

Manzarina en la alimentación animal

Investigadores de la Facultad de Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua (UACH), a partir del año 2003, se han dado a la tarea de desarrollar una metodología para la obtención de un alimento proteico, producto de la fermentación de subproductos de manzana, al que se ha llamado «manzarina», que permita el aprovechamiento de dichos residuos en la alimentación animal, prevenir un problema de contaminación ambiental y brindar alternativas a los fruticultores y ganaderos para el aprovechamiento de los subproductos de la manzana. Este alimento proteico con propiedades nutraceuticas y polifenolicas para uso animal es un ingrediente importante en el desarrollo de la producción animal en el Estado de Chihuahua México, demostrando la factibilidad de aprovechar los recursos alimenticios de bajo costo y valor nutritivo, como son los subproductos de manzana a través de la fermentación en estado sólido (FES) para producir proteína unicelular y ser usada en la nutrición y alimentación animal.

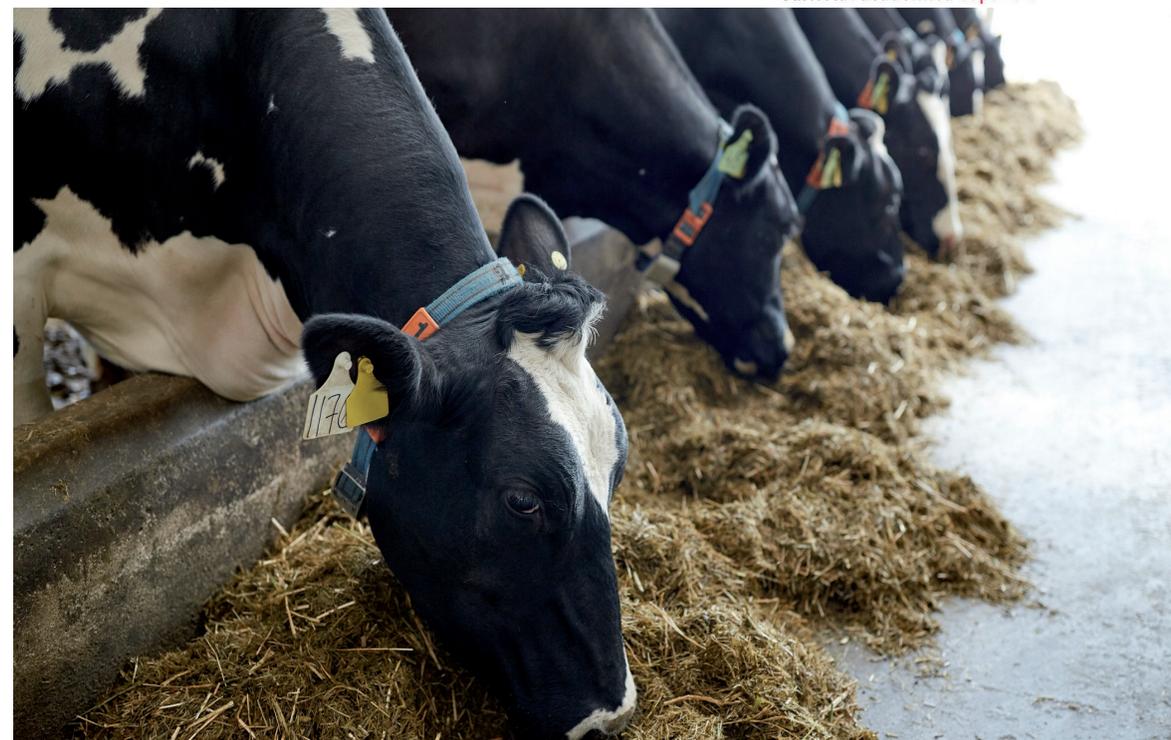
D. Ph. Daniel Díaz Plascencia. Catedrático e Investigador en Nutrición Animal, Facultad de Zootecnia y Ecología, Universidad Autónoma de Chihuahua. Perif. Fco. R. Almada Km 1 CP. 31453 Chihuahua, Chih., México.



978-3-639-53438-2

editorial académica española

Producción de proteína unicelular



Daniel Díaz Plascencia (Ed.) · Carlos Rodríguez M

Manzarina en la alimentación animal

Caracterización, evaluación y desarrollo biotecnológico de subproductos fermentados de manzana

Díaz Plascencia (Ed.), Rodríguez M

**Daniel Díaz Plascencia (Ed.)
Carlos Rodríguez M**

Manzarina en la alimentación animal

**Daniel Díaz Plascencia (Ed.)
Carlos Rodríguez M**

Manzarina en la alimentación animal

**Caracterización, evaluación y desarrollo
biotecnológico de subproductos fermentados de
manzana**

Editorial Académica Española

Impressum / Aviso legal

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek: Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Alle in diesem Buch genannten Marken und Produktnamen unterliegen warenzeichen-, marken- oder patentrechtlichem Schutz bzw. sind Warenzeichen oder eingetragene Warenzeichen der jeweiligen Inhaber. Die Wiedergabe von Marken, Produktnamen, Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen u.s.w. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutzgesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Información bibliográfica de la Deutsche Nationalbibliothek: La Deutsche Nationalbibliothek clasifica esta publicación en la Deutsche Nationalbibliografie; los datos bibliográficos detallados están disponibles en internet en <http://dnb.d-nb.de>.

Todos los nombres de marcas y nombres de productos mencionados en este libro están sujetos a la protección de marca comercial, marca registrada o patentes y son marcas comerciales o marcas comerciales registradas de sus respectivos propietarios. La reproducción en esta obra de nombres de marcas, nombres de productos, nombres comunes, nombres comerciales, descripciones de productos, etc., incluso sin una indicación particular, de ninguna manera debe interpretarse como que estos nombres pueden ser considerados sin limitaciones en materia de marcas y legislación de protección de marcas y, por lo tanto, ser utilizados por cualquier persona.

Coverbild / Imagen de portada: www.ingimage.com

Verlag / Editorial:

Editorial Académica Española

ist ein Imprint der / es una marca de

OmniScriptum GmbH & Co. KG

Bahnhofstraße 28, 66111 Saarbrücken, Deutschland / Alemania

Email / Correo Electrónico: info@omniscryptum.com

Herstellung: siehe letzte Seite /

Publicado en: consulte la última página

ISBN: 978-3-639-53438-2

Copyright / Propiedad literaria & cop Carlos Rodríguez M

Copyright / Propiedad literaria © 2017 OmniScriptum GmbH & Co. KG

Alle Rechte vorbehalten. / Todos los derechos reservados. Saarbrücken 2017

Manzarina en la Alimentación Animal

**Caracterización, Evaluación y Desarrollo Biotecnológico de
Subproductos Fermentados de Manzana**

Producción de Proteína Unicelular

RESUMEN GENERAL

Debido a la sequía que se ha presentado en los últimos años en gran parte del país mexicano, los sistemas ganaderos del Estado de Chihuahua presentan una gran escasez de forraje o en su caso de baja calidad de los mismos que no permiten un buen comportamiento productivo de los animales. Al mismo tiempo, el precio actual que han alcanzado las materias primas para la elaboración de concentrados necesarios para el sostenimiento de estas actividades, surge la necesidad de buscar alternativas económicamente viables y rentables para alimentar a los animales, buscando con ello mejorar su productividad y evitar que compitan con la alimentación humana, y que además constituyan fuentes naturales y seguras para la salud humana y la de los propios animales. Ante este panorama descrito se desarrolló toda una metodología para producir "*manzarina*" nombre que se le dio al producto fermentado, utilizando bagazo y manzana de desecho y que aplica también estos mismos principios para otros tipos de subproductos de frutas presentes en nuestro país, y que desafortunadamente no han sido utilizadas adecuadamente. Este paquete tecnológico esta compuesto por 11 trabajos científicos que representan el esfuerzo y la dedicación de muchas horas de trabajo y esfuerzo, por lo que es de gran satisfacción contribuir ante una necesidad de buscar fuentes alternas para alimentar a la ganadería aún bajo costo, de manera responsable y amigable con el medio ambiente, todo lo anterior se realizó con los objetivos de evaluar las características nutritivas de la manzarina y del proceso de obtención de esta, cuando se produce a partir de bagazo de manzana (BM), de manzana de desecho (MD) o de sus combinaciones, esto bajo el supuesto de que la manzarina obtenida a partir de MD puede ser mejor que la que se obtiene a partir de BM. Evaluar la producción de levaduras, los cambios en la concentración de carbohidratos estructurales y la pérdida de materia seca durante el proceso de obtención de manzarina a partir de BM como principal componente del sustrato y evaluar el efecto de la

adición de MD en sustitución parcial del BM sobre las variables mencionadas. Evaluar el efecto del uso de la manzarina en una dieta para borregos en engorda, ganado lechero, ganado de carne, la actividad antioxidante en plasma (AA), parámetros sanguíneos y sobre el desarrollo del epitelio ruminal, ya que este producto fermentado posee la propiedad de influir dichas variables. Los resultados obtenidos de estas investigaciones serán de utilidad para productores, profesionales del área e investigadores interesados en conocer la importancia de los microorganismos presentes en la manzana de desecho de forma natural en esos subproductos. Este paquete tecnológico como alimento nutraceutico para consumo animal, está llamada a constituir un elemento importante en el desarrollo de la producción animal en el Estado de Chihuahua, demostrando la factibilidad de aprovechar los recursos alimenticios de bajo valor nutritivo, como son los subproductos de manzana a través de la fermentación en estado sólido.

CONTENIDO

	Página
ÍNDICE GENERAL.....	2
LISTA DE CUADROS.....	11
LISTA DE FIGURAS.....	14
INTRODUCCIÓN.....	15
REVISIÓN DE LITERATURA.....	17
Subproductos Agroindustriales.....	17
El Bagazo de Manzana en la Alimentación del Ganado.....	18
Fermentación de Subproductos para Alimento Animal.....	19
Factores de Crecimiento Microbiano.....	22
Competencia por sustrato.....	22
Metabolismo de azúcares.....	22
Cinética microbiana.....	25
Fuente de carbono y relación carbono/nitrógeno (C/N).....	25
Relación C/N.....	26
Temperatura.....	26
Humedad.....	26
Potencial de iones hidrógeno (pH).....	26
Aireación y agitación.....	27
Tamaño de partícula.....	27
Necesidades de Azufre (S).....	27
Relación Nitrógeno: Azufre (N: S).....	28
Requerimientos de Magnesio.....	28
Requerimientos de Potasio.....	28
Vitaminas y Elementos Traza.....	29
Uso de la Urea en la Alimentación Animal.....	29
Naturaleza de la Proteína Microbial.....	30
Valor Nutricional de la Proteína Microbial.....	32

	Página
Importancia de la Proteína Microbial.....	33
Composición de la Proteína Microbial.....	34
Importancia del Contenido de Polifenoles en la Manzana.....	34
Los polifenoles.....	34
Propiedades de los polifenoles.....	36
Definición de oxidantes y su rol en el metabolismo.....	37
Contenido de polifenoles en la manzana.....	39
Efectos del consumo de manzana sobre la salud.....	40
Elementos Celulares Sanguíneos.....	40
Desarrollo del Epitelio Estratificado del Rumen.....	41
CAPITULO 1. PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA MICROBIANA MEDIANTE LA FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO A PARTIR DE MANZANA DE DESECHO Agustín Becerra Bernal (†)	44
RESUMEN.....	45
MATERIALES Y MÉTODOS.....	46
Localización del Área de Estudio.....	46
Metodología del Trabajo.....	46
Tratamientos.....	46
Variables Evaluadas.....	48
Análisis Estadístico del Experimento.....	48
Diseño Experimental.....	48
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	49
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	51
CAPITULO 2. NIVELES DE UREA Y MAÍZ MOLIDO EN LA FERMENTACIÓN AERÓBICA DE MANZANA DE DESECHO Agustín Becerra Bernal (†)	52
RESUMEN.....	53
MATERIALES Y MÉTODOS.....	55

	Página
Localización del Área de Estudio.....	55
Metodología del trabajo.....	55
Tratamientos.....	55
Variables Evaluadas.....	57
Análisis Estadístico del Experimento.....	57
Diseño Experimental.....	57
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	58
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	62
CAPITULO 3. NIVELES DE UREA Y MAÍZ MOLIDO EN LA FERMENTACIÓN DE BAGAZO DE MANZANA PARA LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA MICROBIANA Agustín Becerra Bernal (†)	63
RESUMEN.....	64
MATERIALES Y MÉTODOS.....	66
Localización del Área de Estudio.....	66
Metodología del Trabajo.....	66
Tratamientos.....	66
Variables Evaluadas.....	66
Análisis Estadístico del Experimento.....	68
Diseño Experimental.....	68
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	69
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	74
CAPITULO 4. TIEMPO DE UTILIZACIÓN Y NIVEL DE MAÍZ MOLIDO EN LA FERMENTACIÓN DE BAGAZO DE MANZANA PARA LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA MICROBIANA Agustín Becerra Bernal (†)	75
RESUMEN.....	76
MATERIALES Y MÉTODOS.....	77
Localización del Área de Estudio.....	77

	Página
Metodología del Trabajo.....	77
Tratamientos.....	77
VARIABLES EVALUADAS.....	77
Análisis Estadístico del Experimento.....	79
Diseño Experimental.....	79
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	80
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	85
CAPITULO 5. PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA MICROBIANA A PARTIR DE MANZANA DE DESECHO ADICIONADA CON UREA Y PASTA DE SOYA	86
<i>Daniel Díaz Plascencia</i>	
RESUMEN.....	87
MATERIALES Y MÉTODOS.....	89
Localización del Área de Estudio.....	89
Trabajo Experimental y Tratamientos.....	89
Material y Equipo Experimental.....	93
Metodología del trabajo.....	93
Muestreo.....	93
Variables Evaluadas.....	94
Análisis Estadístico.....	95
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	96
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	105
CAPITULO 6. CONTEO DE CÉLULAS SOMÁTICAS EN LECHE, ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL PLASMA Y COMPONENTES CELULARES SANGUÍNEOS DE VACAS HOLSTEIN EN PRODUCCIÓN	106
<i>Mario Alejandro Gallegos Acevedo</i>	
RESUMEN.....	107
MATERIALES Y MÉTODOS.....	108
Descripción del Área de Estudio.....	108
Descripción de la Población.....	108

	Página
Distribución de las Vacas en los Grupos de Trabajo.....	108
Duración de Periodos de Adaptación, Alimentación y Muestreo.....	108
Composición de las dietas.....	109
Adaptación.....	109
Tratamientos.....	113
Variables Evaluadas.....	113
Toma y Análisis de Muestras.....	113
Leche.....	113
Sangre.....	113
Determinación de Actividad Antioxidante.....	114
Preparación de estándar y curva de calibración	114
Preparación de Muestras.....	115
Análisis Estadístico.....	115
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	116
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	126
CAPITULO 7. EFECTO DE LA MANZARINA SOBRE LOS COMPONENTES FISICOQUÍMICOS Y PRODUCCIÓN DE LECHE <i>Francisco Javier Gutiérrez Piña</i>	127
RESUMEN.....	128
MATERIALES Y MÉTODOS.....	129
Descripción del Área de Estudio.....	129
Descripción de la Población.....	129
Descripción de Tratamientos y Alimentación.....	129
Variables Evaluadas.....	133
Cuantificación de la Producción.....	134
Cuantificación Físicoquímicas.....	134
Cuantificación de Consumo Total.....	134
Cuantificación de Cambio Peso Corporal.....	135
Análisis Estadístico.....	135

