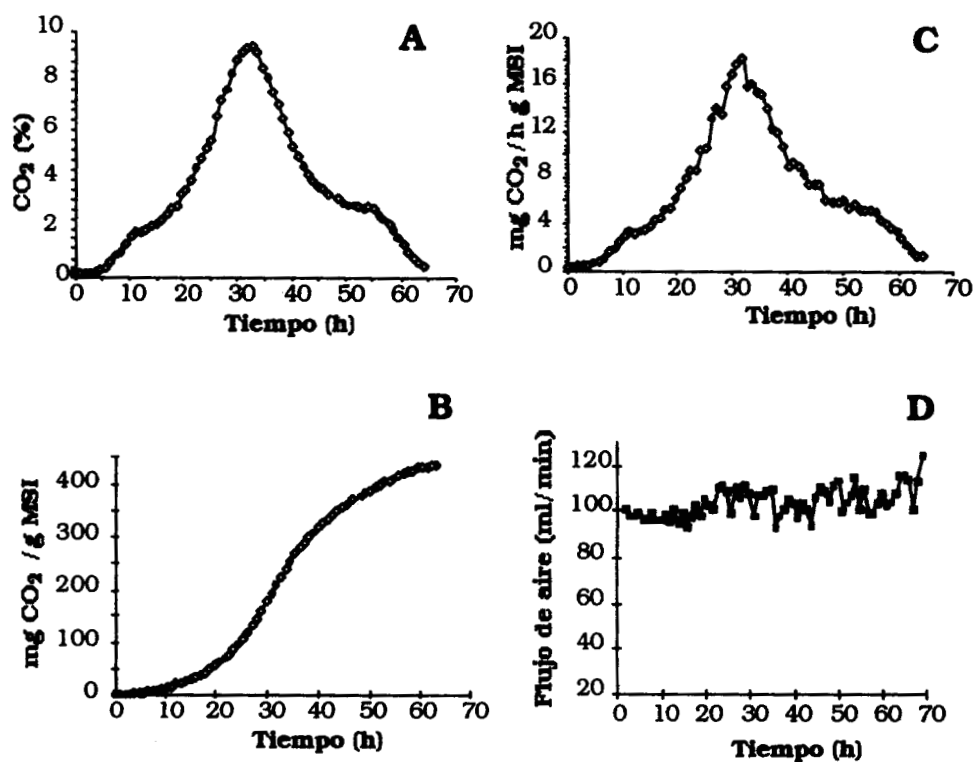


Figura 5.8. Gráficos representativos del análisis de gases en FS.

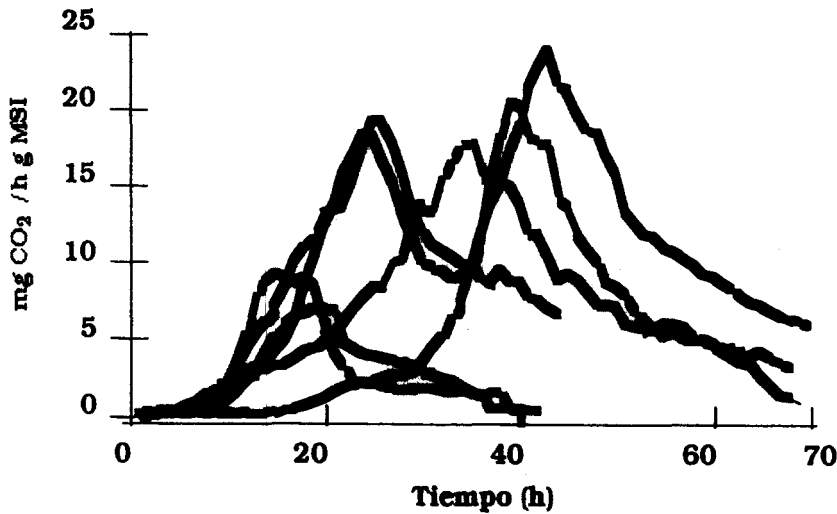


Figura 5.9. Producción instantánea de CO₂ con diferentes microorganismos. En

En donde: ■ *A. oryzae* 2094, ■ *A. oryzae* 2095, ■ *R. nigricans*,
■ *P. roquefortii*, ■ *S. castelli*, ■ *K. marxianus*.

En el gráfico de la Figura 5.9 se aprecia que la cepa de *P. roquefortii* alcanza la mayor producción (25 mg de CO₂/ h g MSI), en un tiempo de cultivo de 43 h, seguido por las cepas de *A. oryzae* 2094 (18 mg CO₂ a 24 h y 21 mg CO₂ a 38 h), *A. oryzae* 2095 (18 mg CO₂ a 38 h) y *R. nigricans* (20 mg CO₂ a 24h).

También se puede apreciar que el cultivo con la cepa de *A. oryzae* 2094 presentó dos picos de producción de CO₂, este comportamiento del cultivo fue similar al reportado por Pineda y Pérez en 1996, en donde obtienen el primer pico de producción las 24 h con 7 mg de CO₂ y el segundo pico a las 30 h con 11.5 mg de CO₂. Sin embargo se desconoce porque se presenta este tipo de comportamiento.

En primera instancia podría parecer presencia de algún agente extraño al cultivo, pero los reportes indican que posiblemente exista la presencia de algún tipo de mecanismo que actúe a destiempo durante el cultivo y con ello se inicie nuevamente la producción de CO₂.

Hay que destacar que estos resultados coinciden con la pérdida de materia seca evaluada al final del cultivo, (Tabla 5.2) por lo que hay que considerar que el análisis de gases es un buen método para relacionar la producción de CO_2 y pérdida de materia seca. En todos los casos se observa que la fase de retardo es de aproximadamente 8 h y que pueden ser atribuidos al tiempo de germinación de esporas en las condiciones de estudio.

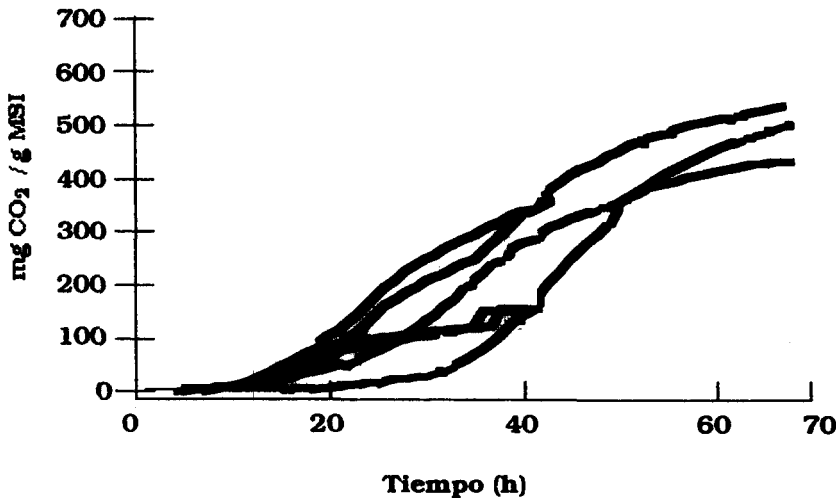


Figura 5.10. Producción total de CO_2 de las cepas probadas en el proceso de FS.

En donde: ■ *A. oryzae* 2094, ■ *A. oryzae* 2095, ■ *R. nigricans*,
 □ *P. roquefortii*, ■ *S. castellii*, ■ *K. marxianus*.

En la Figura 5.10 se observa que la cepa de *P. roquefortii*, *A. oryzae* 2094 y 2095, son las que tienen la mayor producción total de CO_2 , produciendo 500, 550, 450 mg CO_2 /g MSI respectivamente. Los resultados obtenidos de las cepas de *S. castellii* y *K. marxianus* son comparables con los estudios realizados por Pineda y Pérez en 1996, en donde obtienen un total 140 y 160 mg CO_2 /g MSI, en este estudio se obtuvieron 150 y 140 mg CO_2 respectivamente.

En la Tabla 5.2 se puede comparar los resultados de las fermentaciones con distintas cepas, en donde se aprecia que la mayor pérdida de materia seca se presenta en los hongos filamentosos, así como la tasa máximas de producción de CO₂, esto sugiere que estos microorganismos tienen mecanismos específicos que permiten la invasión al sustrato, caso contrario al de las cepas de levaduras que presenta una invasión más lenta, y esto puede deberse a que los hongos filamentosos tienen hifas que le permiten invadir con mayor rapidez el sustrato, dato que se confirma con los resultados obtenidos en la sección anterior de los análisis de velocidad de crecimiento radial.

En el caso del análisis de pH se observó que en todos los casos aumentó en dos unidades, la actividad de agua presentó una variación entre el inicio y final del cultivo de ± 0.2 en todos los casos.

Tabla 5.2 Comparación de parámetros finales de las FS con distinta cepa

Microorganismo	Máxima tasa de CO ₂ (mg CO ₂ /h g MSI)	Producción Total de CO ₂ (mg CO ₂ /g MSI)	Porcentaje pérdida de materia seca	pH	a _w
<i>P. roquefortii</i>	25	500	28.0	7.7	0.995
<i>A. oryzae</i> 2094	21	550	29.3	7.2	0.987
<i>A. oryzae</i> 2095	18	420	27.5	7.5	0.979
<i>R. nigricans</i>	20	350	40.1	6.9	0.988
<i>K. marxianus</i>	7	140	4.9	6.7	0.991
<i>S. castellii</i>	10	150	11.2	7.2	0.991

5.2.3. Conclusiones y discusión

- Humedades iniciales mayores a 60 % no favorecen las condiciones de cultivo, ya que posiblemente el sistema se limita en O_2 por problemas de transferencia de masa.

- En el primer grupo de resultados las humedades iniciales de 49 y 55 % fueron las que presentaron mejor actividad metabólica, resultado que se relaciona con la PMS 26 y 32 % respectivamente, de esta forma fue posible establecer las condiciones idóneas de cultivo en FS para hongos filamentosos y levaduras. Con estos resultados se decidió utilizar una humedad inicial de 55 % con una a_w de 0.989.

- Con respecto al segundo grupo de análisis fue posible obtener el material disponible de la fermentación con cada cepa para los análisis de actividad probiótica que se presenta en la Sección 5.3.

- El análisis de gases fue indicativo de la actividad microbiana de cada una de las cepas, así como del tiempo en que se presentan las diferentes fases de crecimiento y tiempo de fermentación.

- Las cepas que presentaron mayor actividad microbiana en la FS de la pasta de copra fueron en general las cepas de hongos filamentosos no así las cepas de levaduras.

- La mayor pérdida de materia seca se presentó con la cepa de *R. nigricans* con un 40.1%, la cepa de *A. oryzae* 2094, *P. roquefortii* y *A. oryzae* 2095 presentaron una pérdida de 29.3, 28 y 27.5 % respectivamente.

5.3. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROBIÓTICA DE PRODUCTOS OBTENIDOS DE FS CON PRODUCTOS COMERCIALES

En esta sección se presentan los resultados obtenidos al evaluar 6 productos obtenidos por FS descritos en secciones anteriores, mismos que fueron evaluados con 3 probióticos comerciales Lacto-sacc, Yea-sacc 8417 y Yea-sacc 1026. El estudio se realizó mediante el empleo de cultivos anaerobios, utilizando la bacteria de origen ruminal *M. elsdenii*. Los testigos de fueron agua destilada y filtrada, así como pasta de copra sin fermentar. Se realizaron además análisis de pH, Ácidos grasos volátiles (propiónico, acético y butírico), consumo de ácido láctico y producción de biomasa por duplicado; el tiempo de cultivo fue de 33 h a 37°C. En cada caso se adicionó en una relación (v/v) el 2% del control, probiótico comercial ó producto de FS.

5.3.1. Evolución del pH

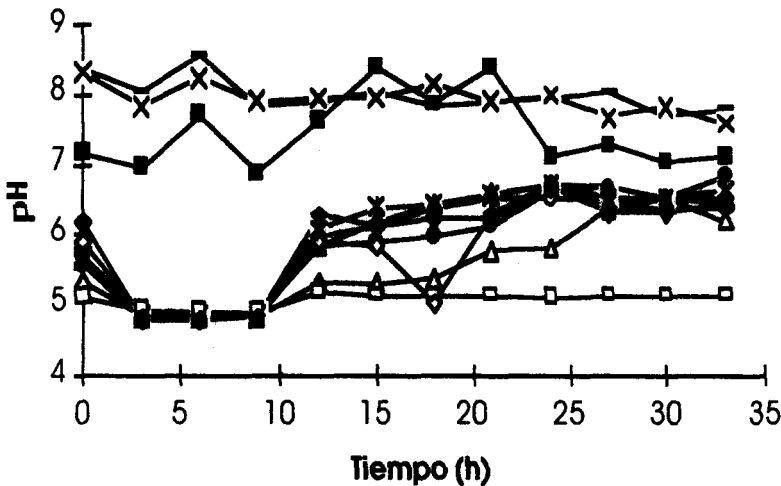


Figura 5.11. Evolución del pH durante el cultivo de *M. elsdenii* con diferentes probióticos, productos de FS o testigos. En donde: (Δ) *P. roquefortii*, ($\blacklozenge$) *R. nigricans*, ($\times$) *A. oryzae* 2094, ($\times$) *A. oryzae* 2095, ($\circ$) Lacto-sacc, ($\square$) *K marxianus*, ($\bullet$) *S. castelli* ($\blacksquare$) Agua, ($\diamond$) Yea-sacc 1026 ($\triangle$) Yea-sacc 8417, ($-$) Pasta de copra sin fermentar.

En la Figura 5.11 se puede apreciar que tanto los productos de FS, probióticos comerciales y testigos tienen una tendencia a estabilizarse en un rango de pH entre 6.5 - 8, a excepción del producto fermentado con la cepa de *K. marxianus*, que permanece a un pH ácido. En este estudio se observó que pH's iniciales menores a 5 no hay actividad biológica, ya que el intervalo óptimo de crecimiento para esta bacteria es de 6.5 - 7. Por ello es conveniente que los valores de pH al inicio de la fermentación se encuentre en el rango antes mencionado ya que está directamente relacionado con la producción de biomasa. En algunas investigaciones se ha demostrado que la incorporación de cultivos de hongos han contrarrestado en algunos casos la caída del pH después de la ingesta (Fuller, R. 1989). En este estudio se esperaba que al adicionar el 2% de un aditivo el pH permaneciera constante o tendiera a estabilizarse a pH 6 ó 7, sin embargo se puede apreciar que existen variaciones importantes con la adición de diferentes aditivos, ya sea probióticos, productos de FS o testigos.