	Página
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	138
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	147
 CAPITULO 8. COMPORTAMIENTO PRODUCTIVO Y CARACTERÍSTICAS DE LA CANAL DE OVINOS ENGORDADOS CON Y SIN MANZARINA Camilo Hernández Gómez	148
RESUMEN.....	149
MATERIALES Y MÉTODOS.....	151
Descripción del Área de Estudio.....	151
Elaboración de Manzarina.....	151
Cinética de Fermentación.....	151
Prueba de Alimentación.....	153
Descripción de la población.....	153
Descripción de las dietas utilizadas.....	154
Alimentación de los animales.....	154
Variables Evaluadas en la Cinética de Fermentación.....	154
Análisis Estadístico.....	158
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	159
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	169
 CAPITULO 9. DINÁMICA DE LA FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO DE SUBPRODUCTOS DE MANZARINA PARA LA OBTENCIÓN DE MANZARINA Héctor Esteban Rodríguez Ramírez	170
RESUMEN.....	171
MATERIALES Y MÉTODOS.....	173
Tratamientos.....	173
Condiciones de Fermentación.....	173
Variables Medidas.....	176
Análisis Estadístico.....	184

	Página
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	186
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	203
 CAPITULO 10. CONCENTRACIÓN DE CARBOHIDRATOS ESTRUCTURALES, LEVADURAS VIABLES TOTALES Y PÉRDIDA DE MATERIA SECA EN LA OBTENCIÓN DE MANZARINA A PARTIR DE BAGAJO DE MANZANA <i>Héctor Esteban Rodríguez Ramírez</i>	204
RESUMEN.....	205
MATERIALES Y MÉTODOS.....	207
Tratamientos.....	207
Condiciones de Fermentación.....	207
Variables Medidas.....	208
Análisis Estadístico.....	212
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	213
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	232
 CAPITULO 11. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN PLASMA, PARÁMETROS SANGUÍNEOS Y DESARROLLO DEL EPITELIO RUMINAL DE OVINOS ENGORDADOS CON UNA DIETA CON MANZARINA <i>Héctor Esteban Rodríguez Ramírez</i>	233
RESUMEN.....	234
MATERIALES Y MÉTODOS.....	236
Descripción de los Animales y Tratamientos.....	236
Análisis Estadístico.....	243
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	244
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	256
 FOTOGRAFÍAS.....	257
LITERATURA CITADA.....	260

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Análisis bromatológico de la caña de azúcar, manzana de desecho y bagazo de manzana.....	20
2	Diseño de tratamientos con manzana de desecho y niveles de rastrojo de maíz para producción de proteína microbiana por medio de fermentación en estado sólido.....	47
3	Diseño de tratamientos con manzana de desecho, niveles de urea y maíz molido para producción de proteína microbiana por medio de fermentación en estado sólido	56
4	Formulación de manzarina con manzana de desecho.....	61
5	Diseño de tratamientos con bagazo de manzana, niveles de urea y maíz molido para producción de proteína microbiana por medio de fermentación en estado sólido.....	67
6	Respuesta del nivel de urea sobre la DIMO, FDA y DO en la preparación de manzarina BM durante la FES.....	72
7	Diseño de tratamientos con bagazo de manzana, tiempo de preparación y maíz molido para producción de proteína microbiana por medio de fermentación en estado sólido.....	78
8	Composición recomendada de la mezcla para producción de manzarina BM.....	84
9	Composición de la mezcla mineral ganatec 25.....	90
10	Composición de cada uno de los tratamientos del experimento I.....	91
11	Composición de cada uno de los tratamientos del experimento II.....	92
12	Medias de proteína cruda \pm error estándar de manzana de desecho fermentada a 36 °C con dos niveles de urea y dos de pasta de soya a 240 h de fermentación.....	98
13	Medias de proteína verdadera \pm error estándar de manzana de desecho fermentada a 36 °C con dos niveles de urea y dos de pasta de soya a 240 h de fermentación.....	99
14	Medias de proteína cruda \pm error estándar de manzana de desecho fermentada a 28 °C con dos niveles de urea y dos de pasta de soya a 240 h de fermentación.....	102
15	Dietas utilizadas en el experimento.....	110

Cuadro	Página
16	Análisis calculado de las dietas utilizadas en el experimento..... 111
17	Relación forraje concentrado..... 112
18	Medias (\pm error estándar) por tratamientos y periodos de conteos de células somáticas en leche..... 117
19	Valores de referencia de biometría hemática para hembras bovinas en producción... 119
20	Medias (\pm error estándar) de tratamientos de biometría hemática para hembras bovinas en producción..... 120
21	Medias (\pm error estándar) de periodos de biometría hemática para hembras bovinas en producción..... 122
22	Medias (\pm error estándar) de la determinación de actividad antioxidante de los muestreos de cada tratamiento..... 124
23	Medias (\pm error estándar) de periodos de biometría hemática para hembras bovinas en producción..... 125
24	Ccontenido de ingredientes de las dietas utilizadas en el experimento..... 130
25	Análisis calculado de las dietas utilizadas en el experimento..... 131
26	Dietas integrales proporcionadas a las vacas..... 132
27	Dietas totales ofrecidas por tratamiento..... 136
28	Cambio de peso corporal durante tratamientos..... 137
29	Medias \pm error estándar de las variables fisico- químicas y producción lactea por tratamiento..... 139
30	Media \pm error estándar de las variables fisico- químicas y producción láctea por período..... 140
31	Pproducción de leche por vaca en kg con y sin manzarina..... 145
32	Composición de las dietas utilizadas en la alimentación de los ovinos..... 152
33	Medias del volumen de producción en ml de gas (\pm EE) de dietas con y sin manzarina a diferentes tiempos de incubación usando el modelo de groot..... 160

Cuadro		Página
34	Medias de producción de amoníaco (mmol NH ₃ /l) (±EE) en dietas con y sin manzarina a diferentes tiempos de incubación <i>in vitro</i>	162
35	Medias de los cuadrados mínimos (±EE) del comportamiento productivo de ovinos alimentados con y sin manzarina.....	164
36	Medias de los cuadrados mínimos ± error estándar de las características de la canal de ovinos alimentados con y sin manzarina.....	167
37	Diseño de tratamientos.....	174
38	Algunos nutrientes del bagazo de manzana (BM) y de la manzana (M)* y su pH.....	175
39	Características nutritivas de la manzarina (muestras d6; media±error estándar).....	198
40	Parámetros obtenidos de la fermentación ruminal <i>in vitro</i> de la manzarina (muestras d6; media±error estándar).....	200
41	Comportamiento de FDN y FDA en los dos tipos de sustrato durante su FES.....	225
42	Digestibilidad de la materia seca <i>in vitro</i> en los dos tipos de sustrato durante su FES.....	227
43	Parámetros de fermentación ruminal <i>in vitro</i> de las muestras evaluadas.....	230
44	Composición de las dietas utilizadas.....	237
45	Dimensiones de papilas ruminales (en milímetros).....	255

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Metabolismo en levaduras bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas.....	24

INTRODUCCIÓN

La fermentación en estado sólido (FES), es un proceso biotecnológico para preservar o desarrollar nuevos alimentos a partir de la utilización de varios materiales carbohidratos mediante el uso de microorganismos. Las levaduras son microorganismos unicelulares de crecimiento vegetativo que, dependiendo de la especie, pueden utilizar compuestos como las pentosas, metil pentosas, alcoholes de azúcar, ácidos orgánicos, polisacáridos e incluso compuestos como el i-inositol y casi todas las especies, con raras excepciones, utilizan iones de amonio para la síntesis de proteína (Miller, 1977).

Durante la FES de subproductos agroindustriales ricos en azúcares y celulósicos, la energía de esos carbohidratos y la urea como fuente de nitrógeno (N) son utilizados para el crecimiento de la microflora epífita de los subproductos, duplicándose la biomasa en 5.2 minutos, lo que hace posible obtener un incremento en la población de levaduras y bacterias principalmente, aún en la fase de secado, sin la utilización de inóculo en el sistema (Valiño *et al.*, 1992).

En los últimos años, ha cobrado gran importancia el enriquecimiento proteico de residuos agroindustriales y subproductos altos en celulosa como bagazo de caña, pulpa de remolacha, cascarilla de café y semillas y bagazo de manzana (BM) entre otros, mediante sistemas de FES con el objetivo de producir enzimas, etanol, proteína unicelular, champiñones, enzimas, ácidos orgánicos, aminoácidos, metabolitos secundarios biológicamente activos y otros productos para su uso industrial y alimenticio.

En México, estos subproductos han recibido muy poca atención, sin embargo, diversos autores en su uso directo han recomendado incluir en crianza y engorda de bovinos un 60% (Manterola *et al.*, 1998), 70% en la elaboración de bloques proteicos para suplementación en agostadero (Becerra, 1998) y 30% en vacas lecheras (Anrique y Dossow, 2003). Recientemente, se ha encontrado que los extractos de manzana previnieron daños exógenos en células gástricas epiteliales *in vitro* de humanos y en la

mucosa gástrica de ratas *in vivo* por un efecto asociado a la actividad antioxidante de compuestos fenólicos de la manzana como la catequina o ácido clorogénico (Graziani *et al.*, 2001).

A nivel mundial se producen aproximadamente 60 millones de toneladas de manzana al año en una superficie de 5.6 millones de hectáreas, siendo China el principal productor con más de 20 millones de toneladas, seguido de Estados Unidos de América con 5.0 millones. Estos países aportan el 45% de la producción mundial, mientras que México aporta 0.46 millones de toneladas al año; de este total en la región Noroeste del Estado de Chihuahua, México; se produjeron alrededor de 409,778 toneladas de manzana (SAGARPA, 2007) de este total, cerca de 145,000 toneladas se comercializaron como manzana de desecho (UNIFRUT, 2007). Este desecho, no apto para consumo humano, es utilizado en su mayoría en la industria de la extracción para la elaboración de jugo; proceso del cual se obtiene un residuo o subproducto conocido como bagazo de manzana o pomasa. Gran parte de este bagazo es utilizado inadecuadamente en la alimentación animal y el resto, junto con buena parte de manzana de desecho que se queda en la huerta sin utilización alguna, dan origen a un problema de contaminación del medio ambiente por su alta velocidad de putrefacción, con la consecuente pérdida de nutrientes y dinero para el productor. Se estima una producción de pomasa de aproximadamente 32,000 toneladas (UNIFRUT, 2007) la cual no es aprovechada, o en algunos casos, se sub utiliza en la alimentación animal.

Existen estudios sobre las características nutricionales del BM ensilado, así como de sus limitaciones, sin embargo, no se cuenta con información acerca de la producción de PM en BM a través de FES por medio de métodos convencionales. Este conocimiento permitirá un mejor aprovechamiento de los desechos de manzana en la alimentación animal y evitará en consecuencia problemas de contaminación generada por estos subproductos en la acidificación del suelo por la descomposición de la fruta o la eliminación del BM en los canales de agua.

REVISIÓN DE LITERATURA

Actualmente por efecto de la sequía, los sistemas ganaderos del Estado de Chihuahua presentan una gran escasez de forraje o en su caso baja calidad de los mismos que no permiten un buen comportamiento productivo de los animales. Al mismo tiempo, el precio actual que han alcanzado los ingredientes concentrados necesarios para el sostenimiento de estas actividades sugiere considerar el uso de fuentes no tradicionales.

Subproductos Agroindustriales

Debido al crecimiento acelerado de la agroindustria, especialmente aquella relacionada con las de frutas y hortalizas, constantemente se están generando cantidades considerables de subproductos y residuos con potencial para ser usados en dietas para rumiantes (Preston, 1986) y constituir una alternativa para cubrir, al menos parcialmente, las necesidades de alimentación animal, siempre y cuando esta práctica sea avalada mediante un estudio de la composición química y valor nutritivo de estos materiales (De Haro *et al.*, 2001). Castellanos (1986) clasificó a estos subproductos agroindustriales en tres grupos de acuerdo a su composición nutricional como ingredientes: Con alto contenido proteico y de baja digestibilidad como la pasta de cacao; bagazo de uva y granos de café. Con bajo contenido de proteína y baja digestibilidad (lignocelulósicos) que agrupa a las pajas, cascarillas, el BM; bagazo y bagacillo de la caña. Con bajo contenido de proteína y alta digestibilidad. Incluye básicamente a los subproductos de cítricos y henequén. Ferreiro (1983) mencionó que el BM presenta alto contenido de azúcares solubles, pectinas, es extremadamente pobre en calcio y fósforo, con las limitantes para su utilización es la baja digestibilidad (48%) y el riesgo que presente niveles elevados de insecticidas. Las fracciones más variadas del BM fresco son la materia seca (MS) que va del 14 al 26%, y la PC del 4 al 8%, de acuerdo a la variedad, estado de madurez y diferencias en el procesamiento (Hardy *et al.*, 1992).

Se considera al BM como una fuente de energía debido a su alto contenido de azúcares y pectinas (Manterola *et al.*, 1999) y debido a que su valor en energía digestible oscila entre 2.8 y 3.2 Mcal/Kg de MS (Gasa *et al.*, 1988), comparándosele con el ensilaje de maíz cuando se suplementa con NNP.

El Bagazo de Manzana en la Alimentación del Ganado

El uso de diversos subproductos agroindustriales en la alimentación del ganado en México es limitado debido en gran parte al desconocimiento de su valor nutritivo o a la falta de infraestructura en los predios ganaderos. Otras limitantes por la que estos subproductos no pueden ser aprovechados son la transportación y la producción en cierta época del año, lo cual hace difícil su empleo directo en corrales de engorda, por lo que se requiere desarrollar un sistema de almacenaje, tal es el caso de los subproductos de manzana los cuales deben considerarse como un recurso alimenticio (Castellanos, 1986).

Rumsey (1978) menciona que desde la década de los sesentas creció el interés respecto al uso de subproductos de manzana en dietas para rumiantes y monogástricos. Generalmente, se considera a los subproductos de manzana dentro de los residuos de bajo contenido proteico y de baja digestibilidad (Castellanos, 1986); sin embargo, una de las principales razones por la que se ha estudiado su empleo es que tiene un contenido similar del total de nutrientes digestibles (TND) al silo de maíz y es alto en extracto etéreo, pectinas y pentosanas, similar al contenido de ingredientes más comunes.

Fontenot *et al.*, (1977), reportan que la pomasa o bagazo de manzana suplementada con harinolina fue similar en contenido nutricional al valor del silo de maíz cuando se utilizó en dietas para vacas productoras de carne. (Manterota *et al.*, 1993), concluyen que el bagazo de manzana puede ser utilizando en niveles de 30% en base a materia seca, en raciones para becerros y novillos en los que se

pueden esperar ganancias de peso diarias de 0.9 a 1.2 Kg/a/d, debido a que este recurso presenta una elevada digestibilidad (82%), esto no coincide con lo reportado por Castellanos (1986).

Fermentación de Subproductos para Alimento Animal

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) ha sido reconocida como uno de los cultivos de mayor capacidad para transformar la energía solar en carbohidratos, principalmente como componente de la materia orgánica convertible en energía biológica para la vida en forma de trifosfato de adenosina (Muños *et al.*, 1991). Dentro de los subproductos de la caña de azúcar, se han realizado estudios de FES en el cogollo como ensilaje mediante la adición de urea y excretas de aves con excelentes resultados (Reddy y Prasad, 1982). Elías *et al.*, (1990) mencionan que la caña fermentada en un periodo de 24 horas con urea alcanzó valores en PC y PV de 11 a 16%, y 8.9 a 13.80 unidades, respectivamente, valores comparables al de los cereales. Aunque la caña de azúcar no pertenece a la misma familia de la manzana, aquella presenta cierta similitud en composición química con la manzana y el BM en cuanto algún parámetro principal (Cuadro 1).

Se puede decir de manera general que la manzana de desecho posee un elevado contenido de carbohidratos solubles y es deficiente en PC, lo que al igual que la caña de azúcar la hace factible de utilizar urea u otra forma de NNP para obtener síntesis de PM. Del mismo modo, la concentración de azúcares residuales en polvos de BM fermentado es suficiente para la producción de PM y ser utilizado como alimento animal (Joshi y Sandhu, 1996). Sturza *et al.*, (1997) utilizaron BM como biorecurso para enriquecimiento de proteína microbiana a través de FES por *Rhizopus*, después de 36 h de fermentación el contenido de proteína alcanzó 11 g /100 g de BM seco sin observarse esporulación.

CUADRO 1. ANÁLISIS BROMATOLÓGICO DE LA CAÑA DE AZÚCAR, MANZANA. DE DESECHO Y BAGAZO DE MANZANA.

Parámetros %	Caña de azúcar ¹	Manzana de desecho ²	Bagazo de manzana ²
MS	29.00	22.37	19.20
FDN	32.20	7.87	56.82
FDA	23.50	5.33	48.33
Hemicelulosa	14.80	2.34	5.69
Cont. Celular	61.80	92.13	43.18
C. solubles	16.60	83.04	29.73
Proteína cruda	2.60	2.18	5.93
Cenizas	3.62	3.11	1.83

¹Instituto de ciencia animal, la Habana Cuba (ICA),Adaptado de (Elias y Lescano, 1990).

² Facultad de Zootecnia, Universidad Autónoma de Chihuahua (UACH).

Por otro lado, se ha reportado que vacas preñadas alimentadas con BM suplementadas con NNP dieron nacimientos muertos o becerros débiles por efecto del incremento de amoníaco en sangre (Fontenot *et al.*, 1977), por lo tanto, el enriquecimiento de proteína a base de levaduras por FES es el mejor camino para mejorar estos subproductos para alimento animal. Los estudios en subproductos de la manzana como alimento animal han sido enfocados hacia la utilización del BM ofreciéndolo en forma de ensilaje (Anrique y Dossow, 2003) o en su uso directo con altos niveles de inclusión en dietas para ganado como fuente de energía con resultados satisfactorios (Manterola *et al.*, 1998). No obstante la producción de alimentos basados en la fermentación de productos de desecho del procesamiento como el BM es una opción atractiva debido al suministro de sustratos, precio insignificante, mínimo requerimiento de espacio (Shay y Wagner, 1985) y disponibilidad estacional (Hours *et al.*, 1988).

Se han realizado muchas investigaciones sobre la producción de etanol por FES de BM como único sustrato (Hang *et al.*, 1981; Gupta *et al.*, 1990; Ngadi y Correia, 1992) y proteína unicelular (Hang y Walter, 1989; Kennedy, 1994). Los resultados en investigaciones comerciales sobre utilización de BM encontraron que es una técnica conveniente para explotación comercial así como un método que tiene que pasar por rigurosas consideraciones económicas, como es el caso de la extracción de pectinas de BM, donde el proceso fue técnicamente factible, pero económicamente injustificable por la relación beneficio costo reducida (Kennedy, 1994). Por lo tanto, la utilización de BM se confía en un doble propósito en la fermentación concomitante de un alimento, que si bien en el proceso de FES por métodos rústicos la obtención de etanol no es posible, esta es compensada por el incremento de la PV y el mínimo de equipo requerido.

La utilización de BM por la tecnología de FES en la producción de etanol y alimento animal proteico es factible (Joshi y Sandhu, 1996) sin embargo, no se han reportado efectos en la alimentación de BM fermentado en animales, aunque los resultados sobre alimentación de proteínas unicelulares para animales han sido bastante alentadoras (Yacoub *et al.*, 1990), así como en el uso de Saccharina por FES evaluados en aves (Valdivie *et al.*, 1996; Valdivie *et al.*, 1997), en cerdos (Díaz *et al.*, 1992), en ganado de engorda (Fundora *et al.*, 1996) y en ganado lechero (Reyes *et al.*, 1993). Se ha observado que los componentes polisacáridos de la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* como glucosa y manosa, ha tenido beneficios en aves, debido a que tienen funciones inmuno-estimulantes y como colonizadoras de la mucosa intestinal que impiden la adhesión de bacterias patógenas, con resultados similares a los antibióticos promotores de crecimiento (Arce *et al.*, 2005).

Factores de Crecimiento Microbiano

Competencia por sustrato. Las bacterias son el factor principal de descomposición de levaduras (Bocourt *et al.*, 1988) y constituyen un factor de contaminación cuando su actividad se ve favorecida por un medio acuoso, lo que implica secar el material para poder conservar las levaduras durante largos periodos de tiempo (Bocourt *et al.*, 1990). En procesos fermentativos anaerobios se ha demostrado la desaparición de bacterias patógenas como *Escherichia coli* en doce días (Bocourt y Lon, 1975), así como con fermentación aerobia en solo 48 h, con alta presencia de lactobacilos que actúan como material depurador de *Escherichia coli* en el proceso cuando se ha utilizado maíz molido como sustrato fundamental (Bocourt *et al.*, 1998).

Metabolismo de azúcares. La FES es utilizada para describir el crecimiento microbial sobre materiales sólidos en residuos agrícolas como el BM, y ofrece la ventaja de fermentar materiales sólidos en su estado natural (Hesseltine, 1977). Los azúcares fermentables en el BM como glucosa y fructosa pueden ser convertidos en etanol utilizando levaduras (Hang *et al.*, 1981).

Las levaduras no pueden fermentar pentosas o azúcares de cinco carbonos, y en el caso de disacáridos, trisacáridos y polisacáridos estos son degradados por hidrólisis y enzimas hidrolíticas para su fermentación posterior. La fuente de N, puede ser orgánica o inorgánica debido a que todas las levaduras pueden utilizar el ión amonio para la síntesis de proteína, otras pueden absorber aminoácidos intactos en el medio y algunas tienen la capacidad de desaminar aminoácidos individuales (Miller, 1977). Valiño *et al.*, (1989) aislaron en Saccharina especies bacterianas como *Staphylococcus epidemidis*, *Actinobacter calcoacético* y *Proteus vulgaris*, que son bacterias hidrolíticas de urea para la producción de amoníaco (NH₃) metabolito indispensable en la síntesis celular de bacterias y levaduras que produce el incremento en la biomasa microbial. Durante la FES en la elaboración de Saccharina es común que se produzcan cantidades considerables de ácido acético y láctico por bacterias que pueden favorecer en ciertas circunstancias la retención de nitrógeno y así facilitar su utilización en el sistema para el crecimiento de levaduras y bacterias (Lezcano y Elías, 1992). En la fermentación alcohólica, característica de muchas levaduras, la molécula de glucosa con la ayuda de un Pi más dos ADP, se divide y rinde dos moléculas de etanol compuesto de dos átomos de carbono (C₂H₅OH), dos moléculas de CO₂ y dos moléculas de H₂O (Lehninger, 1982), sin embargo, las levaduras pueden ser categorizadas en diversos grupos de acuerdo a su modo de producir energía, utilizando respiración o fermentación que de acuerdo a estas condiciones determinaran su crecimiento, de ahí que la cepa *Saccharomyces cerevisiae* se prefiera para estos procesos por su cualidad de ser de respiración limitada, fermentar en condiciones aerobias o anaerobias y facultativas en el crecimiento microbiano (Ostergaard *et al.*, 2000). El metabolismo de los carbohidratos fermentables por levaduras presentes en los subproductos de manzana se ilustra de acuerdo con la Figura 1.

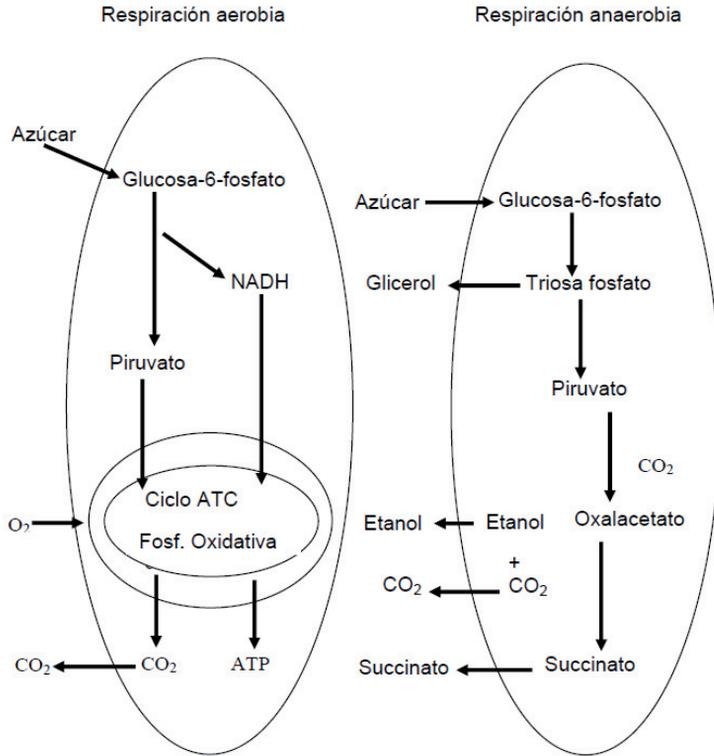


Figura 1. Metabolismo en levaduras bajo condiciones aerobias y anaerobias.

Adaptado de: Ostergaard et al., (2000)

Cinética microbiana. Ngadi y Correia (1992) midieron la producción de etanol junto con el crecimiento celular relacionado con la utilización de glucosa. La constante K en el crecimiento celular estimado osciló de 0.09 a 0.30^{-1} , y la constante en la producción de etanol K' varió de 0.07 a 0.16^{-1} . Los valores en la producción de etanol sobre glucosa (Y p/s) fueron de 0.33 a 0.37, mientras que la producción de etanol sobre la producción celular (Y p/x) durante la FES de BM osciló de 2.6×10^{-8} a 3.18×10^{-8} g/ufc. Soccol y Vandenberghe (2003) determinaron analíticamente los valores de biomasa a 24 y 36 h. Los valores fueron obtenidos experimentalmente a partir del consumo de O₂ y CO₂ involucrados, el sistema determinó una producción de biomasa de 0.531 g de biomasa g⁻¹ de O₂ consumido y un coeficiente de mantenimiento de 0.068 gramos (g) de O₂ consumido g⁻¹ biomasa h⁻¹.

Godiaet *et al.*, (1988) desarrollaron la fórmula para la tasa de utilización de sustrato en la producción de etanol durante la fermentación por medio de la fórmula $dS/d\theta = -1/Y_{x/s} * (dX)/(d\theta) - 1/Y_{p/s} * (DP)/(d\theta)$. Donde S es la concentración de glucosa (% g/g BS), Y x/s es la producción celular sobre glucosa (ufc / g), Y p/s es la producción de etanol sobre glucosa y P es la producción de etanol (% g/g BS).

Fuente de carbono y relación carbono/nitrógeno (C/N). La posibilidad de obtener proteínas a partir de levaduras fue desarrollada a principios del siglo pasado, cobrando gran importancia durante la segunda guerra mundial, principalmente en los países europeos (Latrille *et al.*, 1976). La fuente de carbono representa la fuente de energía que será disponible para el crecimiento microbiano. Este pudiera ser un simple monosacárido como la glucosa o un polímero complejo como la celulosa o el almidón. Pandey *et al.*, (2001) consideraron los siguientes aspectos para el crecimiento microbiano:

Relación C/N. La composición media de la biomasa microbiana presenta del 40-50% de carbono, del 30-50% de oxígeno, del 6 al 8% de hidrógeno y del 3 al 12% de N. Otros elementos tales como el fósforo, azufre y otros metales son importantes como parte de la célula, y su metabolismo, pero están presentes en pequeñas cantidades que necesitan ser consideradas por su significado particular. El N es el elemento crucial que determina el crecimiento microbiano y necesita ser calculado para tener el máximo de biomasa.

Temperatura. El significado de la temperatura en el desarrollo de un proceso biológico puede determinar efectos tan importantes como la desnaturalización de proteínas, inhibición de un metabolismo o bien la muerte de células. El control de la temperatura es uno de los factores que decide el buen desarrollo de la FES y deberá ser tomado en cuenta cuando algún proceso de FES se diseñe. El rango óptimo para el crecimiento de levaduras es de 30 °C (Hang *et al.*, 1981), aunque en la fermentación de caña de azúcar se han reportado temperaturas de 30 a 33 °C (Lezcano y Elías, 1992).

Humedad. La humedad es un factor íntimamente ligado a la FES y con las características del material biológico. La importancia del agua en el sistema es debido al hecho que la mayoría de las células viables se caracterizan por su contenido de humedad que va del 70 al 80%. En un sentido se ha establecido que en caso de bacterias, la humedad en el material deberá tener más del 70%. Para las levaduras el rango puede ser más amplio entre 70 y 60%, y para los hongos, un rango aún más amplio de 70 al 20%.

Potencial de iones hidrógeno (pH). El pH es otro de los factores más importantes para algún proceso de fermentación. Cada microorganismo posee un rango de pH para su crecimiento y actividad con un valor óptimo dentro del rango. El control del pH es uno de los problemas que no están resueltos en los procesos de FES, debido a la escasez de equipo apropiado y electrodos para determinar el pH, dadas las características heterogéneas del proceso. En general se ha observado que los hongos tienen

rangos de crecimiento entre 3.5 y 6.0, las levaduras de 4.5 a 7.0 y las bacterias un poco más arriba que las levaduras sin que esto pueda ser tomado como una regla.

Aireación y agitación. Estos dos factores tienen una influencia determinante en la FES debido a dos aspectos fundamentales: Demanda de O_2 en el proceso aeróbico. El calor y el fenómeno de transportación de masa en un sistema heterogéneo.

Una posible solución para resolver el problema de heterogeneidad es la agitación para romper gradientes, sin embargo; algunos autores han mencionado daños al micelio de hongos por efecto de la agitación. Otros han empleado agitación intermitente con excelentes resultados. En el caso de bacterias o levaduras, la agitación podrá favorecer la degradación de la biomasa relacionado al flujo de aire principalmente cuando las células no están bastante ajustadas a la superficie del sustrato.

Tamaño de partícula. El tamaño de partícula del sustrato tiene una importancia particular relacionada con la caracterización del sustrato y la capacidad de intercambio con el crecimiento microbiano, calor y transferencia de masa del sistema durante los procesos de FES.

La reducción en el tamaño de partícula por medio del molido es uno de varios pretratamientos que proveen el aumento en la superficie de acción para el crecimiento microbiano. Las partículas muy pequeñas pueden producir contracción o compactación en las matrices del sustrato que promueven problemas en el incremento de masa y transferencia de calor.

Necesidades de Azufre (S)

El S, es un macromineral esencial en la formación de compuestos sulfurados en las células como metionina, cistina, homocisteína, cistationina, taurina y ácido cistéico, que podrán ser limitados si el S no es disponible o insuficiente (Church y Ponds, 1976). Las recomendaciones de S dietario para el crecimiento microbiano en ganado de engorda van de acuerdo a la etapa productiva en una relación N: S (NRC, 1984).

Relación Nitrógeno: Azufre (N: S)

Los microbios ruminales contienen aproximadamente 0.5% de S con una relación N: S de 16:0.5 (Whanger *et al.*, 1978; Qi *et al.*, 1993). En la caña de azúcar, el sulfato de amonio ha sido suministrado con éxito al nivel de 1 g/kg de caña fresca para llenar los requerimientos de S provocando una mejora del 33% en el comportamiento y conversión animal sobre todo en aquellos que reciben cantidades moderadas de suplementos proteicos (Ferreiro *et al.*, 1977). La relación 10:1 de N: S que ha dado los mejores resultados en la Republica de Cuba ha sido al utilizar 10 g de urea por 1 g de sulfato de amonio en caña fresca molida para producción de Sacharina (Elías, 2004).

Requerimientos de Magnesio

Los requerimientos de magnesio para el crecimiento microbiano, fundamentalmente para las bacterias celulolíticas, más activas son considerados absolutos (Weimberg, 1977), ya que ningún otro mineral puede sustituir las funciones del magnesio aunque los requerimientos de algunas bacterias se pueden reducir por la adición de magnesio. Por otro lado Durand y Kawashima (1979), indicaron que el calcio desempeña un papel fundamental en la síntesis de proteína y de la pared celular de los microorganismos y es requerido por las bacterias.