5.3.2. Producción de biomasa

En la Figura 5.12 se presentan la evolución de la producción de biomasa al adicionar al cultivo 2% de probióticos comerciales ó testigos (agua y pasta de copra sin fermentar). En este estudio se observó que al adicionar probióticos comerciales la biomasa incrementa a valores de 0.55 g/L y permanece estable después de 15 horas de cultivo. Por otro lado cuando al cultivo se le adiciona solo agua la biomasa llega a un máximo de 0.5 g/L entre las 10 y 15 horas de cultivo y posteriormente disminuye su producción. Un dato importante en este análisis es que la pasta de copra sin fermentar no presenta efecto sobre el crecimiento de *M. elsdenii* ya que el máximo valor se presenta a las 30 h con 0.23 g/L. Por otro lado si este resultado se compara con la cinética que se presenta en la Figura 5.13 se aprecia que la pasta de copra al ser fermentada con diferente cepa, existe un incremento notable con valores de biomasa que van de 0.4 a 0.6 g/L. Esto es importante ya que indica que la pasta de copra sin fermentar no favorece en gran medida el crecimiento de *M. elsdenii*; pero si la pasta de copra, es sometida a un proceso fermentativo es posible obtener algunos compuestos que favorecen en gran medida el crecimiento y la estabilización de la biomasa de *M. elsdenii* en el cultivo.

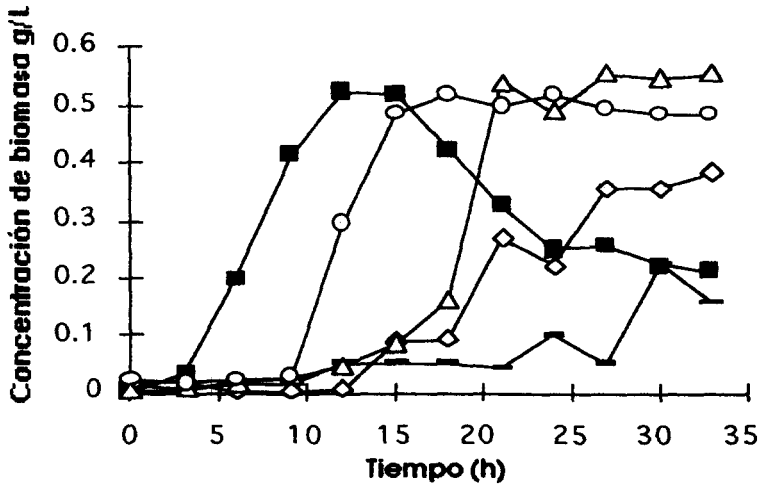


Figura 5.12. Producción de biomasa con probióticos comerciales y testigos. En donde: (—) Pasta de copra sin fermentar, (○) Lacto-sacc, (■) Agua, (◇) Yea-sacc 1026, (△) Yea-sacc 8417.

En la Figura 5.13 se muestran la evolución de biomasa al adicionar al cultivo de *M. elsdenii* productos de FS; donde se aprecia que el perfil de producción de biomasa es muy similar cuando se adicionan probióticos comerciales (Figura 5.12). Esto significa que durante la fermentación de la pasta de copra con diferentes microorganismos se sintetizaron posiblemente algunos biomoléculas o compuestos que son potencialmente activos y que son utilizados por la bacteria ruminal *M. elsdenii* para su crecimiento; con lo cual estabiliza su biomasa microbiana durante la mayor parte del cultivo.

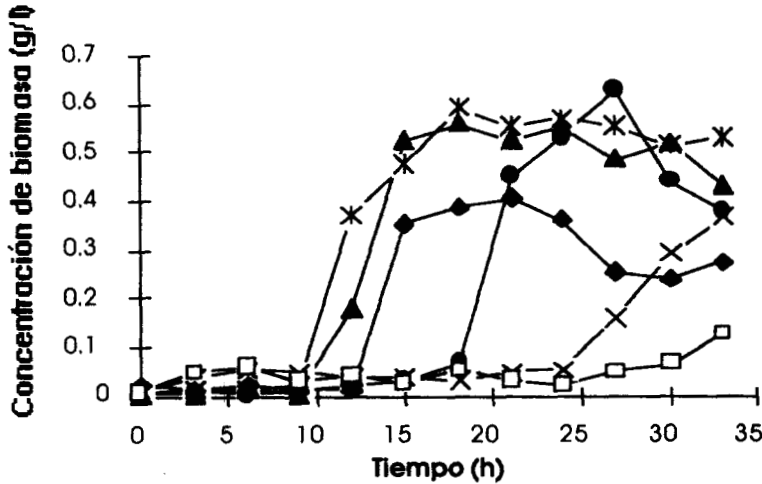


Figura 5.13. Producción de biomasa con productos de FS. En donde:

(●) *S. castelli*, (✱) *A. oryzae* 2095, (▲) *P. roquefortii*, (✕) *A. oryzae* 2094, (□) *K. marxianus*, (◆) *R. nigricans*.

Si se compara en términos de biomasa máxima alcanzada y estabilidad del cultivo se encontró que hay 2 de los productos de FS (*P. roquefortii* y *A. oryzae* 2095) que son comparables con el efecto obtenido con el probiótico comercial Lacto-sacc).

Por otro lado, el efecto del uso producto de la FS, *S. castelli* fue comparable con el probiótico comercial Yea - sacc 8417. Esto nos permite suponer que los productos de FS pueden ser potencialmente atractivos para ser utilizados como aditivos en la alimentación animal, ya que de igual forma como los productos comerciales aportan un efecto benéfico en el cultivo, ver Figura 5.14.

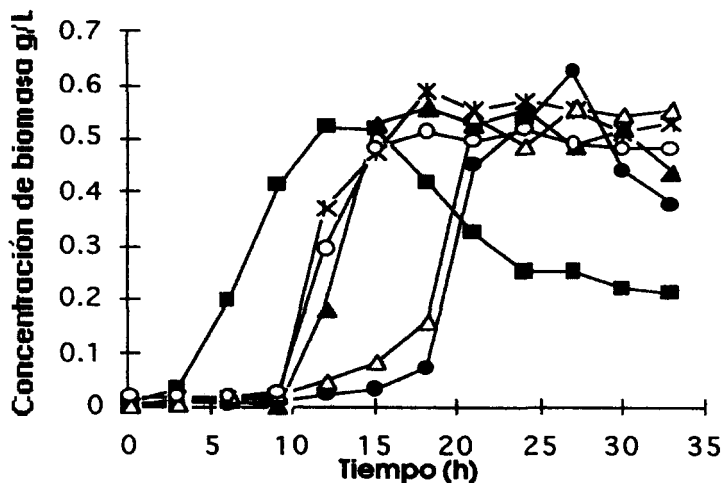


Figura 5.14. Comparación de la producción de biomasa de 3 productos de FS con 2 probióticos comerciales. En donde: (o) Lacto-sacc, (Δ) Yea-sacc 8417, (■) Agua, (▲) *P. roquefortii*, (X) *A. oryzae* 2095, (●) *S. castelli*.

En diversos estudios se ha mencionado que extractos fermentados de *A. oryzae* (Amaferm), extractos de *S. cerevisiae* han tenido efecto sobre el número de bacterias ruminales (estudios *in vivo*), existiendo efecto sobre microorganismos aislados del rumen (*S. ruminantium* y *M. elsdenii*), Nisbet y Martin, 1990 y 1991, Wiedmeier y Arambel, 1987 y Chiquette, 1995.

En la mayoría de los casos el control utilizado es agua, y al realizar la cinética de crecimiento microbiano se observan diferencias significativas en cuanto a su producción, Ejemplo de ello en los estudios de Campos, et al. 1995 en donde prueba probióticos a base de extractos de *A. oryzae*, *A. niger* y *S. cerevisiae* observando diferencias significativas ($p < 0.05$) de efecto probiótico en producción de biomasa, proteína y ácido acético, al incorporar estos aditivos.

A diferencia de otros estudios en este se probó el efecto probiótico de la pasta de copra fermentada con diferentes microorganismos, teniendo como teoría que al fermentarse el sustrato pasta de copra se liberan metabolitos que tienen un efecto sobre el microorganismo que lo consume. Por lo tanto en este estudio se observó que los productos de FS (adicionando únicamente la fracción soluble), estimulan el crecimiento de *M. elsdenii*.

5.3.3. Consumo de ácido láctico

Las Figuras 5.15, 5.16 y 5.17 muestran el perfil de consumo del ácido láctico durante el cultivo con *M. elsdenii*, en donde se observa que el comportamiento es muy similar no existiendo diferencias aparentes en el promedio global de los análisis. Si se observa a detalle cada una de las figuras se puede apreciar la velocidad de consumo en cada caso. Por ejemplo en la Figura 5.16 se presenta el consumo de ácido láctico de los productos de FS en donde se observa un comportamiento similar de asimilación de ácido L-Láctico hacia las 18 h de cultivo con excepción del extracto fermentado de *K. marxianus*, el cual no alcanza a consumirse totalmente después de 33 h de cultivo, dejando un remanente de aproximadamente 2 g de ácido L-Láctico.

En la Figura 5.15 se presenta el consumo de ácido láctico al adicionar al cultivo probióticos comerciales ó testigos, y se observa que con el uso de probióticos comerciales el consumo total se presenta hacia las 22 h de cultivo, por otro lado la adición de pasta de copra sin fermentar no se consume totalmente al término del cultivo.

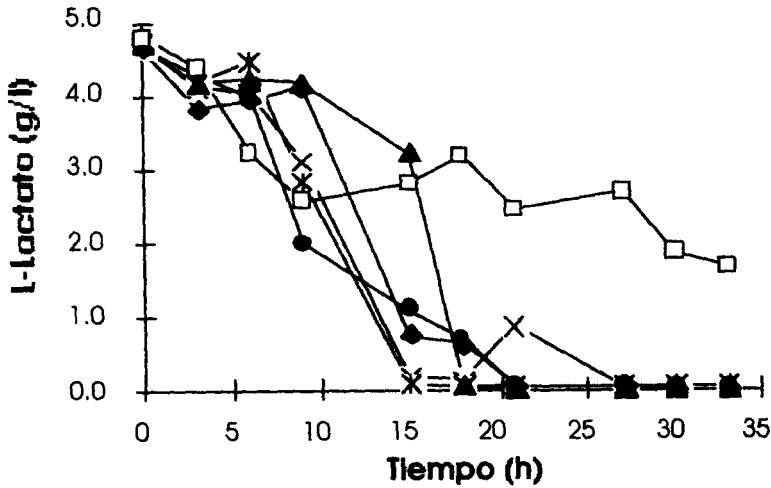


Figura 5.15. Consumo de ácido láctico al adicionar al cultivo de *M. elsdenii* probióticos comerciales o testigos. En donde: (—) Pasta de copra, (o) Lactosacc, (◇) Yea-sacc 1026 (■) Agua, (Δ) Yea-sacc 8417.

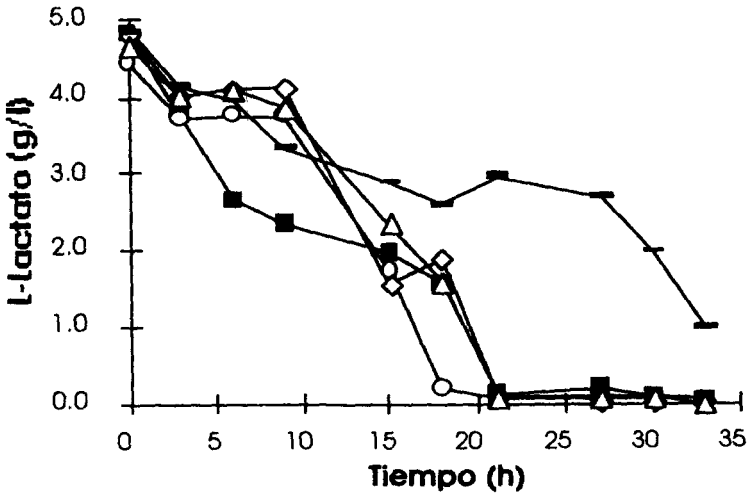


Figura 5.16. Consumo de ácido láctico al adicionar al cultivo de *M. elsdenii* productos de FS. En donde: (●) *S. castelli*, (×) *A. oryzae* 2095, (▲) *P. roquefortii*, (×) *A. oryzae* 2094, (□) *K. marxianus*, (◆) *R. nigricans*.

En la Figura 5.17 se agruparon únicamente aquellos probióticos comerciales con mejor actividad probiótica, con los mejores productos de FS similares en crecimiento microbiano, logrando observar que no hay diferencias apreciables al utilizar el sustrato ácido láctico ya que todos los cultivos lo consumen en un intervalo de 15 a 24 h.

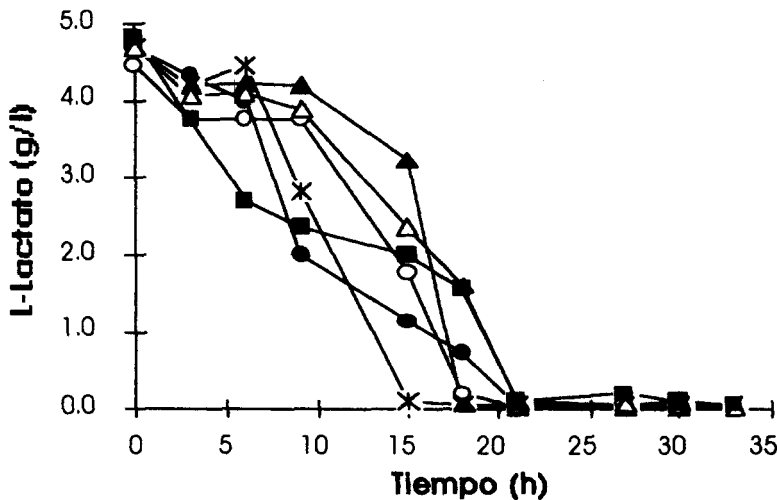


Figura 5.17. Comparación del consumo de ácido láctico al adicionar 3 productos de FS y 2 probióticos comerciales. En donde: (○) Lactosacc, (△) Yea-sacc 8417, (▲) *P. roquefortii*, (✱) *A. oryzae* 2095, (■) Agua, (●) *S. castelli*.

El objetivo de este análisis era conocer la capacidad de consumo de la fuente de carbono (ácido láctico), con la presencia de diferentes aditivos; observando que no existe diferencia aparente entre ellos. Sin embargo al realizar los análisis de formación de producto de fermentación (ácidos grasos volátiles), se observaron diferencias en todos los casos, resultados que se presentan en la Tabla 5.3.

5.3.4. Producción de ácidos grasos volátiles

El análisis de ácidos grasos volátiles es importante ya que a partir de ellos el rumiante obtiene la mayoría de la energía requerida para su metabolismo. la producción de acético puede constituir las reservas de lípidos a través de la lipogénesis, produciendo algunos triglicéridos componentes de la leche, mientras que el butirato se canalizaría para la producción de tejido adiposo con lípidos de mayor peso molecular. La fermentación propiónica es considerada glucogénica y por tanto es posible utilizarlo como fuente de energía en la biosíntesis de macromoléculas como las proteínas.