Requerimientos de Potasio

El potasio es altamente requerido por los microorganismos (Bryant, 1977) y estimula la celulolisis in vitro cuando se incluye a razón de 2 g / l, pero puede ser sustituido total o parcialmente por el rubidio. Las interacciones entre K y Na en el rumen son complejas y varios autores coinciden en afirmar que para obtener un máximo crecimiento microbiano y actividad celulolítica se necesita niveles bajos de sodio y altos de potasio (Caldwell *et al.*, 1973). Pero, aún no han quedado establecidos los requerimientos de sodio y potasio para los microorganismos ruminales.

Vitaminas y Elementos Traza

Es conocido que para el crecimiento de levaduras y otros microorganismos se deben adicionar vitaminas del complejo B como factores de crecimiento externo. La presencia de ácidos grasos volátiles (AGV) básicamente ácido acético en medio de urea sin elementos traza, inhibe el crecimiento microbiano, por lo que son requeridos para favorecer la fermentación (Pinto *et al.*, 1989; Elías y Lezcano, 1993).

Uso de la Urea en la Alimentación Animal

Actualmente el uso de dietas proteicas con inclusión de ingredientes como soya, harinolina y harina de pescado, en las raciones de los rumiantes elevan el costo de la alimentación. Una de las alternativas viables para la reducción de este costo radica en el uso del NNP en la alimentación de los rumiantes. Algunas fuentes comunes para este fin son: acetato de amonio, lactato de amonio, biuret y urea (NRC, 1984).

Sin embargo, el uso de la urea se ha convertido en una práctica cotidiana en la alimentación animal, ésta se utiliza como mejorador de forrajes, cuando se tratan pajas o ensilados con el fin de elevar la cantidad de nitrógeno, ya que el NNP puede ser utilizado por los microorganismos ruminales para producir proteína verdadera en el rumen del animal (Llamas, 1990). Para incluir urea en la ración se han manejado tres criterios: el primero indica que un tercio de la proteína requerida por el animal se puede dar en forma de urea; el segundo postulado establece que se pueden añadir 30 g de urea a la ración por cada 100 kg de peso vivo y un tercer criterio indica que hasta el 50% de la proteína cruda requerida puede ser sustituida por urea, siempre y cuando haya un equilibrio entre la energía y el nitrógeno de la dieta (Shirley, 1986).

La utilización de urea es frecuentemente menos eficiente que el uso de suplementos proteícos naturales (Mamont *et al.*, 1993). El uso ineficiente de la urea en comparación con fuentes proteicas naturales se debe principalmente al exceso de amoniaco producido en el rumen, que posteriormente es absorbido por la pared ruminal, convertido en urea y excretado en la orina (Rihani, 1993). Sin embargo, el uso de una fuente energética en equilibrio con el nitrógeno reduce la concentración de amoniaco (Hafley *et al.*, 1993).

Naturaleza de la Proteína Microbial

La biotecnología no es nueva para los sectores agrícolas y alimenticios. El hombre ha estado explotando sistemas vivientes para la producción de alimentos por siglos. Lo clásico es el cruzamiento de plantas y animales y la selección de clases superiores; éstas son prácticas bien aceptadas para mejorar el sistema de producción de alimentos. Las técnicas tradicionales de mutación y selección también son empleadas para alterar bacterias y levaduras usadas para producir una amplia variedad de alimentos fermentados, tales como queso, salchichas, pepinillos, pan, cerveza y vino (Harlander, 1989). Esto muestra que el hombre desde hace mucho tiempo ha utilizado los microorganismos en su sistema de alimentación, sin embargo, hasta épocas recientes se ha puesto énfasis en la biomasa de microorganismos para la producción de alimentos, ya sea para consumo humano directo o para la alimentación de animales. La proteína unicelular o microbial incluye los microorganismos unicelulares cultivados específicamente por su contenido alto en proteína, bajo condiciones controladas de fermentación (Stringer, 1985). Los microorganismos pueden ser hongos, levaduras, algas o bacterias. Cabe mencionar que el término de proteína unicelular asignado a la biomasa producida por estos microorganismos es algo erróneo ya que gran cantidad de hongos no son unicelulares, pero en forma general, se incluyen como proteína unicelular, más que todo por costumbre.

En tiempos modernos se ha desarrollado un enorme interés en la producción de proteína unicelular, entre otros factores que estimulan la producción de esta proteína, es de mencionar, que el fenómeno de la creciente demanda de proteínas para la alimentación humana ha ocasionado la escasez de concentrados protéicos tradicionales, tales como las harinas de oleaginosas y las harinas de origen animal, lo cual produce que los costos de las fuentes proteicas convencionales sean elevados (Alvarez y Tillan, 1988). Por lo que la búsqueda de fuentes alternas para alimentación humana directa o para alimentación animal se esté investigando.

Mignone *et al.*, (1982) señalan que los microorganismos pueden crecer en sustratos muy diversos. Los sustratos según Stringer, (1985) se clasifican en sustratos convencionales como la melaza y el almidón; y sustratos no convencionales, como los derivados del petróleo. Pond y Maner, (1974) señalan que las levaduras pueden utilizar los carbonos del petróleo como fuente de energía, en vez de emplear fuentes más típicas de carbono, como los carbohidratos. Algunas bacterias de los géneros *Nocardia* y *Pseudomonas*, pueden oxidar los hidrocarburos del petróleo hasta CO_2 y agua, de esta forma obtienen la energía que necesitan (Dawes y Sutherland, 1976).

Para producir la proteína unicelular se debe considerar la factibilidad técnica, la disponibilidad de materia prima y el costo. Los procesos más económicos son los que más se desarrollan dado que las proteínas son la limitación en las dietas para los animales, su producción abundante y económica es por demás importante; en este sentido, los sustratos no convencionales son los más atractivos (Pond y Maner, 1984).

En los procesos de fermentación se aplican los conocimientos sobre los cultivos de microorganismos que inciden sobre la economía del proceso, en términos de tiempo, trabajo, rendimiento y calidad, siendo la economía la que dicta el curso del proceso de fermentación y solo los procesos económicos serán favorecidos.

Estos procesos se caracterizan por la obtención de grandes cantidades de biomasa microbiana en cultivos artificiales en tiempos cortos de proceso, por ejemplo, las tasas de crecimiento para bacterias son de 20 min, a 2 h, (tiempo de generación), y para las levaduras y hongos son de 2 a 16 h, si bien, las especies seleccionadas presentan tasas de crecimiento similar a las bacterias (Litchfield, 1985). Dado que las proteínas son la limitación de las dietas para los animales, su producción abundante y económica será por demás atractiva.

La proteína unicelular producida a partir de sustratos convencionales se ha dirigido hacia el consumo humano, sin embargo, el mayor potencial para la producción descansa sobre los sustratos no convencionales, y esta proteína se destina al consumo animal principalmente por su naturaleza (Stringer, 1985), y sus características nutricionales, particularmente en la alimentación de no rumiantes (Van Soest, 1982).

Valor Nutricional de la Proteína Microbial

Stringer, (1985) menciona que para que un producto gane aceptación como alimento los animales que lo reciben deben consumirlo y crecer, siendo el primer criterio la gustosidad y el segundo una tasa de crecimiento y conversión alimenticia satisfactoria. Para formular dietas que incluyan proteína unicelular, es necesaria que éstas sean correctamente balanceadas. En estas condiciones, la proteína unicelular es igual a otros ingredientes protéicos comunes y no presenta mayores problemas en la alimentación animal (Stringer, 1985). La proteína cruda (nitrógeno x 6.25) es usada para calcular la proteína de los alimentos, ésta incluye compuestos nitrogenados no protéicos los cuales no tienen valor nutricional (Litchfield, 1985). Mencionan que al incluir proteína unicelular en 1% de la ración en dietas de pollos de engorda, se obtienen buen comportamiento de los pollos, resultados similares son reportados por Ergüi y Vogt (1985), quienes sustituyeron la harina de pescado por una proteína microbial.

Sin embargo, la proteína microbial debe ser suplementada con aminoácidos para obtener buenos resultados en la alimentación de pollos de engorda, lo que demuestran los trabajos de quienes reportan que hasta un 12% de la ración puede ser sustituida por proteína unicelular siempre y cuando ésta se suplemente con lisina y metionina. Así mismo, Plavnik (1981), reportaron que al agregar arginina en una dieta que contiene proteína unicelular se soluciona el problema, mejorando el comportamiento de los pollos en engorda. En la alimentación de cerdos, Pond y Maner (1984), concluyen que la proteína microbial se puede usar para aportar la mayor parte de la proteína suplementaria de dietas en base a cereales en las etapas de iniciación, crecimiento y finalización o en animales reproductores.

La producción de biomasa bacterial a partir de bagazo de caña de azúcar es reportada por Molina *et al.*, (1980), quienes utilizaron un microorganismo no tipificado y una especie de *Cellulomonas* sp. Así mismo, Molina *et al.*, (1983), utilizaron las bacterias *Cellulomonas* sp. y *Bacillus subtilis* crecidas sobre bagazo de caña de azúcar para alimentación de pollos de engorda; esta biomasa contiene 51% de proteína cruda, 48% de proteína verdadera, 1.02% de grasa, 11.2% de ceniza y una energía metabolizable de 2,425 kcal / kg.

Importancia de la Proteína Microbial

Las tasas de crecimiento y producción de microbios en el rumen son importantes para el rendimiento de los rumiantes debido a que son una fuente importante de proteína para el animal (Maeng *et al.*, 1975). Según el tipo de ración, de un 50 a un 80% del nitrógeno del forraje se transforma en nitrógeno microbiano (Piatkowski, 1982), 80% del nitrógeno microbiano se transforma en proteína verdadera (Smith, 1982; Setter y Roffler, 1981) y 20% está en forma no utilizable. El 80% de la proteína microbiana verdadera puede ser absorbida (proteína metabolizable); y al igual fue un 87% de la proteína verdadera que escapa a la degradación en el rumen (Setter y Roffler, 1981).

La síntesis de proteína microbiana se realiza con cantidades adecuadas de amoníaco y es equivalente a 10.44% de la cantidad de TND que poseen los alimentos; el 25% del TDN digerido se transforma en proteína microbiana cuando el nitrógeno en el rumen no es un factor limitante (Burroughs *et al.*, 1975).

Composición de la Proteína Microbial

La actividad de las bacterias y los protozoarios provoca la transformación del N del alimento en N microbiano. La proteína microbiana incluyendo bacterias y protozoarios está compuesta de ácidos nucleicos. En los protozoarios, los ácidos nucleicos están representados fundamentalmente por RNA. El contenido de aminoácidos esenciales con respecto a la MS se encuentra entre 33 y 44% en los protozoarios y sólo en 24 y 27% en las bacterias. El contenido de polisacáridos varía de 8 a 35% y es mayor en muestras tomadas 2 h, después de la alimentación que antes. Una muestra típica de contenido ruminal contiene 20 a 35% de protozoarios, 5% de bacterias grandes, 65% de bacterias pequeñas y toda la mezcla en conjunto contiene un 17% de polisacáridos. La MS microbiana tiene un 10% de N lo que equivale a 62.5% de proteína cruda (Czerkawski, 1978).

El valor biológico de la proteína microbiana es muy importante para el rumiante hospedero, ya que la composición de aminoácidos sintetizados por las bacterias ruminales es relativamente constante (Church, 1974), de aquí la importancia de alguna fuente de NNP en la dieta como la urea y las sales amoniacales.

Importancia del Contenido de Polifenoles en la Manzana

Los polifenoles. Los compuestos fenólicos o polifenoles son un grupo de sustancias químicas contenidas en las plantas, con más de 8,000 estructuras conocidas actualmente (Bravo, 1998). La estructura química de estos compuestos puede ser desde una molécula simple como la de los ácidos fenólicos, hasta compuestos con una estructura altamente polimerizada como la de los taninos.

Generalmente, los polifenoles se encuentran en formas conjugadas unidas con azúcares (glucosilados). La familia de los compuestos polifenólicos se puede subdividir en al menos 10 grupos distintos, de los cuales los flavonoides son los más importantes; estos agrupan a su vez al menos 5,000 compuestos distintos, agrupados en hasta 13 clases distintas. De manera simple se pueden definir como compuestos heterocíclicos de las plantas (Pérez deAlejo *et al.*, 1998).

Surh *et al.*, (2005) mencionan que de la amplia variedad de fitoquímicos, hay algunos que son quimiopreventivos por sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, algunos pueden modular factores de transcripción que activan los sistemas redox en la célula. De los flavonoides (un tipo de polifenol), el subgrupo más abundante en la dieta es el de los flavanoles (catequinas, proantocianidinas), las antocianinas y los productos de oxidación derivados de ellos. Estas sustancias se consumen en cantidades importantes en la dieta a partir de frutas y bebidas (jugos de fruta, vino, té, café, chocolate y cerveza) y en menor cantidad a partir de verduras, legumbres y cereales. La ingesta diaria de este tipo de compuestos en la dieta para seres humanos debería ser de aproximadamente 1 g d⁻¹ para poder considerar que su consumo es adecuado. Sin embargo, en estudios de biodisponibilidad los niveles encontrados en el plasma sanguíneo de individuos expuestos al consumo de polifenoles en la dieta no reflejan dichas cantidades (González-San José *et al.*, 2001).

Se pueden encontrar compuestos polifenólicos de diversos tipos en los alimentos (Yurttas *et al.*, 2000). Entre estos tenemos a las isoflavonas glucosídicas de la soya (genisteína, daidzeína, gliciteína), los ácidos fenólicos de soya (ácidos hidroxicinámicos y ácidos hidroxibenzoicos), los flavonoides del cacahuate (quercetina y rutina), los fenoles de cáscara de arroz (isovitexina), los compuestos fenólicos en la semilla de ajonjolí (sesamol), en el té (catequinas y derivados) y en el romero (ácido romérico y ácido carnosico); otros flavonoides antioxidantes importantes son la dihidroquercetina, la taxifolina, la luteolina, las quinonas y el ácido protocatecuico.

Propiedades de los polifenoles. En las plantas, los polifenoles tienen distintas funciones; como por ejemplo la defensa natural frente a parásitos, depredadores y otros patógenos (Silveira-Rodríguez *et al.*, 2003). En general se consideran antioxidantes importantes (Pérez de Alejo *et al.*, 1998).

Se ha mostrado que el contenido fenólico de algunos alimentos tiene un efecto antibacteriano; sin embargo, esto depende del tipo de polifenoles del alimento. Específicamente y haciendo énfasis de su importancia en este trabajo, los polifenoles contenidos en la manzana pueden tener un efecto benéfico sobre la salud humana (Alberto *et al.*, 2006).

Como se mencionó, algunos compuestos fenólicos son potentes antioxidantes debido a que disminuyen la oxidabilidad de las lipoproteínas de baja densidad *in vitro* y tienen un posible efecto sobre la biodisponibilidad del óxido nítrico. Por ejemplo, en nutrición hospitalaria se puede utilizar el aceite de oliva para mejorar la función endotelial en personas con hipercolesterolemia durante el periodo postprandial. Este beneficio podría deberse al alto contenido de compuestos fenólicos en el aceite, lo cual permite disminuir el estado oxidativo con una mayor biodisponibilidad del óxido nítrico tras su ingesta (Ruano *et al.*, 2005). Los flavonoides, isoflavonoides y las flavonas tienen una fuerte actividad antioxidante *in vitro*; de este grupo, la quercetina es el más efectivo como antioxidante y se puede encontrar en las manzanas (Lugasi *et al.*, 2003). La manzana es rica en su contenido de flavonoides (Bravo, 1998).

Los flavonoides del cacao interfieren en la actividad proinflamatoria de macrófagos modulando la síntesis de las principales citocinas implicadas e inhiben la secreción de radicales oxidantes como el óxido nítrico (Ramiro-Puig *et al.*, 2005); además, son capaces de modular la activación de linfocitos T. Esto tiene aplicación en situaciones de hiperactividad del sistema inmune como las que se presentan en enfermedades autoinmunes y patologías que causan inflamación crónica (Ramiro-Puig *et al.*, 2005).