En este estudio se puede observar que en promedio existe mayor formación de ácidos grasos volátiles en productos de FS que en probióticos comerciales, destacando que en orden de producción se encuentra el acético seguido del propiónico y butírico.

En la Tabla 5.3 se presenta el por ciento de producción de AGV's (propiónico, acético y butírico), de cada uno de los cultivos al adicionar al cultivo de *M. elsdenii* 2% de probióticos comerciales, productos de FS o testigos.

En cuanto a la formación de ácidos grasos, se observó en todos los casos que hay mayor formación de ácido acético, seguido por ácido propiónico y en menor cantidad ácido butírico. Estos resultados son comparables con los realizados por Campos, et al. 1995, en donde obtienen diferencias significativas ($p < 0.05$) con la adición de probióticos a base de microorganismos (hongos ó levaduras), obteniendo en todos los casos mayor producción de ácido acético.

Lo importante de esta tabla es la comparación de formación de producto al adicionar diferente tipo de aditivo; por ejemplo si se compara la producción de ácido acético se observa que la mayor producción se alcanza con la adición de cultivos provenientes de FS, alcanzando en promedio un 60% de producción de ácido acético.

Tabla 5.3. Porcentaje de ácidos grasos producidos al final del cultivo de 33 h adicionando 2% de probióticos comerciales, productos de FS o testigos.

Adición de 2 % de producto de FS, probiótico comercial ó testigo	% Acético	% Propiónico	% Butírico
<i>A. oryzae</i> 2094	34.64	28.45	36.91
<i>A. oryzae</i> 2095	63.55	33.10	3.35
<i>R. nigricans</i>	66.23	31.64	2.12
<i>P. roquefortii</i>	56.01	41.87	2.12
<i>S. castellii</i>	58.11	43.43	2.2
<i>K. marxianus</i>	58.81	38.41	2.78
Agua	47	51.52	1.48
Lacto-sacc	37.78	31.84	30.38
Yea-sacc 1026	60.9	35.6	3.5
Yea-sacc 8417	38.79	46.47	14.73
Pasta de copra S/FS	58.56	39.91	1.53

Por otro lado se aprecia que aún al adicionar pasta de copra sin fermentar se alcanza el mismo porcentaje de producción (60%), y en menor porcentaje (40 %) se presenta cuando se adicionan probióticos comerciales.

Respecto a la producción de ácido propiónico existe un rango de producción entre 30 y 45 % en todos los casos; en cuanto a la producción de ácido butírico existen diferencias notables al adicionar al cultivo el probiótico Lacto-sacc ó Yea-sacc 8417 o *A. oryzae* 2094, ya que son los que producen mayor cantidad de este ácido. Los otros aditivos presentaron una producción de ácido propiónico menor, encontrándose 2.5 % en promedio.

Obtenido estos resultados se comparó la producción de los tres ácidos grasos volátiles, con los mejores productos de FS y probióticos comerciales para ello la comparación se hizo en base a que existieron 3 productos de FS y 2 probióticos comerciales con similar producción de biomasa, parámetro importante para evaluar el efecto probiótico.

Así tenemos la siguientes apreciaciones: Se observó que al adicionar al cultivo el probiótico comercial Lacto-sacc ó productos de FS *A. oryzae* 2095 ó *P. roquefortii* existen diferencias de producción de ácido acético, favoreciendo en mayor porcentaje (60 %) por la adición de productos de FS; no hay diferencias en la producción de ácido propiónico en ambos casos y existen diferencias de producción de ácido butírico favorecido por la adición del probiótico Lacto-sacc.

Por otro lado al comparar el probiótico comercial Yea-sacc 8417 con *S. castelli* se observa que existe mayor producción de ácido acético al adicionar al cultivo *S. castelli*, en cuanto a la producción de propiónico no hay diferencia aparente y al producir ácido butírico se favorece con Yea-sacc 8417.

La importancia de producción de ácidos grasos se basa principalmente en la utilización de estos ácidos como fuente de energía para que el rumiante realice sus funciones metabólicas, en segunda instancia son importantes ya que a partir de ellos se puede canalizar mejoras en la producción de carne o leche en los animales que lo consuman. El estudio realizado a pesar de ser *in vitro* puede dar idea de lo que podría suceder en un sistema más complejo ya sea *in vivo* o *in situ*.

NOTA: Los datos de las cinéticas de producción de AGV's de cada producto de FS, probióticos comerciales y testigos se presentan en el anexo 1

5.3.5. Balance de materia

Los balances de materia y energía son ampliamente utilizados en procesos bioquímicos, en biotecnología son poco usados por la complejidad que representan dichos procesos, ya que a veces resulta difícil medir la mayoría de las variables involucradas en el proceso como son: el consumo de fuente de carbono, nitrógeno y oxígeno, así como la producción de biomasa, CO₂ y producto(s) formados(s).

En este sentido en este estudio se realizó únicamente el balance de carbono de sustrato y productos, considerando que la composición elemental de la biomasa se seleccionó en base a la formula elemental CH_{1.81}O_{0.51}N_{0.21}, reportada por Roels en 1980, obtenida de un promedio de la composición de biomasa de los siguientes microorganismos.

Resultados y Discusión

<i>Candida utilis</i>	CH _{1.87} O _{0.56} N _{0.20}
<i>Klebsiella aerogenes</i>	CH _{1.75} O _{0.43} N _{0.22}
<i>Sccharomyces cerevisiae</i>	CH _{1.81} O _{0.51} N _{0.17}
<i>Paracoccus denitrificans</i>	CH _{1.81} O _{0.51} N _{0.20}
<i>Escherichia coli</i>	CH _{1.77} O _{0.49} N _{0.24}
<i>Aerobacter aerogenes</i>	CH _{1.83} O _{0.55} N _{0.25}

En la Tabla 5.4. se muestran los coeficientes estequiométricos calculados en base a la fracción de carbono de cada molécula, el mayor rendimiento corresponde a la producción de ácido acético y seguido de ácido propiónico y CO₂. En general se puede apreciar que el porciento de rendimiento en promedio es de 40% en la mayoría de los casos; exceptuando el rendimiento al adicionar *K. marxianus* (20%) y pasta de copra s/FS, en donde no se observó efecto benéfico del cultivo con *M. elsdenii*.

Tabla 5.4. Coeficientes estequiométricos en base a carbono al final del cultivo.

Tipo de aditivo	Biomasa	CO ₂	Acético	Propiónico	Butírico	% Recuperación
<i>A. oryzae</i> 2094	0.17	0.24	0.59	0.59	0.86	65
<i>A. oryzae</i> 2095	0.25	0.24	0.76	0.49	0.06	47
<i>R. nigricans</i>	0.13	0.24	0.61	0.36	0.03	36
<i>P. roquefortii</i>	0.18	0.24	0.60	0.54	0.03	41
<i>S. castelli</i>	0.18	0.24	0.61	0.49	0.02	40
<i>K. marxianus</i>	0.06	0.24	0.25	0.20	0.02	20
Agua	0.10	0.24	0.41	0.55	0.02	33
Lacto-sacc	0.23	0.24	0.42	0.43	0.46	47
Yea-sacc 8417	0.26	0.24	1.38	1.03	0.73	122
Yea-sacc 1026	0.18	0.24	0.40	0.28	0.03	30
Pasta de copra s/FS	0.26	0.24	0.33	0.27	0.01	28

Si se comparan los rendimientos de *P. roquefortii* y *A. oryzae* 2095 con el probiótico Lacto-sacc no hay diferencias entre ellos, pero si existe diferencia al comparar *S. castelli* con el probiótico comercial Yea-sacc 8417.

En general se observa que existe un mayor rendimiento al adicionar al cultivo de *M.* productos de FS que probióticos comerciales, lo cual garantiza que estos productos pueden ser atractivos para ser suministrados en la dieta de rumiantes.

NOTA: Los cálculos del balance de carbono se presentan en el anexo 2.

5.3.6. Conclusiones y discusión

- Los productos de FS *P. roquefortii*, *A. oryzae* 2095 son comparables con el efecto probiótico del probiótico comercial Lacto-sacc.

- El probiótico comercial Yea- sacc 8417 es comparable con el efecto probiótico del producto de FS *S. castellii*.

- En todos los casos estudiados existe un consumo total de ácido láctico hacia las 17 horas de cultivo, a excepción de la pasta de copra sin fermentar y el fermentado con *K. marxianus*.

- Con pH's iniciales menores a 5 no hay actividad biológica, ya que el intervalo óptimo de crecimiento para esta bacteria es de 6.5 - 7.

- En cuanto a los perfiles de las fermentaciones, predominó el ácido acético y propiónico productos deseables en la fermentación ruminal. ya que este ácido puede constituir las reservas de lípidos a través de la lipogénesis, produciendo algunos triglicéridos componentes de la leche, en el caso del ácido propiónico es considerado glucogénico y por tanto es posible utilizarlo como fuente de energía en la biosíntesis de macromoléculas como las proteínas.

- Al comparar los productos obtenidos de la FS con probióticos comerciales, fue posible establecer similitudes entre ambos; a su vez se eligió un producto de FS tomando como criterio los resultados de actividad probiótica de cada uno. En base a este criterio se tenían dos opciones: *A. oryzae* 2095 ó *P. roquefortii* ya que eran comparables con el probiótico comercial Lacto-sacc. Al comparar el rendimiento no existió una diferencia significativa, solo existían diferencias en la producción de ácidos grasos. Por lo tanto se eligió el producto en base a su comportamiento fermentativo (FS); en este sentido se encontró que ambos productos después de la fermentación sólida presentaron una pérdida de materia seca de 30%, sin embargo al realizar un análisis en microscopio óptico se observó que en el fermentado con *P. roquefortii* la invasión micellar se presentó tanto en la parte externa de la columna como en la matriz de la misma, algo que no ocurrió con ninguno de los otros fermentados, de tal manera que se pensó que posiblemente en este material se podrían encontrar algunos compuestos más simples que el microorganismo pudiera

Resultados y Discusión

utilizar como fuente de carbono en estudios posteriores. De esta forma se seleccionó el fermentado de *P. roquefortii* en estudios de identificación de compuestos con posible actividad probiótica. Hay que destacar que el fermentado con *A. oryzae* 2095 también se pudo haber estudiado, sin embargo este estudio pretendía seleccionar uno de ellos pero se abre la posibilidad de estudiar otros productos de FS en un futuro.

- El elegir productos de FS resultaría una alternativa de utilización en la nutrición animal, a la par se propone una nueva estrategia que permita vislumbrar que los microorganismos probióticos no son los únicos responsables de presentar efectos benéficos en el huésped.

- El estudio global de esta sección a pesar de ser *in vitro*, da idea de lo que puede pasar al ser administrado el producto de FS en la dieta de rumiantes, no omitiendo que pueden existir cambios metabólicos al involucrar más de un microorganismo en la fermentación ruminal.

5.4. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROBIÓTICA DE EXTRACTOS OBTENIDOS CON DIFERENTES DISOLVENTES

En esta Sección se presentan los resultados de la evaluación probiótica del producto de FS *P. roquefortii*, elegido en la Sección 5.3. Para realizar este estudio el producto elegido se liofilizó y se obtuvieron 150 g, de los cuales 120 g se utilizaron para realizar extracciones sucesivas con disolventes de distinta polaridad, partiendo de hexano, acetato de etilo, etanol y agua.

A cada extracto se le realizaron análisis de pH, producción de biomasa, consumo de ácido láctico y producción de AGV's, empleando un cultivo de *M. elsdenii*. Además de las fracciones probadas se tuvieron 2 testigos: un liofilizado sin proceso de extracción y un liofilizado tratado a 75° C durante 24 h. Este tratamiento se realizó debido a que en las extracciones con los diferentes disolventes la temperatura de extracción varió de 68 a 92° C, de tal manera que se tomó como temperatura promedio 75° C para corroborar si existía algún efecto de temperatura al ser adicionado al cultivo de *M. elsdenii*.

5.4.1. Extracción

Se realizaron extracciones con: hexano, acetato de etilo, etanol y agua, dejando a reflujo durante 24 h en el equipo soxther. Se recuperaron 0.32 g de la extracción con hexano, 0.71 g con acetato de etilo, 7.42 g de etanol y 97.75 g de extracto acuoso.

5.4.2. Producción de biomasa

En la Figura 5.18 se presentan los resultados obtenidos de la cuantificación de biomasa, en donde se puede apreciar que el extracto acuoso presenta un incremento de biomasa de 0.65 g/L hacia las 12 horas de cultivo, seguido de los controles liofilizado y liofilizado tratado a 75° C, este resultado muestra que los compuestos responsables de la estimulación de crecimiento se encuentra en el extracto acuoso. Por otro lado si se compara este gráfico con los reportados en la Sección 5.3 (gráficos de biomasa) se aprecia claramente que al adicionar el extracto acuoso al cultivo sigue el mismo patrón en producción de biomasa, de tal forma que con este resultado se demuestra que el extracto acuoso es potencialmente bioactivo. Además fue posible establecer que hasta una temperatura de 75° C no existe un efecto negativo sobre la producción de biomasa.

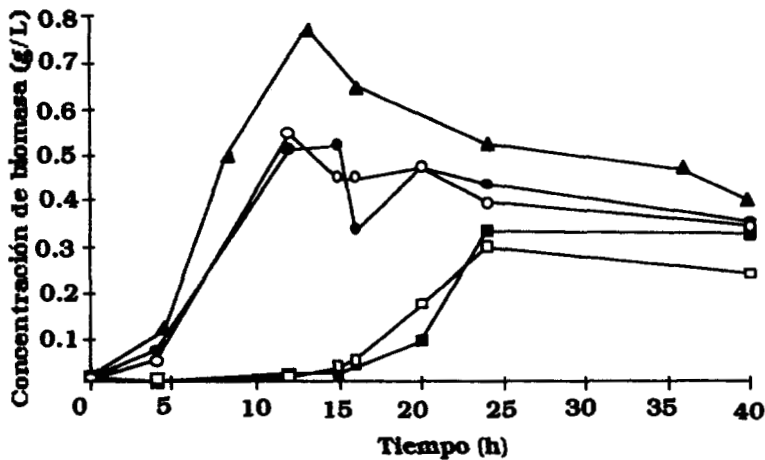


Figura 5.18. Concentración de biomasa de extractos obtenidos con disolventes de distinta polaridad, en donde: (▲) extracto acuoso, (□) extracto etanólico, (■) extracto de acetato de etilo, (○) liofilizado, (●) liofilizado tratado a 75° C.

5.4.3. Evolución del pH

En el gráfico 5.19 Se presenta la evolución del pH durante el tiempo de cultivo, en donde se aprecia que los pH's al final del proceso permanecen en un intervalo de 6 a 6.5 unidades de pH, destacando que el pH del extracto acuoso tiende a estar más estable entre el intervalo de pH deseable para el cultivo de *M. elsdentii*, y que esta relacionado directamente con la producción de biomasa. Hay que destacar que el control de pH fue cuidado desde el proceso de esterilización, sin embargo se presentaron variaciones importantes entre los diferentes cultivos.

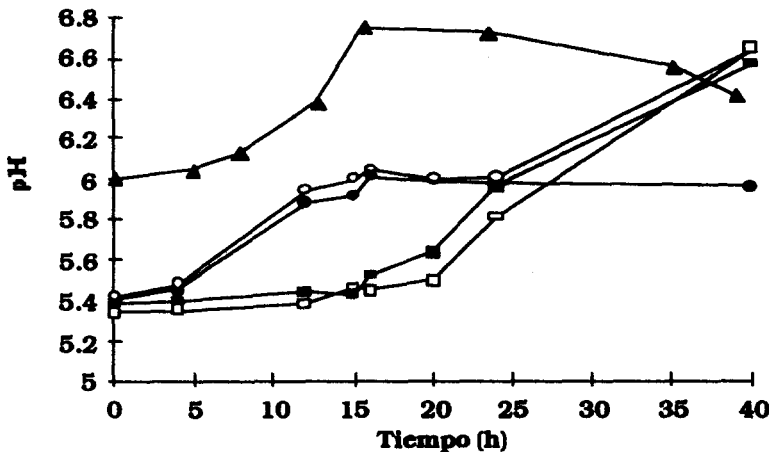


Figura 5.19. Evolución del pH en el cultivo de *M. elsdentii*, adicionado con extractos obtenidos con disolventes de distinta polaridad, en donde:(▲) extracto acuoso, (□) extracto etanólico, (■) extracto de acetato de etilo, (○) liofilizado, (●) liofilizado tratado a 75° C.

5.4.4. Consumo de ácido láctico

En el gráfico 5.20 se puede apreciar que existe un consumo total de ácido láctico entre las 12 a 20 horas de cultivo, este comportamiento es similar al reportado en la Sección anterior (gráficos de L-Láctico), en donde existe una reproducibilidad entre ambos gráficos, es importante mencionar que los cultivos en los que se adicionó etanol y acetato de etilo tardan más tiempo en consumir el ácido láctico debido pH ácido que existía a las 15 horas de cultivo y mismos que se manifestó en el escaso crecimiento.

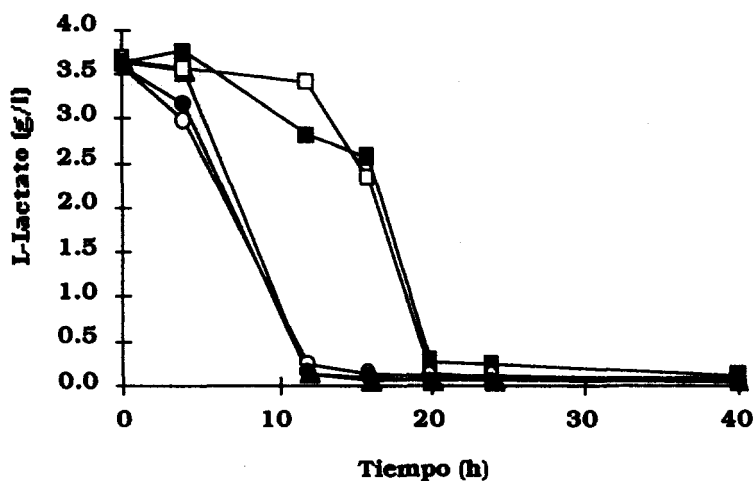


Figura 5.20. Consumo de ácido láctico de extractos obtenidos con disolventes de distinta polaridad, en donde: (▲) Agua, (□) etanol, (■) acetato de etilo, (○) liofilizado, (●) liofilizado tratado a 75° C.

5.4.5. Producción de ácidos grasos volátiles

En la Tabla 5.5 se presenta el porcentaje de ácidos grasos volátiles producidos al final del cultivo con *M. elsdenii*, en donde se aprecia que en el extracto acuoso y extracto de acetato de etilo es donde se produce mayor cantidad de ácido acético.

Una de las aportaciones importantes de este análisis es la observación de una mayor eficiencia en la producción de acético y propiónico. Este incremento podría ser consecuencia del proceso de extracción, en donde se concentran compuestos con características similares de polaridad, mismo que al ser adicionado al cultivo con *M. elsdenii* presentara un efecto benéfico en la producción de estos ácidos. Otro de los puntos importantes es que el patrón de fermentación fue muy similar al reportado en la sección anterior con lo cual se garantiza una alta reproducibilidad de los análisis.

Tabla 5.5. Porcentajes de AGV's al final del cultivo de 40 h.

EXTRACTO	% Acético	% Propiónico	% Butírico
Extracto acuoso	65.6	34.4	0
Extracto etanólico	57.9	42.1	0
Extracto de acetato de etilo	64.4	35.6	0
Liofilizado	59.2	40.8	0
Liofilizado 75° C	60	38.9	1.1

NOTA: Los datos de producción de AGV's de cada uno de los extractos evaluados se presentan en el anexo 3.

5.4.6. Balance de materia

En la Tabla 5.6 se presentan los coeficientes estequiométricos en base a la fracción de carbono de cada producto de fermentación de *M. elsdenii* por la adición de diferentes extractos, el mayor rendimiento corresponde al ácido acético seguido del ácido propiónico y CO₂. Si se compara la Tabla 5.6 con la 5.6a se puede observar que la adición de los diferentes extractos al cultivo de *M. elsdenii* tienen un efecto

Resultados y Discusión

benéfico en la producción de ácido propiónico, incrementando dos veces su producción. Con respecto a la producción de ácido acético no existen diferencias de producción al adicionar el mismo producto de *P. roquefortii* después de extracciones sucesivas con diferentes disolventes.

De este análisis se eligió el extracto acuoso por ser el que presentaba mejor actividad benéfica sobre el cultivo de *M. elsdenii*, ya que presentó un mejor rendimiento en los diferentes productos de la fermentación.

Tabla 5.6. Coeficientes estequiométricos en base a carbono al final del cultivo.

Tipo de aditivo	Biomasa	CO ₂	Propiónico	Acético	Butírico	% Recuperación
Extracto acuoso	0.19	0.24	0.6	1.42	0	85
Extracto etanólico	0.16	0.24	0.6	1.03	0	73
Extracto de acetato de etilo	0.12	0.24	0.64	1.08	0	70
Liofilizado	0.15	0.24	0.56	1.23	0	77
Liofilizado 75° C	0.17	0.24	0.60	1.13	0	74

Tabla 5.6a. Coeficientes estequiométricos en base a carbono al final del cultivo por la adición de *P. roquefortii* y probiótico Lacto-sacc.

Tipo de aditivo	Biomasa	CO ₂	Acético	Propiónico	Butírico	% Recuperación
<i>P. roquefortii</i>	0.18	0.24	0.60	0.54	0.03	41
Lacto-sacc	0.23	0.24	0.42	0.43	0.46	47

NOTA: Los cálculos de balance de carbono de los productos formados durante el cultivo de *M. elsdenii* con la adición de diferentes extractos se presenta en el anexo 4.

5.4.7. Conclusiones y discusión

- El extracto acuoso mostró tener mejor efecto sobre los productos de fermentación del cultivo con *M. elsdenii*, mismo que presentó el mayor porcentaje de recuperación (85 %).

- Este resultado muestra que posiblemente los compuestos responsables de la actividad probiótica se encuentra en el extracto acuoso.

- Existe reproducibilidad en los resultados de biomasa, consumo de láctico y producción de AGV's como los obtenidos en los ensayos de la Sección 5.3.

- En todos los casos la fermentación que se favoreció fue la acética, seguida de la fermentación propiónica, no presentándose producción de ácido butírico.

- La importancia de esta parte experimental fue conocer el extracto más bioactivo para así poder realizar un fraccionamiento en columna y poder elucidar los posibles compuestos presentes en el extracto. Además de aportar información del comportamiento microbiano al utilizar solo una porción del producto liofilizado.

5.5. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROBIOTICA DE FRACCIONES OBTENIDAS DEL EXTRACTO ACUOSO

En esta Sección se presentan los resultados obtenidos del fraccionamiento en columna del extracto acuoso, así como del análisis de resultados de actividad probiótica al ser adicionados a el cultivo de *M. elsdenii*.

5.5.1. Fraccionamiento en columna del extracto acuoso

En la Sección 5.4 se hizo referencia del extracto con mejor actividad probiótica (extracto acuoso). Se partió de 80 g de extracto acuoso, de los cuales se recuperó el 77.15 % (61.72 g). Se obtuvieron 28 fracciones que fueron eluidas con diferentes mezclas de disolventes, monitoreadas através de cromatografía en capa fina. Se agruparon las 28 fracciones según su polaridad, quedando un total de 8 fracciones, mismas que fueron adicionados a un cultivo con *M. elsdenii* ver Tabla 5.7.

Tabla 5.7. Fracciones agrupadas obtenidas del extracto acuoso.

Fracciones	Materia (g)	Muestras agrupadas
1	0.37	ACE-ETOH (95:5, 90:10, 85:15) + ETOH
2	2.34	ACE-ETOH (80:20) + ETOH
3	9.32	ETOH-H ₂ O (80:20, 60:40)
4	13.44	ETOH-H ₂ O (40:60)
5	26.81	ETOH-H ₂ O (20:80) + H ₂ O
6	5.69	H ₂ O 1,6,7,8.
7	3.60	H ₂ O 2,3,4,5.
8	0.15	H ₂ O 9,10, 11,12.
RECUPERADO	61.72	

5.5.2. Dosificación para la evaluación de fracciones obtenidas del extracto acuoso

En esta sección se presenta la estrategia de dosificación de cada fracción obtenida del extracto acuoso, mismo que fue adicionado en el cultivo de *M. elsdenii*. Para tener una idea más clara de la procedencia de las fracciones se presenta en la Figura 5.21 la secuencia de extracción y fraccionamiento hasta la obtención de 8 fracciones.

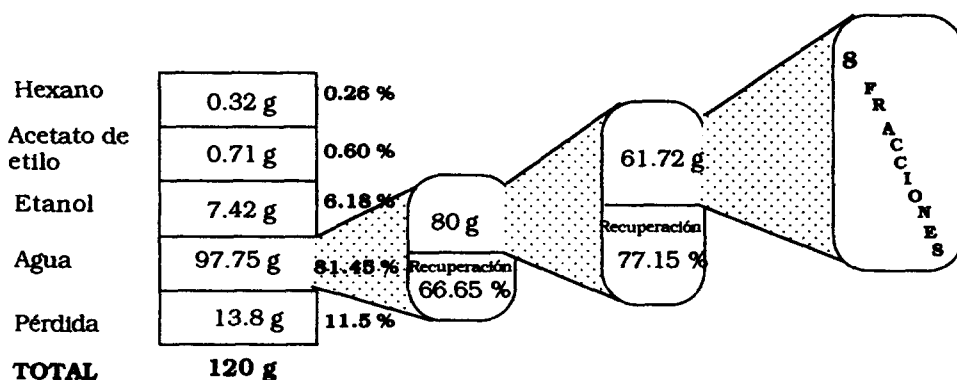


Figura 5.21. Representa la secuencia de los fraccionamientos obtenidos de un liofilizado obtenido de la fermentación sólida con pasta de copra inoculada con *P. roquefortii*.

A continuación se muestran los cálculos realizados para utilizar una dosificación adecuada de las sub-fracciones obtenidas bajo el siguiente criterio de dosificación. Los resultados se muestran en la Tabla 5.8.

A	1	2	3	4	5	6	7	8	B
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Resultados y Discusión

En donde:

A = Representa el efecto del conjunto de compuestos presentes en el extracto acuoso, tomando como dosis 0.056 g / 100 ml de cultivo.

1,2,3,4,5,6,7 y 8 = Representa el efecto de cada sub-fracción soluble en agua, y en este caso se toma como dosis inicial (0.056 g por el % de cada fracción/ 100) = g/100 ml de la sub-fracción.

B = Representa el efecto de la sumatoria de **1,2,3,4,5,6,7 y 8**, indicando en este caso si todos las sub- fracciones tienen efecto común o individual.

A - B = Representa el efecto de la pérdida del material durante el proceso de fragmentación.

Así tenemos la siguiente tabla.

Tabla 5.8. Dosificación de fracciones en el cultivo de *M. elsdentii*.

Fracción	Muestra (g) después de fraccionar	Porcentaje recuperado	Dosis	SOLUBILIDAD (ml)	Muestras agrupadas
1	0.37	0.60	0.00034	13.21	ACE-ETOH (95:5, 80:10, 85:15) + ETOH
2	2.34	3.79	0.00212	83.57	ACE-ETOH (80:20) + ETOH
3	9.32	15.10	0.00846	332.86	ETOH-H ₂ O (80:20, 60:40)
4	13.44	21.78	0.01219	480.00	ETOH-H ₂ O (40:60)
5	26.81	43.44	0.02433	957.50	ETOH-H ₂ O (20:80) + H ₂ O
6	5.69	9.22	0.00516	203.21	H ₂ O 1,6,7,8.
7	3.60	5.83	0.00327	128.57	H ₂ O 2,3,4,5.
8	0.15	0.25	0.00014	5.50	PROT 1,2, 3, 4.
Recuperación	61.72	100.0		2204.43	
Pérdidas	18.28	22.84		648.21	

Resultados y Discusión

- Para la obtención de porcentaje recuperado de cada fracción se partió de que 61.72 g eran el 100 %.
- Dosificación: Se partió de una dosis de 0.056 g /L que se venía administrando en anteriores cultivos, por lo tanto este valor correspondería al 100 %. Por otro lado con el conocimiento del porcentaje recuperado de cada fracción se realizaron los siguientes cálculos.

Ejemplo de la fracción 1:

$$0.6 \times 0.056 / 100 = 0.00034 \text{ g} / 100 \text{ ml} = \textbf{Dosificación}$$

- La solubilidad se obtuvo con el siguiente criterio: sabíamos que el extracto liofilizado tenía 28 g/L de sólidos solubles, por lo tanto se hicieron los siguientes cálculos:

$$0.37 \text{ g (recuperados)} \times 1000 \text{ ml} / 28 \text{ g} = 13.21 \text{ ml} = \textbf{Solubilidad}$$

5.5.3. Producción de biomasa

En la Figura 5.22 se presenta la producción de biomasa de *M. elsdenii* al adicionar al cultivo diversas fracciones provenientes del extracto acuoso, el gráfico muestra que al adicionar el control liofilizado, extracto acuoso y la suma de las 8 fracciones es donde hay mayor estimulación de crecimiento como era de esperarse, ya que en estos controles se encuentran presentes una gran variedad de compuestos bioactivos. Lo importante de esta cinética es que la fracción 5 es la que presenta un mayor incremento sobre la producción de biomasa de *M. elsdenii* y además el cultivo se mantiene estable durante todo el cultivo, esto es importante ya que sigue el mismo perfil reportado en los capítulos 5.3 y 5.4; la única desventaja esta parte experimental es que la biomasa alcanzada no presentó la misma producción de las secciones anteriores (0.5 g/L en promedio), en este experimento la máxima biomasa alcanzada fue de 0.076 g/L y fue observada en el cultivo donde se adicionó liofilizado, por lo mismo los datos de todas las cinéticas fueron normalizados tomando como valor máximo 0.076 g/L de biomasa.