El té verde preparado para consumo humano tiene un alto contenido de antioxidantes; en su actividad antioxidante se relaciona principalmente con su contenido total de catequinas (Kaufmann *et al.*, 2005). Lin y Liang (2002) encontraron que la catequina es un antioxidante efectivo contra la oxidación de carne de pechuga de pollo bajo condiciones experimentales, induciendo peroxidación con ácido ascórbico-Fe²⁺, hemoglobina, Cu⁺-H₂O₂, y 2, 2'-azobis (2-amidinopropano) hidrocloreto. La catequina puede prevenir la oxidación de lípidos y proteínas. Esta actividad puede ser mayor que la del α-tocoferol (28.3 mM vs. 23.8 mM respectivamente), atribuible a un número mayor de grupos hidroxilo, lo que le da una capacidad de captación de radicales libres mayor sobre un período más largo en fase acuosa, logrando una menor oxidación de proteínas.

Quezada *et al.*, (2004) encontraron que la actividad antioxidante de las hojas de una planta endémica de Chile (Boldo, *Peumus boldus*, Molina) proviene en su mayor parte de la fracción flavonoide, seguida por una fracción alcaloide, siendo los contribuyentes principales a esa actividad la catequina y la boldina respectivamente. Ellos proponen el uso de catequina y boldina como marcadores para la actividad antioxidante de las hojas de boldo.

Puesto que la manzarina es el producto fermentado de subproductos del cultivo e industrialización de la manzana, existe la posibilidad de que este producto fermentado conserve algunos de los polifenoles y de las propiedades que tiene la manzana como alimento; si esto es así, podría ser un alimento con una influencia positiva en la salud animal al utilizarlo como parte de la dieta.

Definición de oxidantes y su rol en el metabolismo. Para comprender la importancia de cómo la propiedad antioxidante de algunos polifenoles tiene influencia sobre la salud del organismo, se debe entender primero que son los oxidantes y cómo éstos, pueden afectar a un organismo cuando se concentran en altas cantidades.

El oxígeno está asociado a las condiciones de vida aerobia (González-San José *et al.*, 2001). Representa la fuerza motriz para el mantenimiento del metabolismo y viabilidad celular en organismos que dependen de la respiración; pero a la vez, es responsable de la formación de compuestos intermediarios parcialmente reducidos y dotados de una alta reactividad en esos organismos. Estos compuestos se conocen como especies oxigénicas reactivas (EOR).

Las especies oxigénicas reactivas son radicales libres (RL); es decir, son moléculas químicamente activas. Esto se debe a que están dotadas de un electrón desapareado en un nivel energético superior en alguno de sus átomos, lo que les confiere una alta reactividad (González-San José *et al.*, 2001).

Los radicales como el ión superóxido (O_2^-), el radical hidróxilo (OH), alcoxilo (R-O), peróxido (R-OO) y óxido de nitrógeno (NO) y no radicales como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), oxígeno singlete (O_2) y peroxinitrito (ONOO) son algunos de los compuestos que se forman en un organismo vivo que consume oxígeno. Estos provocan la oxidación de lipoproteínas de baja densidad. La formación de RL se puede dar en la cadena respiratoria (González-San José *et al.*, 2001).

En seres humanos, los estímulos externos (por ejemplo químicos, radiaciones o infecciones) provocan la producción excesiva de EOR; a su vez, estos ejercen efectos deteriorantes en el organismo (Surh *et al.*, 2005), el cual busca mantener el equilibrio entre oxidantes y antioxidantes. Cuando este equilibrio se rompe a favor de los oxidantes se produce un estrés oxidativo.

En muchos procesos fisiopatológicos, cuando hay enfermedades y envejecimiento celular, el estrés oxidativo se acentúa. El consumo de alimentos que contienen antioxidantes naturales puede permitir que el equilibrio entre oxidantes y antioxidantes se mantenga estable o incluso favorecer un equilibrio a favor de los antioxidantes; esto reduce daños celulares y consumo de energía en el organismo.

A medida que un individuo envejece dicho balance está a favor de los oxidantes; aquí radica la importancia de incrementar el consumo de alimentos con antioxidantes para contrarrestarlos (González-San José *et al.*, 2001). Yurttas *et al.*, (2000) mencionan que la vitamina E es un antioxidante fenólico lípido soluble. La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos se basa en la habilidad de donar un átomo de hidrógeno a radicales libres. El sistema que mantiene el balance oxidativo se llama sistema redox.

Con base en lo anterior, se puede decir que el consumo de un alimento que contiene componentes antioxidantes como pueden ser cierto tipo de polifenoles, puede influir de manera positiva sobre la salud animal, comenzando por mantener un balance en el sistema redox a favor de los antioxidantes. Puesto que la manzana contiene una cantidad importante de polifenoles con capacidad antioxidante, a los cuales se les han atribuido algunas de las propiedades benéficas de la manzana sobre la salud, se ha llegado a pensar en que existe la posibilidad de que la manzarina conserve esas propiedades.

Contenido de polifenoles en la manzana. Podsedek *et al.*, (2000) reportan que la manzana tiene un contenido de polifenoles totales entre 2.3 y 3.6 mg g⁻¹; el de mayor cantidad es el ácido clorogénico (0.03 a 0.43 mg g⁻¹). Su contenido de catequinas y epicatequinas es de entre 0.018 y 0.089 mg g⁻¹. Otros reportes indican que la manzana puede tener una cantidad de polifenoles totales entre 0.27 y 2.98 mg g⁻¹ en base húmeda (Bravo, 1998); cantidad que implica un rango amplio pero que coincide con lo mencionado por Podsedek *et al.*, (2000). El contenido de polifenoles totales en la manzana puede ser variable debido a diversos factores; por ejemplo, la concentración de polifenoles totales es inversamente proporcional a la cantidad de manzanas producidas por árbol (Stopar *et al.*, 2002). En el jugo de manzana la concentración de polifenoles totales puede disminuir de un 5 a un 21% debido al almacenamiento (Gliśczyńska-Swigło y Tyrakowska, 2003).

Efectos del consumo de manzana sobre la salud. En trabajos *in vitro*, ciertos componentes de la manzana tienen una fuerte actividad antioxidante y pueden inhibir la proliferación de células cancerígenas, disminuyendo a la vez la oxidación lipídica y los niveles de colesterol. En general, una amplia variedad de fitoquímicos contenidos en las manzanas presentan una fuerte actividad antioxidante y anticarcinogénica (Boyer y Liu, 2004). Las procianidinas de la manzana, ofrecidas en el agua de bebida, inhiben las fases de promoción y progreso de la carcinogénesis en el colon (Gossé *et al.*, 2005).

En estudios epidemiológicos se ha encontrado que el consumo de manzana se asocia con la disminución del riesgo de padecer enfermedades crónicas cardiovasculares, asma y cáncer (Boyer y Liu, 2004). Algunos de sus componentes modifican los procesos carcinogénicos (Barth *et al.*, 2005). La manzana es uno de los frutos que aporta la mayor parte de los polifenoles consumidos en la dieta de los franceses (Brat *et al.*, 2006), inclusive, se ha sugerido que los polifenoles de la manzana son un componente del alimento que puede contribuir al alivio de los síntomas clínicos de la rinitis alérgica persistente (Enomoto *et al.*, 2006).

Elementos Celulares Sanguíneos

Un modo práctico para diagnosticar el estado de salud de un organismo, es a través de la cuantificación de los componentes celulares de la sangre y su comparación con los parámetros considerados como normales. El sistema hemolinfático tiene diversas funciones. Una parte de éstas se realiza a través de sus elementos celulares, cuando estos, se encuentran en una concentración mayor o menor a la normal, es un reflejo de una respuesta positiva o negativa a factores externos.

Uno de éstos factores externos puede ser la alimentación (Aiello y Mays, 2000). Si la adición de manzarina a la dieta de los animales ejerciera un efecto positivo o negativo sobre su estado general de salud, ésto podría diagnosticarse a través de la concentración de los componentes celulares sanguíneos, principalmente en la concentración de glóbulos blancos.

Los componentes celulares sanguíneos transportan oxígeno (glóbulos rojos o eritrocitos), protegen de organismos extraños y antígenos (glóbulos blancos o leucocitos) ingiriéndolos, capturándolos o destruyéndolos, e inician la coagulación (plaquetas). Los leucocitos (glóbulos blancos) se dividen en fagocitos y linfocitos; los fagocitos se subdividen en monocitos (fagocitos mononucleares) y granulocitos (fagocitos con núcleo celular segmentado); a su vez éstos últimos se subdividen en neutrófilos, eosinófilos y basófilos. Los linfocitos son responsables de la inmunidad humoral, su producción se origina en la médula ósea. Los análisis hematológicos muestran las cantidades de estos elementos celulares. Su evaluación permite diagnosticar problemas de salud, inflamación en tejidos o funciones proliferativas de la médula ósea (Aiello y Mays, 2000). Pueden reflejar una respuesta positiva o negativa del organismo a un estímulo externo, como por ejemplo, el efecto de una dieta o de algún aditivo en la dieta. Esto es importante debido a que con la cuantificación de los componentes sanguíneos se podría diagnosticar un efecto (positivo o negativo) debido a la influencia de la adición de manzarina sobre el sistema inmunológico y sobre otros parámetros sanguíneos en el organismo animal al incluirla como parte de la dieta.

Desarrollo del Epitelio Estratificado del Rumen

El desarrollo físico del rumen puede dividirse en el incremento de la masa muscular del rumen y en el desarrollo del epitelio ruminal. Este último se ve reflejado en el crecimiento de las papilas (Baldwin *et al.*, 2004; Khan *et al.*, 2007), que tienen forma de hoja y son extensiones del epitelio que permiten que la superficie de absorción del rumen se incremente (Graham *et al.*, 2005).

Para el desarrollo normal del epitelio estratificado del rumen debe haber una fermentación ruminal establecida (Baldwin *et al.*, 2004). Es conocido desde hace décadas que la presencia de los productos del metabolismo microbiano de los alimentos estimula el desarrollo de este tejido (Flatt *et al.*, 1956). De los ácidos grasos volátiles (AGV's), el propionato y el butirato son los que tienen mayor influencia sobre el desarrollo del epitelio (Khan *et al.*, 2007) y su presencia estimula su crecimiento y su funcionamiento (Heinrichs, 2005).

La rápida acumulación de AGV's y el consecuente descenso del pH en el rumen pueden provocar la queratinización de las papilas ruminales, disminuyendo la absorción de AGV's (Suárez *et al.*, 2007), reduciendo el flujo sanguíneo y la movilidad del rumen, y causando la degeneración del epitelio estratificado (Heinrichs, 2005), por lo que una acidosis crónica provoca un desarrollo menor de este tejido. La proliferación y el tamaño del epitelio ruminal depende de la dieta utilizada (Graham *et al.*, 2005). El crecimiento del epitelio ruminal se puede medir con el largo y el ancho de las papilas (Heinrichs, 2005); éstas dos variables son las más representativas de este crecimiento (Lesmeister *et al.*, 2004).

El tamaño de las papilas es afectado por la textura de la dieta, por la diferencia en la composición química del alimento (Greenwood *et al.*, 1997) y por la concentración de energía metabolizable (Shen *et al.*, 2004). El desarrollo de las papilas está relacionado directa y positivamente con la calidad y la cantidad del forraje. Su desarrollo también es afectado por la cantidad de AGV's producidos por la digestión de la celulosa (Scocco *et al.*, 2007).

El desarrollo del epitelio estratificado del rumen, medido a través del largo y ancho de sus papilas, permite conocer si existe una producción de AGV's mayor o menor en el rumen debido a las diferencias en la composición de la dieta; además, permite conocer indirectamente si existe daño en el rumen por descensos en el pH, mostrando problemas de acidez subaguda o bien, simplemente permite

conocer indirectamente las diferencias en la obtención de productos de fermentación ruminal (AGV's) debido a las diferencias entre las dietas; en este caso debido a la inclusión de manzanina como ingrediente.

La relación de lo anterior con la manzanina es que al utilizar este producto como parte de la dieta para rumiantes existe la posibilidad de que las condiciones de fermentación ruminal sean modificadas. La evaluación del desarrollo de las papilas ruminales por la técnica de Lesmeister *et al.*, (2004) puede reflejar estas modificaciones. En caso de obtener resultados favorables se justificaría en un futuro la realización de investigaciones más precisas de cinética ruminal y de dinámica de la fermentación ruminal.

CAPITULO 1. PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA MICROBIANA MEDIANTE LA
FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO A PARTIR DE MANZANA DE DESECHO

Agustín Becerra Bernal (†)

RESUMEN

Con el objetivo de evaluar el efecto de tiempo de preparación (TP) y nivel de rastrojo (NR) en la producción de proteína cruda (PC) y proteína microbiana (PV), se utilizaron 30 muestras de un kg de manzana de desecho molida variedad *Golden delicious*, distribuidas en 6 diferentes tratamientos con 0, 24 y 48 horas (h) de TP y 10 y 20% de NR, adicionadas con 1.5 % de urea, 0.20% de sulfato de amonio y 0.50 % de una premezcla de vitaminas y minerales distribuidas en un diseño completamente al azar con arreglo factorial de 3x2. Se encontraron diferencias ($P < 0.05$) para PC por NR, lo cual indica que a medida que se incrementó este factor la PC disminuyó de 17.3 a 16.7 % en los niveles de 10 y 20 % del NR, respectivamente. La PC no se modificó por TP ($P > 0.05$). Se encontró interacción para PV ($P < 0.01$) por los factores NR y TP, la cual fue ligeramente superior con el 10 % del NR en 15.67, 13.83 y 13.75 vs 13.85, 12.92 y 14.18 % para el 20 % de NR a 0, 24 y 48 h de TP, respectivamente. La FDN y la FDA se incrementaron ($P < 0.05$) por el aumento del NR. Se concluye que es factible la producción de Manzarina MD a partir de manzana de desecho con 10 % de rastrojo de maíz para facilitar el mezclado y la ventilación del sustrato y 0 h de tiempo de preparación, ya que a medida que aumenta este factor, tiende a reducirse la PV.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del Área de Estudio

Este primer experimento de FES con manzana de desecho se desarrolló en el laboratorio de procesados para la alimentación animal, en tanto que los análisis químicos se realizaron en laboratorio de nutrición animal, ambos pertenecientes a la Facultad de Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua.

Metodología del Trabajo

Se prepararon muestras un Kg de manzana de desecho molida adicionadas con 1.5% de urea, 0.20% de sulfato de amonio y 0.5% de un suplemento vitamínico y mineral, las cuales fueron preparadas a 0, 24 y 48 h combinadas con 10 y 20% de rastrojo de maíz molido (NR).

Una vez preparadas, las muestras fueron sometidas a fermentación en piso de concreto bajo condiciones aeróbicas y de temperatura ambiente en un invernadero y volteadas cada 2 horas durante el día para oxigenarlas y estimular la respiración de los microorganismos aerobios siguiendo las indicaciones de (Fundora *et al.*, 1996).

Posteriormente, cuando las muestras se fermentaron durante el proceso de FES y perdieron la humedad suficiente para su almacenamiento, fueron molidas en un molino Wiley^{MR} con malla de un mm los análisis bromatológicos en laboratorio.

Tratamientos

Se prepararon muestras de manzana de desecho molida adicionadas con 1.5 o 2% de urea, 0.20% de sulfato de amonio, 0.5% combinadas con 10 o 20% de RM a tres tiempos de preparación (Cuadro 2).

CUADRO 2. DISEÑO DE TRATAMIENTOS CON MANZANA DE DESECHO Y NIVELES DE RASTROJO DE MAÍZ PARA PRODUCCIÓN DE PROTEINA MICROBIANA POR MEDIO DE FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO.

Tratamientos	Tiempo (h)	Ingredientes, %				
		Manzana molida	Rastrojo de maíz	Urea	Sulfato de amonio	Vits. Y Mins
1	0	87.80	10	1.5	0.20	0.50
2	24	87.80	10	1.5	0.20	0.50
3	48	87.80	10	1.5	0.20	0.50
4	0	77.80	20	1.5	0.20	0.50
5	24	77.80	20	1.5	0.20	0.50
6	48	77.80	20	1.5	0.20	0.50

Variables Evaluadas

Las variables evaluadas en laboratorio fueron FDN, FDA, PC y PV, utilizando las técnicas descritas en (AOAC, 2000).