Por otro lado lo que se esperaba de este análisis era observar cambios en la producción de biomasa por la estimulación de alguna de las fracciones adicionadas al cultivo de *M. elsdenii*, sin embargo no se logró reproducir los resultados de los análisis, pero aun con esta deficiencia es posible suponer que la fracción bioactiva es la fracción 5, sin embargo faltan argumentos que precisen esta estimación.

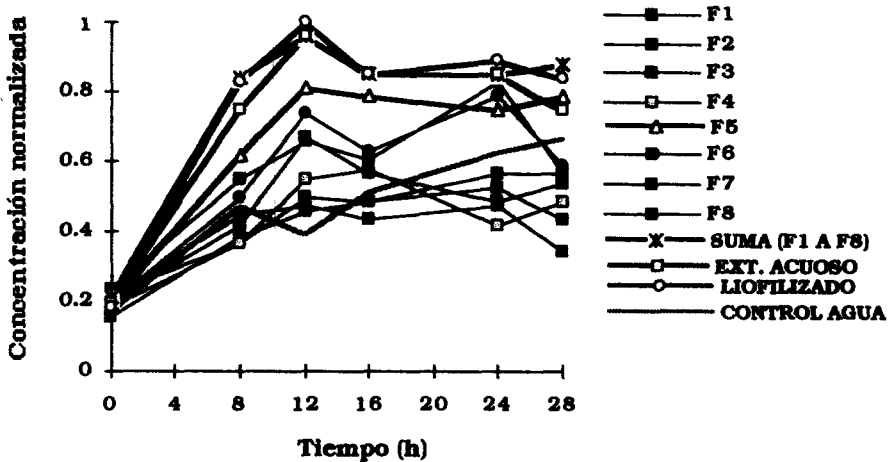


Figura 5.22. Producción de biomasa por adición de fracciones obtenidas del extracto acuoso, en el cultivo de *M. elsdenii*.

5.5.4. Evolución del pH

La Figura 5.23 muestra la evolución del pH en el cultivo de *M. elsdenii* al adicionar diferentes fracciones provenientes del extracto acuoso, observando que el pH desciende durante el cultivo y permanece a pH 6 después de las 7 horas de cultivo.

En esta parte experimental nuevamente se presentó un problema de pH, aun cuando fue controlado desde la preparación del medio de cultivo, por lo tanto se presentaron modificaciones y esto conllevó a que el cultivo de *M. elsdenii* no desarrollara un crecimiento adecuado.

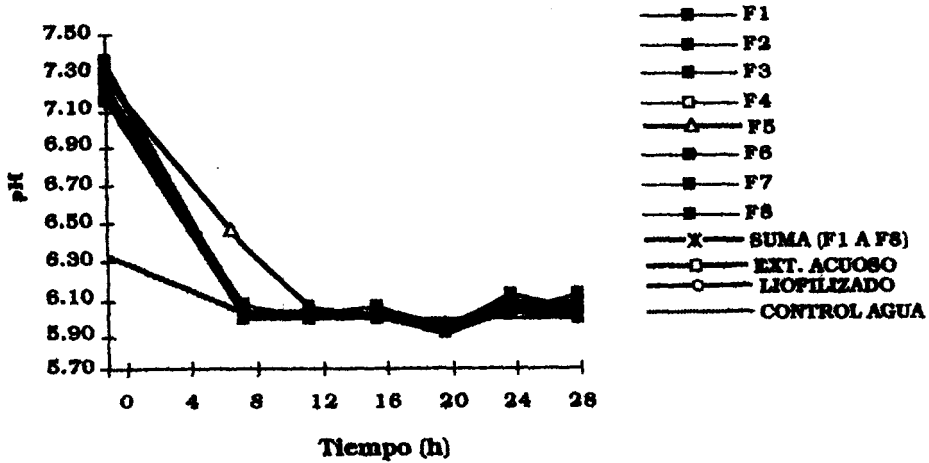


Figura 5.23. Evolución del pH durante el cultivo de *M. elsdenii* al adicionar fracciones provenientes del extracto acuoso.

5.5.5. Consumo de ácido L-Láctico

En la Figura 5.24 se muestra que no existió un consumo de sustrato durante el cultivo en ninguno de los casos, esto es atribuible posiblemente al efecto del pH al inicio del cultivo ya que no fue favorable para que el microorganismo activará sus mecanismos para consumir el sustrato y por ende transformar a producto. Sin embargo en algunos casos existió la producción de ácido acético pero en pequeña cantidad.

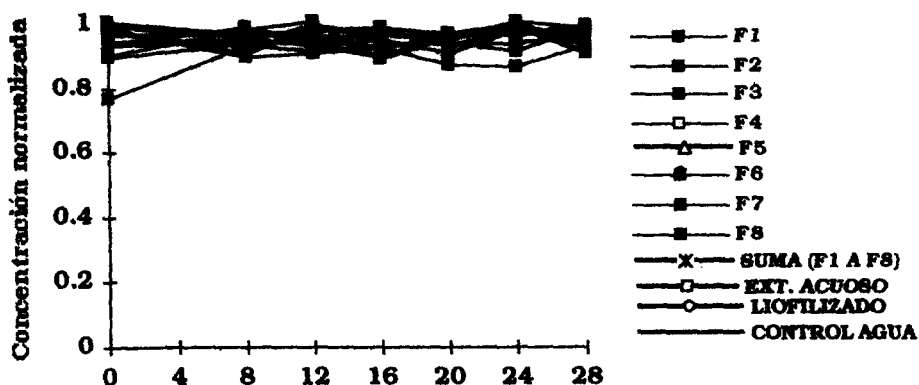


Figura 5.24. Consumo de ácido- Láctico durante el cultivo de *M. elsdenii* al adicionar fracciones provenientes del extracto acuoso.

5.5.6. Producción de ácidos grasos volátiles

En la Tabla 5.9 se presenta la producción de ácido acético que fue el único ácido graso producto de la fermentación de *M. elsdenii* al adicionar diferentes fracciones. En la tabla se aprecia que aunque la cantidad es mínima hay una mayor producción en las fracciones 1 a 5, lo que indica que el subfraccionar el producto de la extracción acuosa estimuló la producción de este ácido graso en el cultivo de *M. elsdenii*. Por otro lado si se compara la producción de acético con respecto a los controles (lío filizado, suma de 8 fracciones, extracto acuoso), se aprecia que la eficiencia de producción es escasa, ello quiere decir que posiblemente al subfraccionar exista una concentración de compuestos que al ser adicionados al cultivo de *M. elsdenii* incrementen su producción en AGV's. Sin embargo esto es solo una estimación de lo que podría suceder en el cultivo, para corroborar esta información sería necesario realizar un nuevo experimento que sea reproducible con los reportados en las secciones 5.3 y 5.4.

Con estas desventajas que se tuvieron en esta parte experimental es posible suponer que si existe una estimulación en el crecimiento y producción de metabolitos por *M. elsdenii* durante el cultivo.

Tabla 5.9. Producción de ácido acético por adición de fracciones provenientes del extracto acuoso al final del cultivo con *M. elsdenii*.

Fracción adicionada	g/L ácido acético
Fracción 1	1.28
Fracción 2	0.68
Fracción 3	0.93
Fracción 4	0.63
Fracción 5	0.55
Fracción 6	0.15
Fracción 7	0.31
Fracción 8	0.08
Suma de fracciones 1 a 8	0.31
Extracto acuoso	0.26
Liofilizado	0.48
Control agua	0.19

5.5.7. Conclusiones y discusión

- En general los resultados de esta sección no fueron los esperados ya que el microorganismo no se pudo desarrollar por efecto del pH, sin embargo se observaron algunas diferencias en cuanto a la producción de biomasa y producción de ácidos grasos volátiles.
- Se observó que de las 8 fracciones analizadas la fracción 5 estimuló el crecimiento de *M. elsdenii* en cultivo y generó una producción de ácido acético de 0.55 g /L al final del cultivo.
- La producción de ácido acético fue favorecida en las fracciones 1 a 5, obteniendo valores de 0.55 a 1.28 g/L, ocurriendo el caso contrario en el los controles suma de 8 fracciones, extracto acuoso y liofilizado donde presentaron valores de 0.31, 0.26 y 48 g/L respectivamente.

Resultados y Discusión

- La fracción 5 fue elegida para realizar un nuevo subfraccionamiento por presentar un perfil similar de biomasa y producción de AGV's como los reportados en las secciones anteriores.

- Aunque los resultados no son reproducibles en esta parte experimental, se pudieron notar algunos perfiles de fermentación similares a los obtenidos en secciones anteriores, sin embargo es posible suponer que si existe una estimulación en el crecimiento y producción de metabolitos por *M. elsdenii* durante el cultivo. Por ello es aconsejable realizar otro estudio para corroborar estos resultados ya que este estudio solo nos proporciona una estimación de lo que podría suceder en el cultivo.

5.6. IDENTIFICACION QUIMICA DE COMPUESTOS PROVENIENTES DE LA FRACCION 5 DEL EXTRACTO ACUOSO

En esta sección se presentan los resultados del fraccionamiento en columna de la fracción 5 que fue elegida en la sección anterior por presentar mejor estimulación en el cultivo de *M. elsdentii*. En la sección anterior se recuperaron 26.81 g de la fracción 5, en esta parte experimental se utilizaron 10 g que fueron eluidos primeramente con una mezcla de etanol - agua 90:10 y posteriormente con agua, recuperando el 100 % de en un total de 44 subfracciones, 36 de las cuales se recuperaron con etanol - agua 90:10 y las 8 restantes con agua.

Durante el proceso de evaporación de los disolventes presentes en cada subfracción se observó en algunos casos la presencia de compuestos cristalinos en las primeras 6 subfracciones obtenidas; posteriormente se realizó una cromatografía en placa y se agrupo la subfracción 3 y 4 ya que presentaban las mismas características de corrimiento en placa y la presencia de cristales amorfos de color amarillo- pardo, a la que se le denominó subfracción A.

5.6.1. Identificación de compuestos

De las 44 subfracciones recuperadas provenientes de la fracción 5 del extracto acuosos se eligió la subfracción A para realizar estudios de identificación química, recuperando en este caso 0.57 g. El compuesto identificado de esta subfracción A fue el manitol (Figura 5.26), presentó un punto de fusión de 153° C con un Rf de 0.72 eluido con etanol - agua 90:10, su estructura se determinó através de los resultados espectroscópicos de RMN ¹H y RMN ¹³C, los cuales se compararon con los reportados por Trigos, et al. 1995.

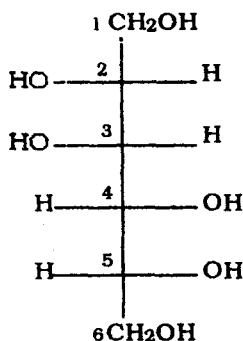


Figura 5.25. Estructura química del manitol.

El manitol pertenece a la familia de los alcoholes hexaohidrílicos, agrupados como compuestos del sorbitol, ducitol y manitol, teniendo como diferencia configuraciones distintas en sus centros de disimetría.

El espectro de RMN ^1H (Figura 5.26), se obtuvo diluyendo la subfracción A en agua deuterada y los picos que se observan entre la región 3.8 ppm y 3.4 ppm corresponden a una señal compleja que indica los protones de la molécula. El pico de la región 4.7 ppm indica la señal de protones de la molécula de agua.

En el espectro de RMN ^{13}C (Figura 5.27), se muestran tres señales simples a 73.6 ppm, 71.5 ppm, y 65.2 ppm, que debido a un efecto de simetría en el manitol, corresponde a los 6 carbonos presentes en el compuesto.

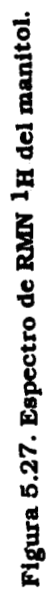
Con la ayuda del experimento DEPT (Figura 5.28) se identificaron 2 señales para carbonos terciarios a 73.6 y 71.5 ppm y una señal a 68.2 para carbono secundario. El total de las asignaciones se presenta en la Tabla 5.10.

Tabla 5.10. Asignación de la señal de RMN ^{13}C del manitol (δ , D $_2$ O, 50 MHz).

Carbono	ppm
1	65.2
2	71.5
3	73.6
4	73.6
5	71.5
6	65.2

5.6.2. Conclusiones y discusión

- En esta parte experimental obtuvieron 44 subfracciones provenientes de la fracción 5 del extracto acuoso, de los cuales las primeras 6 subfracciones presentaron formas cristalinas.
- Se logró identificar un compuesto de la subfracción agrupada 3 y 4 denominado manitol.
- De este trabajo se abre la posibilidad de seguir estudiando cada una de las subfracciones obtenidas mediante el empleo de columnas de purificación para la obtención de diversos tipos de compuestos y valuarlos bajo un bioensayo con la bacteria ruminal *M. elsdenii*.



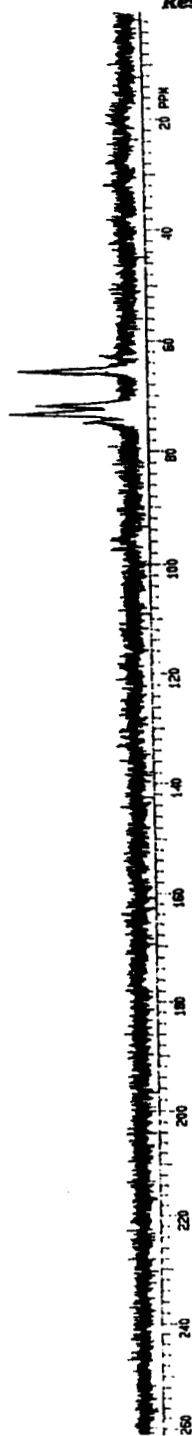
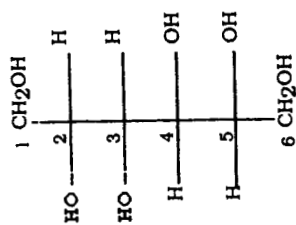


Figura 5.28. Espectro de RMN ^{13}C del manitol.