Análisis Estadístico del Experimento

Para realizar los análisis estadísticos, se utilizó el procedimiento GLM (SAS, 2002).

Diseño Experimental

Se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial de 2x3, donde se consideraron como efectos fijos dos NR; TP; su interacción (NR*TP) y el efecto aleatorio de parcela dentro de cada tratamiento. Las variables respuesta fueron PC; PV; FDN y FDA.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al analizar el comportamiento de la MS de cada uno de los tratamientos a través del periodo de fermentación, el máximo porcentaje de MS se alcanzó a las 48 h llegando a menos del 10 % de la MS en todos los tratamientos. Los promedios expresados en cada uno de los parámetros son el resultado del análisis de tres réplicas por muestra de todos los tratamientos.

Proteína Cruda (PC)

Se encontraron diferencias ($P < 0.05$) para PC, lo cual indica que a medida que se incrementó el NR, la PC disminuyó de 17.3 ± 0.68 a $16.7 \pm 0.68\%$ en los niveles de 10 y 20% del NR, respectivamente. En la PC, el TP no modificó ($P > 0.05$) esta variable, indicando estos resultados que bajo ciertas circunstancias la utilización de la manzana de desecho molida se conserva a la sombra en depósitos impermeables a temperatura ambiente. De esta manera, puede posponerse su uso por lo menos dos días aun en la época de verano. Esta situación no se observa durante la fermentación de la Saccharina, ya que las investigaciones indican que el mayor desarrollo microbiano se presenta de 24 a 48 h después de cortada la caña de azúcar o de la incubación (Elías y Lezcano, 1993).

Proteína Verdadera (PV)

Se encontró interacción ($P < 0.01$) por los factores NR y TP, cual fue ligeramente superior con el 10% del NU en 15.67, 13.83 y 13.75 vs 13.85, 12.98 y 14.18% para el 20% de NR con 0, 24 y 48 h de TP respectivamente.

Durante la fermentación de la manzana se produjo un nivel aceptable de PV ligeramente superior a la encontrada en la elaboración de Saccharinarústica con promedio de 13.7%, reportada por (Elías *et al.*, 1990; Fundora *et al.*, 1996). La baja encontrada en la PV, puede ser explicada por la disminución en el porcentaje de carbohidratos de fácil fermentación y el aumento en el contenido de fibra en los tratamientos.

Esta situación es semejante a lo señalado por Elías *et al.*, (1990) quienes mencionan que cuando se utiliza la caña completa para elaborar Saccharina, el contenido de fibra se eleva considerablemente y en consecuencia los carbohidratos solubles disminuyen, los cuales se asume son utilizados por la biomasa para su crecimiento. El comportamiento en esta baja de la PV con ambos NR no fue posible compararlo con otros estudios debido a que no se cuenta con información de este tipo. Sin embargo, una explicación muy relacionada con lo observado puede ser que se haya debido a las altas temperaturas presentadas durante el proceso de FES debido a que superaron los 35 °C, dado que el rango que se ha encontrado en producción de PV en la Saccharina es inferior (30 a 33 °C) considerado como el óptimo para desarrollo de levaduras con 1.5% del UN (Lezcano y Elías, 1992).

Fibra Detergente Neutro (FDN)

En el análisis estadístico de la FDN en relación al NR, mostraron diferencias ($P < 0.01$) como era de esperarse, cuando se incrementó el NR en los tratamientos (10 a 20%) el porcentaje de FDN fue mayor (35.2 ± 0.58 y 46.7 ± 0.57) respectivamente. No hubo diferencias significativas ($P > 0.05$) por efecto de NR con TP en la FDN por lo que su contenido no se modificó por influencia de estos factores.

Fibra Detergente Ácido (FDA)

Para la FDA al igual que en FDN el NR fue ($P < 0.01$) debido a que su contenido se incrementó a medida que se aumentó el NR de 10 a 20% con valores de 27.3 ± 0.68 y $32.5 \pm 0.68\%$, sin encontrarse diferencias estadísticas con el TP ($P > 0.05$) ni por influencia del NR con TP.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Bajo las condiciones en las cuales se realizó el presente trabajo de investigación, se puede mencionar lo siguiente:

- 1.- La proteína cruda y la proteína verdadera disminuyeron a medida que se incrementó el nivel de rastrojo en la muestra de manzana de desecho fermentada en estado sólido.
- 2.-El tiempo previo a la utilización de la manzana de desecho molida por fermentación en estado sólido no modificó la producción de proteína verdadera.
- 3.-La fibra detergente neutro y fibra detergente ácido, se incrementaron conforme se adicionó rastrojo de maíz.
- 4.- Es factible la producción de Manzarina MD a partir de manzana de desecho con 10% de rastrojo de maíz para facilitar el mezclado y la ventilación del sustrato, y 0 h de tiempo de preparación.

CAPITULO 2. NIVELES DE UREA Y MAÍZ MOLIDO EN LA FERMENTACIÓN
AERÓBICA DE MANZANA DE DESECHO

Agustín Becerra Bernal (†)

RESUMEN

En este experimento, el objetivo fue evaluar la respuesta de diferentes niveles de urea (NU) de 1.5 o 2%, y maíz molido (MM) en niveles de 0, 10 y 20% en manzana de desecho molida adicionada con 0.20 o 0.26% de sulfato de amonio, 10 % de rastrojo de maíz y 0.50% de una premezcla de vitaminas y minerales sobre la producción de proteína cruda (PC) y microbiana (PV) en FES de manzana de desecho, para lo cual 30 muestras de manzana de desecho molida variedad *Golden delicious* de un Kg c/u, fueron distribuidas en un diseño completamente al azar con arreglo factorial de 2X3. Se encontró interacción para PC ($P<0.05$), debido a que en la medida que se adicionó MM, el contenido de esta variable se redujo en ambos NU, sin embargo; los valores fueron superiores con el 2 % de NU en 24.80, 19.28 y 19.80% vs 17.31 16.24 y 16.74 % del 1.5% del NU para los niveles de 0, 10 y 20% de MM, respectivamente. En la PV, hubo efecto de interacción entre NU y MM ($P<0.01$), la cual disminuyó cuando se incrementó el MM, aunque los valores de esta variable con el 2% de UN fueron superiores (19.91, 12.76 y 11.97%), en comparación a los valores de 1.5% del NU (10.06, 11.66 y 8.32 %) para los niveles 0, 10 y 20% de MM, respectivamente. La FDN tuvo interacción ($P<0.01$) por los factores involucrados debido a que se redujo su contenido al incorporar el MM en la mezcla, aunque fue mayor para el nivel 0% de MM conteniendo 1.5% del NU en comparación a la mezcla con 2% del NU (63.38 vs 49.46%) respectivamente, la cual disminuyó en la misma tendencia a medida que se adicionó el MM en la manzana de desecho. Se encontró interacción para FDA ($P<0.01$), ya que su contenido disminuyó al adicionar MM, pero fue superior al de 1.5% del NU en el 0% de MM (47.86 %) vs 37.60% del 2% del NU y 0% de MM, teniendo una caída drástica con el incremento de MM en ambos NU. En la DIVMS hubo diferencia ($P< 0.01$) para en NU, debido a que su contenidos tuvieron valores de 77.11 y 71.56% para el 1.5 y 2% del NU, respectivamente. Para nivel de MM se encontró efecto favorable ($P<.01$) al adicionar 10 y 20% de MM en la mezcla, la cual se incrementó con valores de 68, 76 y 78%

en los niveles de 0, 10 y 20% de MM, respectivamente. Para la DO, hubo interacción ($P < 0.02$) entre los factores UN y MM, la cual disminuyó a medida que se incrementó el MM, donde se observó un conteo de levaduras de 73.12, 54.51 y 21.94 ufc*1000 vs 108, 79.64 y 73.74 UFC*1000 para los NU de 1.5 y 2 % del NU, respectivamente, en los niveles de 0, 10 y 20% de MM en la mezcla. Se concluye que el 2% de urea en la FES de manzana de desecho, mejora la producción de PV, solo cuando el MM es de 0% en la mezcla. El MM en FES de manzana de desecho mejoró la digestibilidad pero disminuyó la PC, PV y DO.

MATERIALES Y MÉTODOS

En base a la composición bromatológica de manzana de desecho y a la respuesta favorable encontrada en la producción de PV en la elaboración de Manzarina MD del trabajo anterior, se desarrolló el siguiente estudio:

Localización del Área de Estudio

Este segundo experimento de FES con manzana de desecho se desarrolló en el laboratorio de procesados para la alimentación animal, en tanto que los análisis químicos se realizaron en laboratorio de nutrición animal, ambos pertenecientes a la Facultad de Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua.

Metodología del trabajo

Se prepararon muestras de manzana de desecho molida de un Kg adicionadas según el tratamiento con 1.5 o 2% de urea (NU), 0.20 o 0.26% de sulfato de amonio y 0.5% de un suplemento vitamínico y mineral, 10% de rastrojo de maíz adicionadas con 0, 10 y 20% de maíz molido (MM). Una vez preparadas, las muestras fueron sometidas a fermentación en piso de concreto bajo condiciones aeróbicas y de temperatura ambiente en un invernadero y volteadas cada 2 h durante el día para oxigenarlas y estimular la respiración de los microorganismos aerobios siguiendo las indicaciones de (Fundora *et al.*, 1996).

Una vez que las muestras se fermentaron y perdieron la humedad suficiente para su almacenamiento, fueron molidas en un molino Wiley^{MR} con malla de un mm para su posterior análisis físico y bromatológico en laboratorio.

Tratamientos

Fueron utilizados seis tratamientos diseñados de acuerdo como se indica en el (Cuadro 3).

CUADRO 3. DISEÑO DE TRATAMIENTOS CON MANZANA DE DESECHO, NIVELES DE UREA Y MAÍZ MOLIDO PARA PRODUCCIÓN DE PROTEINA MICROBIANA POR MEDIO DE FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO.

Tratamientos	Ingredientes, %					
	Manzana desecho	Urea	Maíz molido	Rastrojo de maíz	Sulfato de amonio	Vits.y Mins.
1	87.80	1.5	0	10	0.20	0.50
2	77.80	1.5	10	10	0.20	0.50
3	67.80	1.5	20	10	0.20	0.50
4	87.80	2.0	0	10	0.26	0.50
5	77.80	2.0	10	10	0.26	0.50
6	67.80	2.0	20	10	0.26	0.50

Variables Evaluadas

Las variables evaluadas en laboratorio fueron FDN, FDA, PC y PV, utilizando las técnicas descritas en (AOAC, 2000). La digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS) por el método de (Tilley y Terry, 1963).

Para la densidad óptica (DO) de levaduras se peso 1 g de la muestra seca mezclado en solución salina de NaCl al 0.1%, agitándolo durante 10 min, posteriormente se filtro en 4 gasas y finalmente se procedió al conteo de levaduras de acuerdo al número de diluciones requeridas para su medición al microscopio por DO $\lambda = 650$ nm mediante una cámara de Neubauer según Valiño *et al.*, (1996).

Análisis Estadístico del Experimento

Para realizar los análisis estadísticos de los datos obtenidos, se utilizó el procedimiento GLM (SAS, 2002).

Diseño Experimental

Se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2x3, donde se consideraron como efectos fijos dos NU, los tres niveles de MM y su interacción (NU*MM); el efecto aleatorio de parcela dentro de cada tratamiento. Las variables de respuesta fueron PC; PV; DO, DIVMS; FDN y FDA.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Proteína Cruda (PC)

Se encontró interacción ($P < 0.05$) para PC debido a que en la medida que se adicionó MM, el contenido de esta variable se redujo en ambos NU, sin embargo; los valores fueron superiores con el 2 % de NU en 24.80 ± 0.29 , 19.28 ± 2.04 y $19.80 \pm 2.04\%$ vs 17.31 ± 2.04 , 16.24 ± 2.04 y $16.74 \pm 2.04\%$ de PC del 1.5% del NU para los niveles de 0, 10 y 20% de MM. Estos resultados coinciden con los encontrados por Elías y Lezcano (1994) en la utilización de MM en la fermentación de la caña quienes mencionaron que la PC se redujo de 16.5 a 15.3% con 0 y 20% de MM en la elaboración de Sacchamaíz (harina de caña fermentada con maíz molido) con 1.5% de urea. Sin embargo, la tendencia en los valores estimados en la PC con 0% de maíz coinciden con los reportados por Hang *et al.*, (1981) en la FES de BM para la producción de etanol con el uso único de inóculo *Saccharomyces cerevisiae* en el proceso, mencionando que la PC se elevó de 6 a 9%. En cambio Joshi y Sandhu (1996) reportaron valores del 15 al 18% de PC con el empleo de diferentes levaduras en FES de BM.

Proteína Verdadera (PV)

Hubo efecto de interacción ($P < 0.01$) entre NU y MM, la cual disminuyó cuando se incrementó el nivel de MM, aunque los valores de esta variable con el 2% de NU se mantuvieron por arriba de (19.91 ± 0.53 , 12.76 ± 0.53 y $11.97 \pm 0.53\%$) en comparación a los de 1.5% del NU (10.06 ± 0.53 , 11.66 ± 0.53 y $8.32 \pm 0.53\%$) para los niveles 0, 10 y 20% de MM. En contraste (Elías y Lezcano (1994), encontraron incrementos proporcionales a medida que se aumentó el MM de 0 a 30% en caña de azúcar que fluctuó entre 3.9 y 7% de PV.

El alto contenido de PV en los tratamientos sin MM pudo haberse originado por el crecimiento en biomasa microbiana, particularmente de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* debido a que estas presentan una alta preferencia por los subproductos de manzana que llegan a elevar el contenido de PV hasta tres veces más el valor de la PC del sustrato (Joshi y Sandhu, 1996).

Wang *et al.*, (2004) mencionaron que el jugo de manzana contiene cerca del 70% de fructosa del total de azúcares fermentables (100 a 150 g/L) más glucosa y sucrosa, donde si los factores para crecimiento microbiano son favorables, la fermentación puede durar hasta 170 h hasta el agotamiento de cada uno de los azúcares y la biomasa producida alcanzara su máximo desarrollo. En consecuencia, el resultado que se obtuvo en el nitrógeno proteico y al mismo tiempo en la PV sugiere la magnitud de que estos indicadores dependen de la relación entre el nivel de urea utilizado y la temperatura (Lezcano y Elías, 1992).

Este efecto pudo ser observado particularmente en el tratamiento con el 2% de urea sin la utilización de MM que llegó a duplicarse en relación al 1.5%.

Fibra Detergente Neutro

La FDN tuvo interacción ($P < 0.01$) por los factores involucrados debido a que se redujo su contenido al incorporar el MM en la mezcla, aunque fue mayor para el nivel 0% de MM, conteniendo 1.5% del NU en comparación a la mezcla con 2% del NU (63.38 ± 2.04 vs $49.46 \pm 2.04\%$) respectivamente, la cual disminuyó en la misma proporción a medida que se adicionó el MM en la manzana de desecho.

Fibra Detergente Ácido

Se encontró interacción ($P < 0.01$) para FDA y FDN, ya que su contenido disminuyó al adicionar MM, pero fue superior al 1.5% del NU en el 0% de MM ($47.86 \pm 1.23\%$) vs $37.60 \pm 2.04\%$ del 2% del NU y 0% de MM, teniendo una caída drástica con el incremento de MM en ambos NU.

Digestibilidad *in vitro* de la Materia Seca (DIVMS)

En la DIVMS hubo diferencia ($P < 0.01$) para en NU, debido a que su contenidos tuvieron valores de 77.11 ± 2.38 y 71.56 ± 1.67 % para el 1.5 y 2% del NU. Para nivel de MM se encontró efecto favorable ($P < 0.01$) al adicionar 10 y 20% de MM en la mezcla, la cual se incrementó al incorporar MM en valores de 68 ± 2.04 , 76 ± 2.04 y 78 ± 2.04 % para los niveles de 0, 10 y 20% de MM respectivamente.

Densidad Óptica (DO)

Para la DO hubo interacción ($P < 0.02$) entre los factores NU y MM, la cual disminuyó a medida que se incrementó el MM, donde se observó un conteo de levaduras de 73.12 ± 2.91 , 54.51 ± 2.91 y 21.94 ± 2.91 UFC*1000 vs108, 79.64 ± 2.38 y 73.74 ± 2.38 UFC*1000 para los NU de 1.5 y 2% del UN respectivamente, en los niveles de 0, 10 y 20% de MM en la mezcla Elías y Lezcano (1994) mencionaron que la inclusión de maíz en caña de azúcar no mejoró la producción de levaduras al considerar que el maíz tiene alto contenido de almidones y bajo contenido de carbohidratos solubles en agua, mismos que son aportados por la caña de azúcar, situación que pudo haberse presentado debido al alto contenido de carbohidratos fermentables que presenta la manzana de desecho.

En la caña de azúcar la procedencia de microorganismos diferentes a las levaduras como Bacterias gram- está relacionada con los grados de contaminación de suelo, polvo, agua, manipulación del laboreo, cosecha troceado y traslado (Valiño *et al.*, 1994), situación a la que la manzana de desecho no está exenta. Así mismo, es posible que los valores elevados de PV obtenidos se deban no solamente al conjunto de levaduras, sino que también esta se pudo haber originado por el desarrollo de otros microorganismos principalmente bacterias las cuales no se identificaron en este trabajo. Por otro lado en cuanto a la utilización de manzana de desecho para la elaboración de Manzarina MD, se propone mezclar las cantidades descritas en el (Cuadro 4).

CUADRO 4. FORMULACIÓN DE MANZARINA MD. CON MANZANA DE DESECHO.

Ingredientes	Base Húmeda %
Manzana molida	87.30
Rastrojo de maíz	10.00
Urea	2.00
Sulfato de amonio	0.26
Premezcla vitaminas y minerales	0.50
Total	100.00

MD= Manzana de desecho

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- 1.-La proteína cruda disminuyó a medida que se incrementó el porcentaje de maíz molido en manzana fermentada sin importar el nivel de urea en los tratamientos.
- 2.-Con la inclusión de 2% de urea en la elaboración de Manzarina MD por fermentación en estado sólido, se produjo la mayor cantidad de proteína verdadera sin utilizar maíz molido.
- 3.-Los niveles elevados de urea y maíz en manzana de desecho por fermentación en estado sólido no mejoraron la producción de levaduras.
- 4.-De acuerdo con la producción de proteína verdadera presentada en tratamientos con dosis elevadas de urea y maíz es posible utilizar estas mismas cantidades cuando se quiera aumentar la materia seca de la manzana fermentada, ya que se tendrían porcentajes aceptables de proteína verdadera.

CAPITULO 3. NIVELES DE UREA Y MAÍZ MOLIDO EN LA FERMENTACIÓN DE
BAGAZO DE MANZANA PARA LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA MICROBIAN

Agustín Becerra Bernal (†)

RESUMEN

En este experimento, cuyo objetivo fue producir Proteína microbiana mediante FES a partir de bagazo de manzana (BM) con diferentes niveles NU y MM en la mezcla, 30 muestras de un Kg de BM c/u, fueron distribuidas en un diseño completamente al azar con arreglo factorial de 2x3, utilizando 1.5 y 2% de NU y 0, 10 y 20% de MM, adicionadas con 10% de rastrojo de maíz, 0.20 o 0.26% de sulfato de amonio y 0.50% de una premezcla de vitaminas y minerales. Hubo interacción para PC ($P<0.01$) debido a que su contenido se redujo por efecto de los factores MM y NU con valores de 20.72, 20.03 y 19.03% vs 29.61, 22.06 y 20.87% para los niveles de MM (0, 10 y 20%) y de NU (1.5 y 2%), respectivamente, lo cual indica el alto nivel de respuesta del BM en la capacidad de retención de nitrógeno no proteico (NNP) del BM sin MM. Se encontró interacción para PV ($P<0.01$) por los factores MM y NU, la cual disminuyó a medida que se incrementó el MM en contenidos de 13.85, 12.44, 11.63 vs 19.35, 13.82 y 12.72% para los niveles de 0, 10 y 20% de MM y de 1.5 y 2% de NU, respectivamente, mostrando en este sentido que en cierto modo la urea en el BM estimuló sustancialmente la producción de proteína microbiana sin la ayuda del MM. La FDN disminuyó ($P<0.01$) por efecto de la adición de MM, la cual se redujo, con valores de 66.64, 55.52 y 47.42%, en los niveles 0, 10 y 20%, respectivamente en la mezcla de BM. No hubo respuesta en esta variable por el incremento del NU ($P>0.05$) en los tratamientos utilizados durante la FES de BM. La FDA tuvo efecto de NU ($P<0.01$) la cual aumentó de 36.47 y 42.91 %, al elevar de 1.5 a 2% el NU. La FDA disminuyó ($P<0.01$) a medida que este se incrementó el MM (53.27, 35.07 y 30.75%) para los niveles 0, 10 y 20% de MM, respectivamente. Se encontró efecto ($P<0.05$) en la digestibilidad *In Vitro* de la materia orgánica (DIVMO), la cual se incrementó de 62.20 a 66.75%, cuando se adicionó el 1.5 y 2% del NU en la mezcla respectivamente. También se mejoró esta variable ($P<0.01$) con valores de (59.72, 64.98 y 68.34%) para (0, 10 y 20%) de MM en la mezcla, respectivamente. La DO disminuyó por efecto del NU ($P<0.05$) de 10.65 a 7.28 UFC*1000 para 1.5 y 2

% del NU utilizados, y en forma similar, se redujo ($P < .01$) conforme se aumentó el nivel de MM con valores de 12.86, 7.52 y 6.55 ufc*1000 para 0%, 10% y 20% de MM, respectivamente. Se concluye que el 2% de urea en la FES en bagazo de manzana, mejoró la producción de PV solo cuando el MM fue de 0% en la mezcla. El MM en FES de manzana de desecho mejoró la digestibilidad pero disminuye la PC, PV y DO.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del Área de Estudio

Este tercer experimento de FES con BM, se desarrolló en el laboratorio de procesados para la alimentación animal, en tanto que los análisis químicos se realizaron en laboratorio de nutrición animal, ambos pertenecientes a la Facultad de Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua.

Metodología del Trabajo

Se prepararon muestras de un Kg con BM obtenido después de cuatro días de la extracción de jugo, adicionadas según el tratamiento con 1.5 o 2% de urea (NU), 0.20 o 0.26% de sulfato de amonio y 0.5% de un suplemento vitamínico y mineral, 10% de rastrojo de maíz adicionadas con 0, 10 y 20% de maíz molido (MM).

Posteriormente, las muestras fueron sometidas a fermentación en piso de concreto bajo condiciones aeróbicas y de temperatura ambiente en un invernadero y volteadas cada 2 h durante el día para oxigenarlas y estimular la respiración de los microorganismos aerobios siguiendo las indicaciones de (Fundora *et al.*, 1996). Una vez que las muestras se fermentaron y perdieron la humedad suficiente para su almacenamiento, fueron molidas en un molino Wiley^{MR} con malla de un mm para su posterior análisis físico y bromatológico en laboratorio.

Tratamientos

Se utilizaron seis diferentes tratamientos diseñados según se indica en el (Cuadro 5).

Variables Evaluadas

Las variables evaluadas en laboratorio fueron FDN, FDA, PC y PV, utilizando las técnicas descritas en (AOAC, 2000). La digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica (DIVMO) por el método de (Tilley y Terry, 1963).

CUADRO 5. DISEÑO DE TRATAMIENTOS CON BAGAZO DE MANZANA, NIVELES DE UREA Y MAÍZ MOLIDO PARA PRODUCCIÓN DE PROTEINA MICROBIANA POR MEDIO DE FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO.

Tratamientos	Ingredientes, %					
	Bagazo d Manzana	Urea	Maíz molido	Rastrojo de maíz	Sulfato de amonio	Vits.y Mins.
1	87.80	1.5	0	10	0.20	0.50
2	77.80	1.5	10	10	0.20	0.50
3	67.80	1.5	20	10	0.20	0.50
4	87.80	2.0	0	10	0.26	0.50
5	77.80	2.0	10	10	0.26	0.50
6	67.80	2.0	20	10	0.26	0.50

Para la densidad óptica (DO) de levaduras se pesó un g de la muestra seca mezclado en solución salina de NaCl al 0.1%, agitándolo durante 10 minutos, posteriormente se filtro en 4 gasas y finalmente se procedió al conteo de levaduras de acuerdo al número de diluciones requeridas para su medición al microscopio por DO $\lambda = 650$ nm mediante una cámara de Neubauer según Valiño *et al.*, (1996).

Análisis Estadístico del Experimento

Para realizar los análisis estadísticos, se utilizó el procedimiento GLM (SAS, 2002).

Diseño Experimental

Se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2x3, donde se consideraron como efectos fijos dos NU, los tres niveles de MM y su interacción (NU*MM); el efecto aleatorio de parcela dentro de cada tratamiento. Las variables de respuesta fueron PC; PV; DO; DMS; FDN y FDA.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis Bromatológico del Bagazo de Manzana

En el análisis químico practicado al BM se encontró que el contenido de MS fue de 19.20% y para PC 5.93%, estos rangos coinciden con los reportados por (Hours *et al.*, 1988; Joshi y Sandhu, 1996). El porcentaje de PV fue de 4.51%. Las fracciones FDN y FDA tuvieron promedios de 56.82 y 48.33%, respectivamente; similares a los observados por (Anrique y Paz, 2002) de 60.2% en la FDN y de 48.33% para FDA., también presentó un contenido celular elevado con de 43.18%, en tanto que para hemicelulosa fue bastante bajo de 5.69%, celulosa 30.18%, lignina 28.56% y cenizas de 1.83%. De acuerdo con el bajo contenido de cenizas, el BM ofrece numerosas ventajas que no tienen otros residuos de cosecha como el rastrojo de maíz y la paja de trigo, ya que estos tienen 17.5 y 11.0% de cenizas respectivamente y con muy bajo contenido de azúcares (Soccol *et al.*, 2003).

Proteína Cruda (PC)

Los resultados en esta variable, mostraron interacción para PC ($P < .01$) debido a que su contenido se redujo por efecto de los factores involucrados MM y NU en valores de 20.72 ± 0.50 , 20.03 ± 0.50 y 19.03 ± 0.50 vs 29.61 ± 0.50 , 22.06 ± 0.50 y $20.87 \pm 0.50\%$ para los NU de 1.5 y 2%, lo cual indica el alto nivel de respuesta del BM en la capacidad de retención de NNP y el efecto negativo en esta variable a la inclusión de MM.

Es situación demuestra una cierta ventaja en la elaboración de Manzarina BM al generarse mayor PC sin la el uso de MM cuando el propósito sea producir PC en BM de acuerdo con la respuesta al incremento del NU de 2% en las muestras. Carrasco *et al.*, (1997) encontraron disminuciones en la PC al evaluar la capa y el volteo en la FES de la caña de azúcar, atribuyendo la baja, al efecto del volteado en el sustrato, donde concluyen que el proceso de fermentación puede desarrollarse sin

voltear los sustratos a una altura de capa de 15 cm debido a que en este grosor es donde se encontraron los mayores contenidos de proteína.

Proteína Verdadera (PV)

Se encontró interacción para PV ($p < .01$) por los factores MM y NU, la cual disminuyó a medida que se incrementó el MM y 1.5 y 2% de NU, aunque se observó una tendencia superior en su contenido en el NU de 2% y 0% de MM. Los valores fueron de 13.85 ± 0.53 , 12.44 ± 0.53 , 11.6 ± 0.53 vs 19.35 ± 0.53 , 13.82 ± 0.53 y $12.72 \pm 0.53\%$ para los niveles de 0, 10 y 20% de MM respectivamente, mostrando en este sentido que en cierto modo la urea en el BM estimuló sustancialmente la producción de proteína microbiana. El efecto negativo en la PV al incrementarse el MM en principio pudo haberse originado debido al bajo contenido de carbohidratos solubles del MM (Cheason y Forsberg, 1988), que si bien aumentó la MS, disminuyó la humedad natural del sustrato que pudo limitar el crecimiento de levaduras.

La mayor cantidad de PV con el 2% de urea en el BM, es probable que se haya debido a que hubo mayor disponibilidad de azúcares fermentables ya que puede tener del 9 al 22%, los cuales son utilizados para crecimiento microbiano (Hang *et al.*, 1981) junto con la humedad máxima del BM que favorece la disponibilidad de glucosa y fructosa que son carbohidratos altamente fermentables relacionados con el crecimiento de levaduras y otros microorganismos como bacterias importantes en el aporte de vitaminas, aminoácidos y otros metabolitos (Ngadi y Correia, 1992).

Fibra Detergente Neutro (FDN)

La FDN disminuyó ($P < .01$) por efecto de la adición de MM, la cual se redujo con valores de 66.64 ± 0.76 , 55.52 ± 0.76 y $47.42 \pm 0.76\%$, como era de esperarse cuando se incrementó el MM en los niveles 0, 10 y 20%, respectivamente en la mezcla de BM. No hubo respuesta en esta variable por el incremento del NU ($P > 0.05$) en los tratamientos utilizados con BM durante la FES de BM.

Esta situación pone de manifiesto que los microorganismos utilizan casi la totalidad de los carbohidratos fermentables para su crecimiento y multiplicación (Carrasco *et al.*, 1997) considerándose que los contenidos encontrados de FDN se elevaron debido a la fibra aportada por el RM utilizado en estos tratamientos. Van Soest (1967) menciona que en procesos fermentativos como el ensilado las alteraciones más apreciables se refieren al aumento en las fracciones fibrosas FDN y FDA.

Fibra Detergente Ácido (FDA)

La FDA tuvo efecto de NU ($P < 0.01$) la cual aumentó de 36.47 ± 0.88 y $42.91 \pm 0.88\%$, al elevar de 1.5 y 2% el NU respectivamente, y en relación al nivel de MM la FDA disminuyó ($P < 0.01$) a medida que este se incrementó el MM (53.27 ± 1.08 , 35.07 ± 1.08 y $30.75 \pm 1.08\%$) para los niveles (0, 10 y 20 %) de MM, respectivamente, (Cuadro 6).

Digestibilidad *In Vitro* de la Materia Orgánica (DIVMO)

Se encontró efecto por NU en la DIVMO ($P < 0.01$) (Cuadro 6), la cual se incrementó de 62.20 a 66.75%, cuando se adicionó el 1.5 y 2% del NU en mezcla, respectivamente. También se mejoró esta variable ($P < 0.01$) con valores (59.72 ± 0.86 , 64.98 ± 1.08 y 20%) de MM en la mezcla en la mezcla, respectivamente. Rodríguez *et al.*, (2005) obtuvieron un comportamiento similar al utilizar 1.5% de urea en manzana de desecho fermentada, sin embargo; con el 2% de urea no encontraron efectos significativos en la DMS. Anrique y Paz (2002) encontraron niveles inferiores de DMS de 62% en BM fresco, lo cual demuestra la ventaja de utilizar los niveles evaluados de urea en procesos de FES para elevar la DIVMS. Manterota *et al.*, (1999) reportaron en procesos de FES digestibilidades mayores en dietas con alto contenido de BM (40 al 80%) comparadas con la dieta basal pero que no superaron el 50% de DIVMS. Estos resultados indican que bajo las condiciones en las que se desarrollo el experimento, el valor nutricional del BM pudo mejorarse sustancialmente por efecto en el aumento del NU, al mismo tiempo que se incrementó el MM mejorando con esto el valor energético de producto.

CUADRO 6. RESPUESTA DEL NIVEL DE UREA SOBRE LA DIMO, FDA Y DO EN LA PREPARACIÓN DE MANZARINA BM DURANTE LA FES.