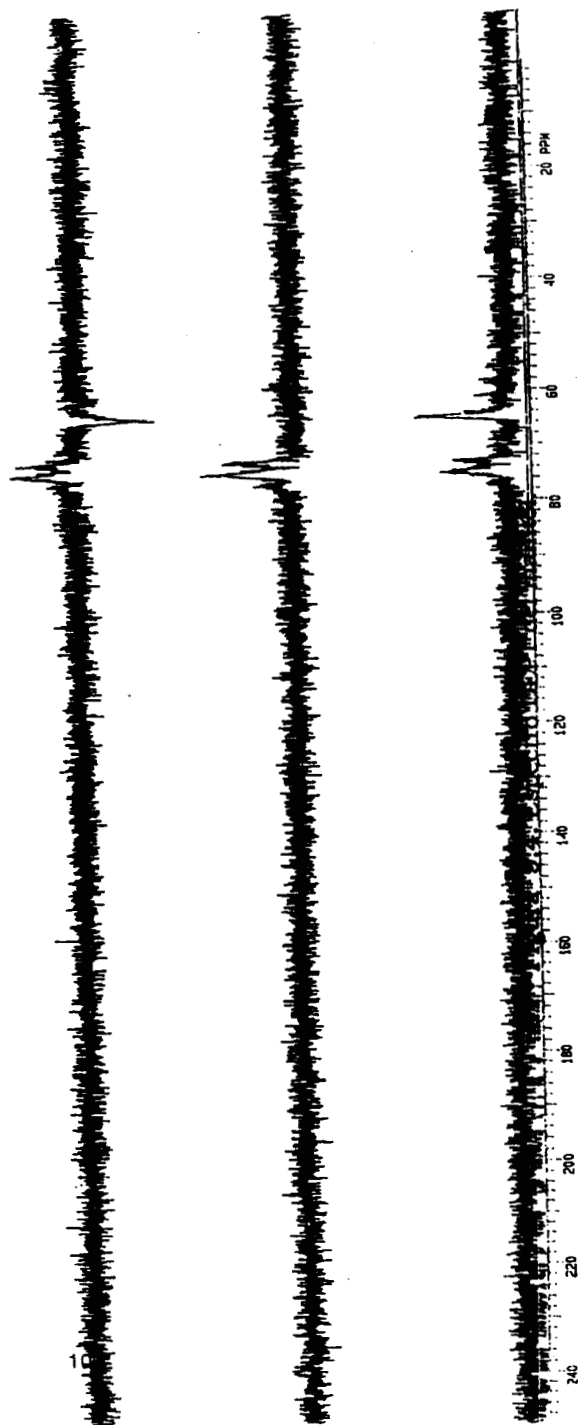
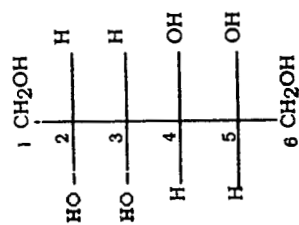


Figura 5.29. Espectro DEPT del manitol.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

1.- Se seleccionaron cepas de hongos filamentosos con velocidad de crecimiento rápido (40-60 h), crecidas sobre pasta de copra húmeda (60%) y sin agregar nutrientes.

2.- Se propuso una metodología para la evaluación de la actividad probiótica de productos de fermentación sólida, mediante análisis de pH, biomasa, ácido láctico y ácidos grasos volátiles.

3.- El efecto probiótico de dos productos de fermentación (*P. roquefortii* y *A. oryzae* 2095) son comparables con el efecto benéfico del probiótico Lacto-sacc, así mismo el efecto probiótico del producto de fermentación (*S. castelli*), es comparable con el efecto del probiótico Yea-sacc 8417.

4.- El estudio de pasta de copra sin fermentar adicionada al cultivo de *M. elsdenii* no mostró estimulación el crecimiento y formación de producto de *M. elsdenii*, lo que indica que los otros productos fermentados formaron durante el proceso algunas moléculas o compuestos que favorecieron el crecimiento y formación de productos durante el cultivo.

5.- Del producto de fermentación (*P. roquefortii*), se logró identificar que en la fracción acuosa se encuentran los compuestos con mayor estimulación probiótica.

6.- Se identificó un compuesto proveniente del extracto acuoso (manitol), recuperando 0.56 g que corresponden al 0.46 % del liofilizado de *P. roquefortii*.

7.- El aporte principal de este trabajo fue elucidar al menos un compuesto como posible precursor de actividad probiótica, Sin embargo hasta el momento no se sabe si el azúcar identificado es el responsable de dicha actividad, lo que si se puede suponer es que por el hecho de ser un azúcar sea fácilmente metabolizable y estimule el crecimiento de *M. elsdenii*.

8.- Otro aporte importante de este trabajo fue establecer que la actividad benéfica en el estudio con *M. elsdenii* mostró que el uso de cultivos en medio sólido pueden ser potencialmente atractivos como estimuladores de crecimiento y producción de metabolitos de importancia en la alimentación animal. Por otra parte al adicionar productos de FS ó probióticos comerciales al cultivo de *M. elsdenii* únicamente se adicionaron partículas solubles, es decir cero células ó microorganismos, con lo cual se demuestra que el efecto probiótico no es debido a la presencia de microorganismos en un cultivo, si no posiblemente a algunas sustancias o compuestos propios de los microorganismos o productos residuales de la fermentación, esto es importante ya que generalmente se ha mencionado por diversos autores que la actividad probiótica es atribuible en su mayoría a microorganismos, sea hongos o levaduras.

9.- Con este estudio se habré la posibilidad de estudiar los productos de fermentación sólida como procesos en los cuales se pueda obtener un provecho benéfico para el animal que lo consume. Así mismo resultaría interesante evaluar a detalle el proceso de fermentación, analizando a intervalos de tiempo los productos que se vayan formando, análisis de actividad probiótica, identificación de compuestos bioactivos en estudios *in vitro* y por último estudios *in vivo*. Sin embargo este tipo de procesos requiere de tiempo para poder elucidar los compuestos con bioactividad y asegurar con estudios *in vivo* la actividad benéfica del compuesto.

BIBLIOGRAFIA

7. BIBLIOGRAFIA.

Adams, D. C.; Galyean, M. L.; Kiesling, H. E.; Wallace, J. D. Y Finker, M. D. (1981). Influence of viable yeast culture, sodium bicarbonate and monensin on liquid dilution rate, rumen fermentation and feedlot performance of growing lambs and digestibility in lambs. *J.Anim. Sci.* **53**:780-789.

Aguilar, R y Rueda, R. (1980). Análisis de Tecnología apropiada para la industria de la palma de coco.

Alltech de México. (1997). Catalogo de probióticos comerciales en México.

AOAC. (1987). Official Methods of Analysis. William Horwitz, Ed. Association of Official Analytical chemists. Washington, D.C.

Aquiahuatl, R. M. A. (1989). Producción, conservación y viabilidad de inóculos de hongos filamentosos para las fermentaciones sólidas. *Micol. Neotrop. Apl.* **2**: 3-17.

Auria, A.; Hernández, S.; Raimbault, M.; Revah S. (1990). Ion exchange resin: a model support for solid state growht fermentation of *Aspergillus niger*, *Biotechnology. Techniques.* **4**: 391-396.

Barrios, G. J.; Tomasini, A.; Rodríguez, G. M. (1990). Enviromental and nutritional factors controlling aflatoxin production in cassava solid state fermentation. *Journal. Ferment. Bioeng.* **70**, 329-333.

Barrios, G. J.; Tomasini, A.; Viniegra, G.; López, J. (1988). Penicillin production by solid state fermentation. *Biotechnol. Letters*, **10**, 793-798.

Bergey's manual of determinetive Bacteriology. (1994). Co. editors Buchanan R.E and Gibbons N.E. Elighth Edition. pp. 449.

Broock, T. D.; Smith, D. W y Madigan, M. T. (1987). Microbiología. Prentice-Hall, Hispanoamericana, México.

Bibliografía

Bryant, M. P. (1956). The characteristics of strains of *Selenomonas* isolated from bovine rumen contents. *Journal of Bacteriology*. **72**:162-167.

Cadena, M. M.; Cornejo, C. J. M.; Prieto, N. J. M.; Gaitan, G. J.; Carasco, S. S.; González, C. R.; Favela, T. E.; Gutierrez, R. M y Saucedo, C. G. (1993). Características de medición de un metabolímetro para fermentadores en sustrato sólido. *Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica*, **Vol 14**, No 2, pp 311-319.

Campos, M. R. G y Viniegra, G. G. (1995). Microbial bioassay of fungal compounds that stimulate the growth of a consortium anaerobic cellulolytic bacteria. *Biotechnology Techniques* **Vol.9** No 1, pp 65 - 68.

Campos, M. R. G. y Viniegra, G. G.(1994). El uso de cultivos fúngicos como probióticos en la nutrición de rumiantes. *Tecnología de Alimentos, (méx)*. **Vol. 29**, No 5-6.

Campos, M. R. G.; Medina, M. A.; Jiménez, G. A.; Saucedo, C. G y Viniegra, G. G. (1995a). Bioensayo para probióticos de tipo fúngico usando un cultivo puro de la bacteria ruminal *Selenomonas ruminantium*. Productos naturales. Perspectivas biotecnológicas, **Vol. 2**. pp 251 - 254.

Chademana, I y Offer, N. W. (1990). The effect of dietary inclusion of yeast culture on digestion in the sheep. *Anim. Prod.* **50**:483- 489.

Chiquette, J. (1995). *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae*, used alone or in combination, as a feed supplement for beef and dairy cattle. *Canadian Journal of Animal Science*. **75**:405-415.

Church, C. D. (1988). Clasificación e importancia de los animales rumiantes. en *El rumiante fisiología digestiva y nutrición*, Editorial, Acribia, S.A. Zaragoza España, **Cap.1**: 1-15.

Deaville, E. R y Galbraith, H. (1990). Effect of dietary yeast and protein supplementation on growth and fibre characteristics of British angora goats. *Anim. prod.* **51**:565.

Bibliografía

Dukes, H. H y Swenson M. J. (1970). Fisiología de los animales domesticos. Tomo I, Cap 22:538.

Durken, N. (1979). An Introduction to Medical Science, MTP Press Limited, England.

FAO. (03/1998), en página de internet <http://www.FAO.org>.

Favela, T. E y Gutiérrez, R. M. (1992). Estudio de prefactibilidad para la producción de un probiótico a partir de la pulpa de café y bagazo de caña, Reporte interno de la planta piloto 4 de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa.

Fernandez, W. (1987). Oil loss in copra due to fungi; A review *The Philippine Agriculturist* 70:29-39.

Flores, R. E y García, B. V. (1995). Reporte de servicio social "Aislamiento de cepas de hongos filamentosos a partir de la copra", Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, México, D.F.

Flores-Menéndez J. A. (1989). Manual de la alimentación animal, Ediciones Ciencia y Tecnología, S.A. Vol. 1 y 4, Cap. 1 y 9. pp:30, 31, 877, 878, 879.

Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*. 66: 365-378.

Fuller, R. (1992). The effect of probiotics on the gut micro-ecology of farm animals. IN: The lactic acid bacteria in health and disease .Editd by Brian J.B. Wood. Elvsevier Applied Science/London and New York Vol. 1: 171-192.

Gervais, P.; Molin, P y Bensonussan, M. (1988). Influence of the water activity of a solid substrate on the growth rate and sporogenesis of filamentous fungi. *Biotechnol. Bioeng.* 31:457-463.

Gibbonns, W. R y Wetsby C. A. (1988). Techonology and economics of ethanol production from fodder beets via solid-state fermentation, *Biotechnol. Letters*, 10, 665-670.

Bibliografía

Gil-Rueda F. (1997). Probióticos en nutrición animal, Universidad de Murcia-España, en <http://www.ered.districto.com/USUARIOS/pacogil/probióticos.htm>

Gómez, A.; R., Dudas, C.; y Huber, J. T. (1990). Influence of cultures of *Aspergillus oryzae* on rumen and total tract digestibility of dietary components. *J. Dairy Sci.* **73**:703-710.

Hang, Y. D. y Woodadams, E. E. (1987). Effect of substrate moisture content on fungal production of citric acid in a solid state fermentation system, *Biotechnol. Letters.* **9**:183-186.

Havenaar, R y Josh, J. Huis In't Veld. (1992). Probiotics: A general view in : The lactic acid bacteria in health and disease, edited by Brian J. B. wood, London Elsevier, *Applied Sci.* **Vol. 1** pp: 151-170.

Havenaar, R y Spanhaak. (1994). Probiotics from an immunological point of view, *Current Opinion in Biotechnology*, **vol. 5** pp 320-325.

Herrera, V. E. (1997). Tesis Profesional "Estudio químico del hongo ectomicorrizogeno, *Pisolithus tinctorius* "Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Escuela de Biología. Puebla, Pue.

Hesseltine, C. W. (1987). Solid State Fermentation-An Overview, *int. Biodeterioration*, **23**:79-89.

Hose, H y Sozzi, T. (1991). Probiotics fact or fiction?, *J. Chem. Tech. Biotechnology*, **51**: 540-544.

Hoyos, G. (1997). Aplicación de la biotecnología en la producción animal: la experiencia mexicana de una década. Memorias dell'er Simposio mexicano sobre probióticos. Ciudad Universitaria, México. D.F. pp 131- 147.

Hoyos, G. y Cruz, C. (1990). Mecanismos de acción propuestos de los probióticos en cerdos. *Biotecnología en la industria de la alimentación animal.* **Vol. 1**, pp 73-80.

Bibliografía

- Huber, J. T. (1991). El uso de los hongos y cultivos de levadura en ganado lechero en producción, Memoria del curso intensivo internacional sobre producción de leche, Colegio de Posgraduados, Montecillo México, 11-16 p.
- Hungate, R. E. (1969). A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. In: Norris Jr. Ribbons DW (eds) *Methods in Microbiology*, London, New York. Academic press, **Vol.3B**: 117-132.
- Huntington, B. G. (1993). En: *Fisiología digestiva y nutrición*, Editorial. ACRIBIA, S.A. **Cap 23**:393-354.
- INEGI.1988). *Abasto y comercialización de productos básicos. Oleaginosas*.
- Josse, I. (1979). *Fisiología y anatomía animal*, editorial el manual moderno, s.a. de C.V. **Cap 7**:167-169.
- Kaufmann, W. (1983). *Estrategias de alimentación para vacas lecheras de alta producción*, AGT editor, S.A. **Cap 5**:69.
- Lilly, D. M. y Stillwell, R. H. (1965). Probiotics growth promoting factors produced by microorganisms. *Science* **147**: 747-748.
- Lonsane, B. K.; Saucedo, C. G.; Raimbault, M.; Roussos, S.; Viniegra, G. G.; Ghildyal, N. P.; Ramakrishna, M y Krishalah M.M. (1991). Scale-up, strategies for solid state fermentation system: state of the art, *Process Biochem.*, Soumis.
- Maisons, A. (1991). *Le chef du service alimentation*. I. R. H. O. France.
- Males, J. R y Johnson B. (1990). Probiotics- what are they?, what do they do? in *J. Animal Sci.* **69**: (Suppl):505 (abstr).
- Martin, S. A y Nisbet D. J. (1990). Effects of *Aspergillus oryzae* fermentation extract on fermentation of amino acids, bermudagrass and starch by mixed ruminal microorganisms in vitro. *Journal Anim. Sci.* **68**: 2142-2149.

Bibliografía

- Martin, S. A y Russell J. B. (1988). Mechanisms of sugar transport in the rumen bacterium *Selenomonas ruminantium*. *J. Gen Microbiol.* **134**:819-827.
- Miller, J. W. (1989). Nutrición y alimentación del ganado vacuno lechero, editorial ACRIBIA, S.A., **Cap 18**:403-404.
- Mudgett, R. E. (1986). Solid-state fermentation. in *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Ed. by Demain A.L.Solomon N.A., Washington, *American society for microbiology*, pp 66-84.
- Nisbet, D. J y Martin S. A. (1991). Effect of *Saccharomyces cerevisiae* culture on lactate utilization by the ruminal bacterium *Selenomonas ruminantium*. *Journal animal Science* **69**: 4628 - 4633.
- Nisbet, D. J y Martin, S. A. (1990). Effects of dicarboxylic acids and *Aspergillus oryzae* fermentation extract on lactate uptake by ruminal bacterium *Selenomonas ruminantium*. *Applied and environmental microbiology*, **Vol.56**. pp 3515-3518.
- Nisbet, D. J y Martin, S. A. (1993). Effects of fumarate, L-Malate, and an *Aspergillus oryzae* fermentation extract on D-Lactate utilization by the ruminal bacterium *Selenomonas ruminantium*. *Current Microbiology* **Vol. 26**, pp 133-136.
- Parker, R. B. (1974). Probiotics, the other half of the antibiotics story. *Animal Nutrition and Health*, **29**:4-8.
- Pérez, G. O. (1990). Principios microbiológicos y químicos de la producción bovina. EN: *Biotecnología para el aprovechamiento de los desperdicios orgánicos*. Compiladores Monroy H. O y Viniegra G. G., AGT Editor, S.A., pp 47-55.
- Pineda, R. H y Pérez, P. R. (1996). Contribución a la evaluación de la producción de probióticos por hongos filamentosos en cultivo en medio sólido, Tesis de licenciatura para obtener el título de Químico Farmacobiólogo, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Raimbault, M y Alazard, D. (1980). Culture method to study fungal growth in solid fermentation. *European J.Appl. Microbiol.* **9**:199-209.

Bibliografía

- Raimbault, M. (1980). Fermentation en milieu solide. Croissance de champignons filamenteux sur substrat amylacé, Thèse Doct. es Sci., Université Paul Sabatier, Toulouse, France, pp 291.
- Ramírez, I. M. E. (1995). Bioensayo para la evaluación de probióticos por vía microbiana. Tesis de servicio social. Universidad autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa, México. D.F.
- Ramírez, I. M. E. (1998). Biodisponibilidad y biodegradación de naftaleno en suelo. Tesis de maestría en biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, México, D.F.
- Ramírez, I. M. E.; Saucedo, C. G.; Montet, D.; Durand, A.; Renaud, R y Roussos S. (1994). Potential of using a bioassay for the evaluation of probiotic capacity of solid state fermentation (SSF) products. Reporte interno del laboratorio, Planta piloto 4 de biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana.
- Roles, J. A., (1980), "Application of Macroscopic principles to microbial metabolism". Biotech. Bioeng., **22**: 2457 - 2514.
- Roussos, S. (1985). Croissance de *Trichoderma harzianum* par fermentation en milieu solide: physiologie, sporulation, et production de cellulases, Thèse Doct. es Sci., Université de Provence, France, pp.193.
- Roussos, S.; Hannibal, L.; Durand, A.; Diez, D.; Saucedo, C.; Montet, D. y Graille, J. (1994). Enrichissement en protéines du tourteau de coprah: Sélection de champignons filamenteux en FMS. *Oleagineux* No 5-49:235-247.
- SARH. (1988-1992), Anuario de la producción agrícola de los Estados Unidos Mexicanos.
- Saucedo, Castañeda G. (1987). Contribución al estudio de la fermentación sólida: Enriquecimiento proteico y conservación por ensilaje, Tesis de Maestría en Ciencias Ingeniería química, universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, México, pp169

Bibliografía

Saucedo, C. G.; Gutiérrez, R. M.; Favela, T. E.; Huerta, O. S.; Cadena, M. M.; Cornejo, C. J. M.; Cadena, L. Y. R.; Meneses, M. M.; Aguilera, V. L.; Pineda, R. H Y Pérez, P. R. (1996). Monitor de gases para fermentadores en sustrato sólido MGM-Biotec II. Reporte de Investigación de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

Saucedo, Castañeda G. (1991). Contrôle du métabolisme de *Schwanniomyces castelli* cultivé sur support solide. Thèse Doct. Sciences des aliments., Université Montpellier II, France.

Saucedo-Castañeda, G.; Lonsane, B. K.; Krishnalah, M. M.; Navarro, J. M.; Roussos, S y Raimbault, M. (1991). Maintenance of heat and water balances as a scale-up criterion for production of ethanol by *Schwanniomyces castelli* in solid state fermentation system. *Process Biochem.* Sous presse.

Smith, J. (1991). Probiotics fact or fiction?, *J. Chem. Tech. Biotechnology*, **51**: 539-540.

Soeyenbos (1984). El concepto de los probióticos y la producción avícola, evaluación de datos del rendimiento EN: EL uso de la Biotecnología para lograr eficiencia y productividad en la producción animal, cuidando los aspectos del medio ambiente. Sefton. T. (comp.), *Alltech Biotechnology Center* (1991) pp 33 - 45.

Stewart, C. S y Bryant, M. P. (1988). The rumen bacteria. In: P. N. Hobson . Elsevier Science Publishing Co., New York. The rumen microbial ecosystem. pp.21.

Tapia, M. N.; Herrera, R. S.; Gutiérrez, R. M.; Roussos, S y Viniegra, G. G. (1988). The effect of four fungal compounds as probiotics on in vitro dry matter disappearance of different feedstuffs. *J. Animal Sci.* **66** (suppl.1):1260 abstr.

Tokoyama, M.T y Johnson, K.A. (1993). En el rumiante, Fisiología digestiva y nutrición. Editorial ACRIBIA. S.A., pp 137-157.

Trigos, A.; Cancela, G.; Pérez, B. A Y Robinson, F.V. A. (1995). Isolation and identification of mannitol from mexican wild fungi *Micol. Neotrop. Apl.* **8**: 47-52.

Bibliografía

Trinci, J. P. A. (1969). A kinetic study of the growth of *Aspergillus nidulus* and Other fungi. *J.gen.microbiol.* **57**:11-24

Wiedmeier, R. D. y Aranbel, M. J. (1987). Effects of yeast culture and *Aspergillus oryzae* fermentation extract on ruminal characteristics and nutrient digestibility. *Journal dairy Sci.* **Vol. 70** pp 2063-2068.

Williams, P. E. V. (1991). The effects of fungal cultures on rumen fermentation and ruminant productivity IN: Probiotics -fact or fictions?. *J. Chen. Tech. Biotechnol.* **51**: 567 - 570.

Williams, P. E. V.; Tait, C. A. G.; Innes, G. M Y Newbold C.J. (1991). Effects of the inclusion of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae* plus growth medium) in the diet of dairy cows on milk yield and forage degradation and fermentation patterns in the rumen of steers. *J. Animal. Sci.* **69**: 3016

Wilson, P. N. (1983). Concentrados. EN: Estrategia de alimentación para vacas lecheras de alta producción. Broster, W. H y Swan H. (comp.), AGT Editor, S. A, Méx., **Cap.15**: 269 - 282.

ANEXOS

ANEXO1

Porcentajes de ácidos grasos volátiles a diferentes horas de cultivos de probióticos comerciales, productos de fermentación sólida y testigos.

<i>A.oryzae</i> 2094	Propiónico g/L	Acético g/L	Butírico g/L	Total AGV's g/L	% Propiónico	% Acético	% Butírico
0	0.46	0.69	0.04	1.19	38.58	58.16	3.27
3	0.48	0.67	0.05	1.20	40.25	55.73	4.02
6	0.43	0.75	0.06	1.24	34.86	60.69	4.45
9	0.47	0.88	0.04	1.39	33.71	63.33	2.95
12	0.38	0.78	0.04	1.20	31.71	64.60	3.69
15	0.42	0.60	0.09	1.11	37.90	53.94	8.16
18	0.42	0.35	0.10	0.87	48.21	40.30	11.49
21	0.38	0.64	0.12	1.14	33.73	55.98	10.29
24	0.41	0.70	0.21	1.32	30.96	52.89	16.15
27	2.02	1.87	0.14	4.02	50.18	46.45	3.37
30	1.13	1.39	0.30	2.82	40.08	49.12	10.79
33	1.20	1.47	1.56	4.24	28.45	34.64	36.91
<i>A.oryzae</i> 2095	Propiónico g/L	Acético g/L	Butírico g/L	Total AGV's g/L	% Propiónico	% Acético	% Butírico
0	0.42	0.46	0.02	0.90	46.87	50.74	2.38
3	0.45	0.49	0.05	0.99	45.91	49.49	4.60
6	0.40	0.54	0.04	0.97	40.98	55.40	3.62
9	0.70	0.50	0.03	1.23	56.80	40.55	2.65
12	0.59	0.68	0.02	1.29	45.57	52.76	1.67
15	0.68	0.90	0.05	1.63	42.11	55.10	2.79
18	0.72	0.99	0.04	1.75	41.24	56.32	2.44
21	0.65	1.56	0.05	2.26	28.82	69.07	2.11
24	0.59	1.79	0.09	2.46	23.96	72.56	3.48
27	0.52	2.45	0.08	3.05	17.10	80.43	2.47
30	0.74	2.24	0.10	3.08	23.92	72.84	3.24
33	0.99	1.90	0.10	2.98	33.10	63.55	3.35

Porcentajes de ácidos grasos volátiles a diferentes horas de cultivos de probióticos comerciales, productos de fermentación sólida y testigos.

<i>R.nigricans</i>	Propiónico g/L	Acético g/L	Butírico g/L	Total AGV's g/L	% Propiónico	% Acético	% Butírico
0	0.42	0.63	0.02	1.07	39.48	58.32	2.20
3	0.22	0.52	0.02	0.76	28.29	68.62	3.09
6	0.33	0.60	0.04	0.96	33.91	62.42	3.67
9	0.37	0.69	0.02	1.08	33.94	64.07	1.99
12	0.49	0.78	0.04	1.30	37.35	59.87	2.78
15	0.52	0.80	0.02	1.34	39.03	59.38	1.60
18	0.33	1.00	0.04	1.36	23.96	73.44	2.59
21	0.32	1.22	0.03	1.57	20.49	77.46	2.05
24	0.59	1.52	0.03	2.14	27.49	70.96	1.55
27	0.69	1.39	0.02	2.10	32.82	66.16	1.02
30	0.99	1.33	0.05	2.37	41.57	56.26	2.16
33	0.73	1.53	0.05	2.31	31.64	66.23	2.12
<i>P.roquefortii</i>	Propiónico g/L	Acético g/L	Butírico g/L	Total AGV's g/L	% Propiónico	% Acético	% Butírico
0	0.41	0.69	0.02	1.13	36.71	61.20	2.09
3	0.40	0.70	0.02	1.12	35.93	62.14	1.92
6	0.41	0.80	0.02	1.23	33.50	64.59	1.91
9	0.59	0.82	0.03	1.44	40.99	56.92	2.09
12	0.63	0.74	0.02	1.39	45.14	53.31	1.55
15	0.60	0.90	0.03	1.52	39.30	58.80	1.90
18	0.79	0.75	0.04	1.58	50.22	47.54	2.24
21	0.90	0.99	0.04	1.92	46.54	51.24	2.21
24	0.99	1.25	0.06	2.29	43.03	54.39	2.57
27	0.98	1.15	0.04	2.17	44.95	53.10	1.94
30	1.22	1.58	0.07	2.87	42.38	55.23	2.39
33	1.11	1.49	0.06	2.65	41.87	56.01	2.12

ANEXO1

Porcentajes de ácidos grasos volátiles a diferentes horas de cultivos de probióticos comerciales, productos de fermentación sólida y testigos.

<i>S.castelli</i>	Propiónico g/L	Acético g/L	Butírico g/L	Total AGV's g/L	% Propiónico	% Acético	% Butírico
0	0.31	0.49	0.02	0.83	50.12	83.56	2.86
3	0.33	0.50	0.03	0.86	46.94	81.17	2.51
6	0.45	0.58	0.01	1.05	39.26	75.70	2.24
9	4.35	0.52	0.02	4.90	12.04	16.72	0.61
12	0.33	0.62	0.02	0.97	64.71	76.42	2.22
15	0.46	0.69	0.02	1.17	51.16	76.56	2.47
18	0.54	0.75	0.02	1.31	60.65	57.41	2.71
21	0.69	0.69	0.02	1.40	64.12	70.59	3.05
24	0.96	0.99	0.03	1.98	49.74	62.87	2.98
27	1.20	1.21	0.03	2.45	39.87	47.10	1.72
30	1.12	1.42	0.03	2.58	47.12	61.40	2.66
33	1.00	1.52	0.04	2.56	43.43	58.11	2.20
<i>K. marxianus</i>	Propiónico g/L	Acético g/L	Butírico g/L	Total AGV's g/L	% Propiónico	% Acético	% Butírico
0	0.13	0.31	0.01	0.45	27.85	69.38	2.76
3	0.22	0.32	0.01	0.55	39.19	58.53	2.28
6	0.14	0.30	0.02	0.46	30.19	64.46	5.34
9	0.20	0.30	0.04	0.53	37.25	56.01	6.73
12	0.15	0.31	0.03	0.49	30.32	63.77	5.91
15	0.18	0.31	0.02	0.52	35.72	60.43	3.84
18	0.21	0.33	0.02	0.56	38.13	58.06	3.81
21	0.23	0.49	0.02	0.74	31.47	65.82	2.71
24	0.35	0.46	0.04	0.85	41.58	53.87	4.55
27	0.32	0.57	0.03	0.92	34.85	61.66	3.48
30	0.33	0.58	0.04	0.95	35.00	61.24	3.76
33	0.41	0.63	0.03	1.07	38.41	58.81	2.78

ANEXO1

Porcentajes de ácidos grasos volátiles a diferentes horas de cultivos de probióticos comerciales, productos de fermentación sólida y testigos.

Agua	Propiónico g/L	Acético g/L	Butírico g/L	Total AGV's g/L	% Propiónico	% Acético	% Butírico
0	0.46	0.50	0.02	0.98	46.94	50.69	2.37
3	0.42	0.51	0.02	0.95	44.17	53.69	2.13
6	0.46	0.48	0.03	0.97	47.50	49.18	3.32
9	0.59	0.52	0.04	1.15	51.27	45.34	3.39
12	0.57	0.68	0.04	1.29	44.09	53.01	2.90
15	0.69	0.70	0.03	1.41	48.74	49.15	2.11
18	0.99	0.85	0.03	1.86	52.93	45.39	1.68
21	1.12	0.95	0.03	2.10	53.34	45.43	1.24
24	1.22	1.00	0.02	2.24	54.37	44.66	0.97
27	1.26	1.12	0.03	2.41	52.24	46.46	1.30
30	1.37	1.35	0.04	2.75	49.60	49.12	1.28
33	1.12	1.02	0.03	2.17	51.52	47.00	1.48
Lacto-sacc	Propiónico g/L	Acético g/L	Butírico g/L	Total AGV's g/L	% Propiónico	% Acético	% Butírico
0	0.42	0.27	0.08	0.78	54.76	34.70	10.54
3	0.44	0.58	0.07	1.08	40.57	53.33	6.10
6	0.45	0.43	0.06	0.94	48.48	45.63	5.90
9	0.43	0.65	0.40	1.48	29.18	43.84	26.98
12	0.74	0.62	0.09	1.45	51.22	42.67	6.11
15	0.46	0.81	0.14	1.41	32.76	57.42	9.82
18	0.52	0.64	0.06	1.23	42.65	52.17	5.18
21	0.39	0.78	0.11	1.28	30.55	61.23	8.23
24	0.46	0.99	0.12	1.56	29.32	63.11	7.57
27	0.92	0.83	0.11	1.86	49.39	44.56	6.05
30	0.75	1.10	0.93	2.78	26.80	39.69	33.51
33	0.88	1.05	0.84	2.77	31.84	37.78	30.38

Porcentajes de ácidos grasos volátiles a diferentes horas de cultivos de probióticos comerciales, productos de fermentación sólida y testigos.

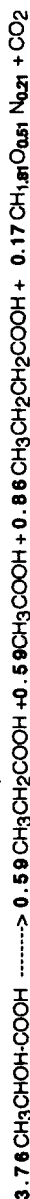
Yea-sacc 1026	Propiónico g/L	Acético g/L	Butírico g/L	Total AGV's g/L	% Propiónico	% Acético	% Butírico
0	0.46	0.06	0.01	0.53	86.39	11.28	2.32
3	0.49	0.56	0.01	1.06	45.91	52.94	1.15
6	0.52	0.07	0.02	0.61	85.11	11.40	3.49
9	0.54	0.91	0.02	1.47	36.72	61.93	1.35
12	0.63	0.90	0.02	1.54	40.97	58.05	0.98
15	0.76	1.12	0.02	1.90	39.98	59.21	0.80
18	0.71	1.33	0.06	2.10	33.91	63.13	2.96
21	0.62	1.10	0.06	1.78	34.91	61.79	3.29
24	0.62	1.16	0.05	1.84	33.93	63.11	2.95
27	0.60	1.22	0.05	1.87	32.02	65.38	2.60
30	0.69	0.96	0.06	1.70	40.54	56.22	3.25
33	0.58	1.00	0.06	1.64	35.60	60.90	3.50
Yea-sacc 8417	Propiónico g/L	Acético g/L	Butírico g/L	Total AGV's g/L	% Propiónico	% Acético	% Butírico
0	0.07	0.05	0.03	0.15	46.00	32.63	21.36
3	0.06	0.04	0.03	0.13	47.75	31.43	20.82
6	0.08	0.05	0.04	0.16	48.86	29.28	21.86
9	0.07	0.07	0.03	0.17	43.09	39.80	17.11
12	0.13	0.28	0.05	0.46	27.58	61.36	11.06
15	0.30	0.66	0.08	1.03	28.74	63.58	7.69
18	0.88	2.29	0.08	3.25	27.19	70.45	2.36
21	4.47	3.39	0.28	8.14	54.93	41.61	3.46
24	4.45	3.53	1.09	9.07	49.05	38.96	11.99
27	4.25	3.11	1.28	8.64	49.17	35.98	14.85
30	3.78	3.60	1.13	8.51	44.38	42.29	13.33
33	4.15	3.46	1.32	8.93	46.47	38.79	14.73

ANEXO1

Porcentajes de ácidos grasos volátiles a diferentes horas de cultivos de probióticos comerciales, productos de fermentación sólida y testigos.

Pasta copra S/FS	Propiónico g/L	Acético g/L	Butírico g/L	Total AGV's g/L	% Propiónico	% Acético	% Butírico
0	0.52	0.52	0.01	1.05	49.42	49.43	1.15
3	0.53	0.57	0.01	1.11	47.95	50.95	1.10
6	0.63	0.59	0.02	1.25	50.58	47.57	1.86
9	0.52	0.56	0.02	1.10	47.25	50.95	1.80
12	0.55	0.69	0.02	1.27	43.44	54.87	1.70
15	0.56	0.63	0.02	1.21	46.52	51.82	1.65
18	0.53	0.59	0.02	1.15	46.42	51.70	1.88
21	0.69	0.56	0.02	1.27	54.06	44.12	1.82
24	0.62	0.57	0.02	1.22	51.02	47.22	1.76
27	0.53	0.70	0.02	1.25	42.54	55.60	1.85
30	0.59	0.71	0.02	1.33	44.73	53.66	1.62
33	0.56	0.83	0.02	1.41	39.91	58.56	1.53

Anexo 2 Cálculos para el balance de carbono de los productos de fermentación obtenidos a partir de la adición de productos de FS, probióticos comerciales o testigos.



ACIDO LACTICO		ACIDO PROPIONICO		ACIDO ACETICO		ACIDO BUTIRICO		BIOMASA	
3C	12 ³ =36	3C	12 ³ =36	2C	12 ² =24	4C	12 ⁴ =48	1C	12
6H	6	6H	6	4H	4	8H	8	1H	12
2O	16 ³ =48	2O	16 ³ =32	2O	16 ² =32	2O	16 ² =32	10	20
								1N	14 ¹⁰ =140
									21
TOTAL	90 g/mol	74g/mol	80g/mol	88g/mol	24.91 g/mol	44 g/mol			

Fracción de carbono por molécula:

ácido láctico	Propiónico	Acético	Butírico	Biomasa	CO ₂
FC= 0.4	FC= 0.49	FC= 0.40	FC= 0.55	FC= 0.48	FC= 0.27

Cálculos:

Ejemplo para ácido láctico $90\text{g} \times \frac{1\text{mol}}{36\text{g}} = 2.5\text{mol}$ $X = 0.4$

Obtención de g de carbono:

Ejemplo para ácido láctico $0.4 \times 9.4 \text{ (g de ácido láctico al inicio del cultivo ó g de producto)} = 3.76 \text{ g de C de ácido láctico}$

Balance de carbono:

$$3.76\text{ g C ác. láctico} \longrightarrow 0.59\text{ g C Propiónico} + 0.59\text{ g C Acético} + 0.86\text{ g C Butírico} + 0.17\text{ g C Biomasa} + 0.27\text{ g C de CO}_2$$

$$3.76\text{ g C ác. láctico} = 2.45\text{ g C de Producto}$$

Porcentaje de eficiencia de producción

$$\frac{3.76}{2.45} \times 100\% = 155.1\%$$

GRAMOS DE SUSTRATO Y DE PRODUCTO					FRACCION DE CARBONO DE SUSTRATO Y DE PRO DUCTO						
Cultivo c/aditivos	g láctico	g Propiónico	g Acético	g Butírico	g Biomasa	FC Láctico	FC Propiónico	FC Acético	FC Butírico	FC Biomasa	FC CO ₂
<i>A. oryzae</i> 2094	9.4	1.2	1.5	1.6	0.4	0.4	0.49	0.40	0.55	0.48	0.27
<i>A. oryzae</i> 2095	9.6	1.0	1.9	0.1	0.5	0.4	0.49	0.40	0.55	0.48	0.27
<i>R. nigricans</i>	9.5	0.7	1.5	0.1	0.3	0.4	0.49	0.40	0.55	0.48	0.27
<i>P. roquefortii</i>	9.7	1.1	1.5	0.1	0.4	0.4	0.49	0.40	0.55	0.48	0.27
<i>S. castellii</i>	9.6	1.0	1.5	0.0	0.4	0.4	0.49	0.40	0.55	0.48	0.27
<i>K. marianus</i>	9.8	0.4	0.6	0.0	0.1	0.4	0.49	0.40	0.55	0.48	0.27
AGUA	9.8	1.1	1.0	0.0	0.2	0.4	0.49	0.40	0.55	0.48	0.27
LACTOSACC	9.4	0.9	1.1	0.8	0.5	0.4	0.49	0.40	0.55	0.48	0.27
Y. 1026	9.6	0.6	1.0	0.1	0.4	0.4	0.49	0.40	0.55	0.48	0.27
Y.8417	9.5	4.2	3.5	1.3	0.6	0.4	0.49	0.40	0.55	0.48	0.27
PC/S FERM	9.8	0.6	0.8	0.0	0.5	0.4	0.49	0.40	0.55	0.48	0.27

BALANCE DE CARBONO									
	g-C láctico	g-C Prop	g-C Ace	g- C Buti	g-C Biomasa	g-C CO ₂	SUMA	Porcentaje Recuperado	
A. oryzae 2094	3.76	0.59	0.59	0.86	0.17	0.24	2.44	65	
A. oryzae2095	3.84	0.49	0.76	0.06	0.25	0.24	1.79	47	
R. nigricans	3.80	0.36	0.61	0.03	0.13	0.24	1.37	36	
P. roquefortii	3.88	0.54	0.60	0.03	0.18	0.24	1.59	41	
S. castellii	3.84	0.49	0.61	0.02	0.18	0.24	1.54	40	
K. marxianus	3.92	0.20	0.25	0.02	0.06	0.24	0.76	20	
AGUA	3.92	0.55	0.41	0.02	0.10	0.24	1.31	33	
LACTOSACC	3.76	0.43	0.42	0.46	0.23	0.24	1.78	47	
Y. 1026	3.84	0.28	0.40	0.03	0.18	0.24	1.14	30	
Y.8417	3.80	2.03	1.38	0.73	0.26	0.24	4.65	122	
PC/S FERM	3.92	0.27	0.33	0.01	0.26	0.24	1.11	28	

NOTA: Los valores de producto reportados en las tablas son al final del cultivo.

Porcentajes de ácidos grasos volátiles de los diferentes extractos obtenidos del producto de FS
(*Penicillium roquefortii*).

Extracto acuoso	Acético g/L	Propiónico g/L	Butírico g/L	Total AGV's g/L	% Acético	% Propiónico	% Butírico
0	1.6	1.3	0	3.0	54.7	45.3	0
4	3.0	1.7	0	4.7	63.5	36.5	0
12	3.0	2.0	0	5.0	59.6	40.4	0
16	2.5	1.6	0	4.1	60.3	39.7	0
20	2.9	1.7	0	4.6	63.8	36.2	0
24	2.3	1.6	0	3.8	59.2	40.8	0
40	2.9	1.5	0	4.5	65.6	34.4	0
Liofilizado	Acético g/L	Propiónico g/L	Butírico g/L	Total AGV's g/L	% Acético	% Propiónico	% Butírico
0	1.2	0.2	0	1.4	84.8	15.2	0
4	1.9	0.3	0	2.2	87.5	12.5	0
12	2.0	1.2	0	3.2	61.3	38.7	0
16	2.1	1.6	0	3.7	56.6	43.4	0
20	1.9	1.6	0	3.5	54.4	45.6	0
24	2.8	1.6	0	4.4	62.7	37.3	0
40	2.1	1.5	0	3.6	59.2	40.8	0
Extracto etanólico	Acético g/L	Propiónico g/L	Butírico g/L	Total AGV's g/L	% Acético	% Propiónico	% Butírico
0	0.9	0.2	0	1.1	85.9	14.1	0
4	1.2	0.2	0	1.4	87.1	12.9	0
12	1.6	0.3	0	1.9	84.0	16.0	0
16	1.7	0.6	0	2.3	73.7	26.3	0
20	1.4	1.6	0	3.0	47.7	52.3	0
24	2.9	2.2	0	5.1	57.4	42.6	0
40	2.2	1.6	0	3.7	57.9	42.1	0

ANEXO 3

Porcentajes de ácidos grasos volátiles de los diferentes extractos obtenidos del producto de FS (*Penicillium roqueforti*).

Acetato Etilo	Acético g/L	Propiónico g/L	Butírico g/L	Total AGV's g/L	% Acético	% Propiónico	% Butírico
0	1.3	0.2	0	1.5	88.3	11.7	0
4	1.6	0.3	0	1.9	85.0	15.0	0
12	1.9	0.2	0	2.1	89.0	11.0	0
16	1.5	0.2	0	1.7	89.6	10.4	0
20	1.4	0.2	0	1.6	88.1	11.9	0
24	1.5	0.2	0	1.7	91.0	9.0	0
40	2.5	1.4	0	3.9	64.4	35.6	0
Liofilizado a 75 °C	Acético g/L	Propiónico g/L	Butírico g/L	Total AGV's g/L	% Acético	% Propiónico	% Butírico
0	0.2	1.0	0.5	1.6	9.2	63.5	27.4
4	1.6	1.2	0.4	3.1	49.7	36.7	13.6
12	1.4	1.4	0.6	3.4	40.8	42.0	17.2
16	2.2	1.3	0.4	3.9	56.3	34.2	9.5
20	2.6	1.5	0.1	4.3	61.6	35.5	2.9
24	3.8	1.7	0.1	5.7	67.7	30.6	1.7
40	2.3	1.5	0.0	3.9	60.0	38.9	1.1

GRAMOS DE SUSTRATO O PRODUCTO				
Extractos	g Láctico	g Acético	g Propiónico	g Butírico
ACUOSO	7.2	2.9	1.5	0
LIOFILIZADO	7	2.1	1.5	0
ETANOLICO	7.4	2.2	1.6	0
ACETATO	7.1	2.5	1.4	0
LIOFILIZADO	7.2	2.3	1.5	0

FRACCION DE CARBONO DE SUSTRATO O PRODUCTO					
FC Láctico	FC Propiónico	FC Acético	FC Butírico	FC Biomasa	FC CO ₂
0.4	0.49	0.40	0.55	0.48	0.27
0.4	0.49	0.40	0.55	0.48	0.27
0.4	0.49	0.40	0.55	0.48	0.27
0.4	0.49	0.40	0.55	0.48	0.27
0.4	0.49	0.40	0.55	0.48	0.27

BALANCE DE CARBONO								
	g-C Láctico	g-C Ace	g-C Prop	g- C Buti	g-C Biom	g-C CO2	SUMA	Porcentaje
ACUOSO	2.88	1.42	0.60	0.00	0.19	0.24	2.45	85
LIOFILIZADO	2.80	1.03	0.60	0.00	0.16	0.24	2.03	73
ETANOLICO	2.96	1.08	0.64	0.00	0.12	0.24	2.07	70
ACETATO	2.84	1.23	0.56	0.00	0.15	0.24	2.18	77
LO A 75 G	2.88	1.13	0.60	0.00	0.17	0.24	2.14	74

Nota: Los valores que se reportan en las tablas son al final del cultivo.