Variable	Urea (%)		P<value
	1.5	2.0	
DIVMO (%)	62.21±.70 ^b	66.76±.70 ^a	P<.01
FDA (%)	36.47±.89 ^b	42.91±.89 ^a	P<.01
DO(UFC*1000)	10.66±1.1 ^b	7.29±1.1 ^a	P<.05

**p<.01

^{a, b} Letras diferentes entre columnas difieren significativamente (P<.05)

MO= Materia orgánica, FDN= Fibra detergente neutro, FDA= Fibra detergente ácido y DOUFC*1000= Densidad óptica en unidades formadoras de colonia*1000

Densidad Óptica (DO)

La DO disminuyó por efecto del NU ($P < 0.05$) de 10.65 ± 1.09 a 7.28 ± 1.09 UFC*1000 para 1.5 y 2% del NU utilizados, y en forma similar, se redujo ($P < 0.01$) conforme se aumentó el nivel de MM con valores de 12.86 ± 1.34 , 7.52 ± 1.34 y 6.55 ± 1.34 UFC*1000 para 0%, 10% y 20% de MM, respectivamente. Con estos datos se puede demostrar que los carbohidratos de los cereales como el maíz no son un sustrato donde desarrollen con éxito las levaduras, pero si bacterias productoras de ácido láctico (Bocourt, *et al.*, 1998). Rodríguez *et al.*, (2005) encontraron efecto similar en la disminución de la DO de levaduras (108 ± 1.34 y 75 ± 1.34 UFC*1000) en manzana de desecho fermentada al incrementar el NU y el MM en las mismas cantidades; sin embargo, los parámetros encontrados en BM fermentado fueron inferiores 10.66 ± 1.34 y 7.29 ± 1.34 para 1.5 y 2% del NU utilizado. Es posible que estas diferencias se hayan debido a que en la manzana de desecho se presenta un mayor contenido de azúcares que los que se encuentran en el BM.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- 1.-En bagazo de manzana, el incremento del 2% de urea en la fermentación en estado sólido, generó mayor cantidad de proteína verdadera y disminuyó con la adición de maíz molido a la mezcla.
- 2.-La digestibilidad de la materia orgánica se mejoró a medida que se adicionó maíz molido y urea.
- 3.-La fibra detergente neutro y fibra detergente ácido disminuyeron con el incremento de maíz molido y con el nivel de 1.5 % de urea.
- 4.-La densidad óptica mostró una disminución cuando se adicionó maíz molido.

CAPITULO 4. TIEMPO DE UTILIZACIÓN Y NIVEL DE MAÍZ MOLIDO EN LA
FERMENTACIÓN DE BAGAZO DE MANZANA PARA LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA
MICROBIANA

Agustín Becerra Bernal (†)

RESUMEN

Con el objetivo de producir PM a partir de BM con diferentes TP y MM fue utilizado un diseño completamente al azar con arreglo factorial 4X3, donde se utilizaron muestras de un Kg de bagazo de manzana (BM) mezclado con tres niveles de MM (0, 10 y 20%) a cuatro TP (0, 24, 48 y 72 h después de la extracción del jugo) más 1.5% de urea, 0.20% sulfato de amonio y 0.50% de una premezcla de vitaminas y minerales. Para PC, se encontró interacción ($P<0.01$) por los factores involucrados, la cual generó la mayor cantidad a las 24 y 48 h de TP con el nivel 0% de MM, con valores de 25.44 y 26.40%, mientras que en los TP 0 y 72 h, los promedios se mantuvieron por abajo de estos, en rangos del 20 al 21%. La PV presentó interacción ($P<0.01$) por los factores MM y TP, la cual mostró promedios de 12.80, 14.38, 15.19 y 13.35% para las 0, 24, 48 y 72 h de TP respectivamente. Así mismo, esta variable mostró los valores más elevados en tratamientos con 0% de MM a las 0, 24, 48 y 72 h de TP de 15.28, 16.56, 19.37 y 16.16%, respectivamente. La FDN tuvo efecto ($P<0.01$) debido a que se observó una disminución por el TP para las 48 h de TP con valor de 46.18% vs el 53.76, 51.5 y 53.06% de las 0, 24 y 72 h de TP respectivamente. En relación al nivel de MM, la FDN se redujo ($P<0.01$) con el aumento de MM con valores de 59.05, 52.29 y 42.03%. La FDA, mostró interacción en respuesta al TP y nivel de MM ($P<0.01$), la cual se redujo en 29.90 y 23.41% en los TP 24 y 48 h cuando se incrementó el nivel de MM en la mezcla. Para la DIVMO, se obtuvo interacción ($P<0.05$), en respuesta a los factores involucrados TP y nivel de MM, en la cual, su valor se mejoró en la medida que se prolongó el TP en 0, 24, 48 y 72 h con valores de 64, 68.34, 70.53 y 74.97% en promedio, para los niveles de MM, respectivamente. En la DO se encontró interacción ($P<0.01$), en respuesta al TP y nivel de MM, la cual mostró el mayor conteo de levaduras a las 0 h de TP con 0% de MM (15.84 UFC*1000). Se concluye que a medida que se pospuso el TP del BM la PV disminuyó probablemente por un descenso en el pH. La DIVMO tuvo tendencia a incrementarse en la medida que se adicionó MM.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del Área de Estudio

Este experimento de FES con bagazo de manzana, se desarrolló en el laboratorio de procesados para la alimentación animal, en tanto que los análisis químicos se realizaron en laboratorio de nutrición animal, ambos pertenecientes a la Facultad de Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua.

Metodología del Trabajo

Se prepararon muestras de un Kg con bagazo de manzana (BM) recolectado después de la extracción de jugo adicionadas con 1.5% de urea, 0.20% de sulfato de amonio y 0.5% de un suplemento vitamínico y mineral, y combinadas con 0, 10 o 20% de maíz molido (MM) a cuatro tiempos (0, 24, 48 y 72 h) previos a la fermentación (TP). Una vez preparadas, las muestras fueron sometidas a fermentación en piso de concreto bajo condiciones aeróbicas y de temperatura ambiente en un invernadero y volteadas cada 2 h durante el día para oxigenarlas y estimular la respiración de los microorganismos aerobios siguiendo las indicaciones de (Fundora *et al.*, 1996).

Una vez que las muestras se fermentaron y perdieron la humedad suficiente para su almacenamiento, fueron molidas en un molino Wiley^{MR} con malla de un mm para su posterior análisis físico y bromatológico en laboratorio.

Tratamientos

Fueron utilizadas 30 muestras de BM de 1 kg distribuidas en seis diferentes tratamientos con 1.5 o 2% del NU y 0, 10 y 20% de MM diseñados de acuerdo con el (Cuadro 7).

Variables Evaluadas

Las variables evaluadas en laboratorio fueron FDN, FDA, PC y PV, utilizando las técnicas descritas en (AOAC, 2000). La DIVMO por el método de (Tilley y Terry, 1963).

CUADRO 7. DISEÑO DE TRATAMIENTOS CON BAGAZO DE MANZANA, TIEMPO DE PREPARACIÓN Y MAÍZ MOLIDO PARA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA MICROBIANA POR MEDIO DE FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO.

Tratamientos	Tiempo (h)	Ingredientes, %				
		Bagazo de manzana	Urea	Maíz molido	Sulfato de amonio	Vits. y Mins.
1	0	98.30	1.5	0	0.20	0.50
2	0	88.30	1.5	10	0.20	0.50
3	0	78.30	1.5	20	0.20	0.50
4	24	98.30	1.5	0	0.20	0.50
5	24	88.30	1.5	10	0.20	0.50
6	24	78.30	1.5	20	0.20	0.50
7	48	98.30	1.5	0	0.20	0.50
8	48	88.30	1.5	10	0.20	0.50
9	48	78.30	1.5	20	0.20	0.50
10	72	898.30	1.5	0	0.20	0.50
11	72	88.30	1.5	10	0.20	0.50
12	72	78.30	1.5	20	0.20	0.50

Para la densidad óptica (DO) de levaduras se peso 1 gramo de la muestra seca mezclado en solución salina de NaCl al 0.1%, agitándolo durante 10 minutos, posteriormente se filtro en 4 gasas y finalmente se procedió al conteo de levaduras de acuerdo al número de diluciones requeridas para su medición al microscopio por DO $\lambda = 650$ nm mediante una cámara de Neubauer según Valiño *et al.*, (1996).

Análisis Estadístico del Experimento

Para realizar los análisis estadísticos, se utilizo el procedimiento GLM del estadístico (SAS, 2002).

Diseño Experimental

Se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo de tratamientos factorial 3x4, donde se consideraron como efectos fijos tres niveles MM y cuatro TP; su interacción (MM*TP) y el efecto aleatorio de parcela dentro de cada tratamiento. Las variables respuesta fueron PC; PV; DO; DMO; FDN y FDA.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Proteína Cruda (PC)

Para PC, se encontró interacción ($P < 0.01$) por factores involucrados, la cual generó la mayor cantidad de este nutriente, se generó entre las 24 y 48 h de TP con el nivel 0% de MM, con valores de 25.44 ± 0.85 y $26.40 \pm 0.85\%$, mientras que en los TP 0 y 72 h, los promedios se mantuvieron por abajo de estos en rangos del 20 ± 0.85 al $21 \pm 0.85\%$, respectivamente. Carrasco *et al.*, (1997) mencionaron que este efecto puede ser explicado por la realización del volteo en el sustrato, debido a que cuando este no se lleva a cabo, la eficiencia de la fermentación se puede incrementar. Sin embargo; es importante señalar que la PC con el nivel cero de MM en los cuatro TP superó a los tratamientos con MM y obtuvo su valor máximo al día tres de TP (26.48%), mientras que el más bajo correspondió al día uno del TP 21.45%. Este efecto probablemente se deba a que en este tiempo de reposo el BM los microorganismos nativos del sustrato presentan su máximo desarrollo después del segundo día, que puede estar muy relacionado con los resultados en los análisis de PV practicados al BM, donde se observó que para los días uno y dos, los valores fueron de 4.28% para ambos, en tanto que para los días tres y cuatro su promedio se incrementó a 4.74%, respectivamente.

Proteína Verdadera (PV)

La PV presentó interacción ($P < 0.01$) por los factores MM y TP, la cual mostró promedios de, (12.80, 14.38, 15.19 y 13.35%) para las 0, 24, 48 y 72 h de TP respectivamente. Así mismo, esta variable mostró los valores más elevados en tratamientos con 0% de MM a las 0, 24, 48 y 72 h de TP de 15.28, 16.56, 19.37 y 16.16%, respectivamente, así mismo, se observó en general una disminución gradual de esta variable por incremento del 20% de MM en los cuatro TP, Indicando de acuerdo a estos resultados que el TP ideal para la preparación de Manzarina BM se encuentra entre las 24 y 48 h sin el uso de MM.

Joshi y Sandhu (1996) mencionaron que la proteína inicial del BM sin fermentar fue incrementada de 5.8 a 18% por medio de la FES de BM con levaduras. La PV detectada en el BM utilizado en el experimento mostró el valor mínimo (15.28%) al día uno de TP y (19.38%) al día dos de TP, que de acuerdo a los valores alcanzados en esta variable la PV se elevó de dos a cuatro veces, probablemente, con la ayuda de los aditivos utilizados, dado el bajo contenido de PC que presentó el BM.

Ramos *et al.*, (2005) reportan valores similares de PV en la evaluación de diferentes fuentes energéticas como MM, sorgo molido, pulidura de arroz y pulpa de cítricos en FES de caña de azúcar, resultando con mayor porcentaje de PV los tratamientos con los tres cereales sorgo y maíz molido (12.65, 12.80 y 13.72%), respectivamente y el valor más bajo (10.62%) para pulpa de cítricos; estos resultados muestran las ventajas de usar cereales en procesos de FES, aunque en este trabajo no se encontró respuesta favorable por la adición de MM sobre el contenido de PC y PV.

Fibra Detergente Neutro (FDN)

La FDN tuvo efecto significativo ($P < 0.01$) debido a que se observó una disminución por el TP para el día tres con valor de 46.18% vs 53.76 ± 1.26 , 51.5 ± 1.26 y $53.00 \pm 1.26\%$ de los días uno, dos y cuatro del TP respectivamente, y en relación al nivel de MM, la FDN se redujo ($P < 0.01$) con la incorporación del 0, 10 y 20% de MM con valores de 59.05 ± 1.09 , 52.29 ± 1.09 y $42.03 \pm 1.09\%$, respectivamente.

Fibra Detergente Ácido (FDA)

La FDA, mostró interacción ($P < 0.01$) en respuesta al TP y nivel de MM, la cual se redujo con valores de 29.90 ± 1.22 y $23.41 \pm 1.22\%$ para los TP 24 y 48 h respectivamente, al incrementar el nivel de MM en la mezcla de BM, con valores similares para los TP 0 y 24 h de 38.70 ± 1.22 y $36.91 \pm 1.22\%$, respectivamente, mientras que sus valores con 0% de MM no tuvieron cambios sustanciales por TP.

En estudios con BM ensilado, Anrique y Paz (2003) encontraron incrementos de 18.4% en la FDA en comparación con BM sin fermentar, lo que sugiere que en los procesos de FES, los azúcares fermentables son los más utilizados por los microorganismos. Esta respuesta es similar a lo observado en otros estudios al ensilar forrajes cuando no han sido premarchitados, (Alibes *et al.*, 1984).

Digestibilidad de *In Vitro* de la Materia Orgánica (DIVMO)

Para la DIVMO, se obtuvo interacción ($P < 0.05$) en respuesta al TP y nivel de MM, debido a que su valor se mejoró en la medida que se prolongó el TP 0, 24, 48 y 72 h con valores de 64 ± 2.45 , 70.53 ± 2.45 , 70.53 ± 2.45 y 74.97 ± 2.45 en promedio para los diferentes niveles de MM respectivamente, observándose en estos resultados que la DIVMO se mantuvo constante en los días dos y tres, mientras que la DIVMO en el primer día se incrementó sustancialmente conforme se adicionó MM, en tanto que para el día cuatro, tendió a aumentar ligeramente con el incremento de MM.

La igualdad en la DIVMO en los días dos, tres y cuatro con el nivel 0% de MM en BM fermentado como sustrato único, es probable que se haya debido a que en los tratamientos sin MM, la DIVMO fue estimulada por la adición de urea principalmente, que también pudo ser atribuible a su alta digestibilidad superior al 65% (NAS, 1983).

Densidad Óptica (DO)

En la DO se encontró interacción en respuesta al TP y nivel de MM ($P < 0.01$), la cual mostró el mayor conteo de levaduras a las 0 h de TP con 0 h con 0% de MM (15.84 ± 3.46 UFC*1000), mientras que en el resto de los tratamientos se mantuvo en un rango de 2.5 ± 3.46 a 8.6 ± 3.46 UFC*1000, independientemente del nivel de MM utilizado en el BM.

Hang *et al.*, (1981) mencionaron que la FES de BM está influenciada por la temperatura en la producción de alcohol y el consumo de azúcares por las levaduras a una temperatura de 30 °C. Es evidente que bajo las condiciones medioambientales en que se desarrolló el estudio no se proporcionó

la temperatura ideal que favoreciera el crecimiento de levaduras, lo cual pudo ser el reflejo de la baja DO encontrada y la nula correlación con la PV. La respuesta contrastante en la DO de levaduras como indicador de PV posiblemente también se haya debido a la presencia de bacterias acidolácticas como *Lactobacillus amylophilus* L(+) que proliferan en presencia de humedad y abundancia de almidones junto con fuentes de nitrógeno en FES (Altaf *et al.*, 2005). Por otra parte, Elías y Lezcano (1994) mencionaron que la variación en el conteo de levaduras en la FES de caña de azúcar cuando se ha utilizado MM se dificulta debido a que se forma alguna suspensión coloidal que mantienen una constante turbidez del líquido durante el proceso de determinación de la DO. Estas condiciones, también pudieron inhibir el desarrollo de levaduras y estimular el crecimiento de bacterias aerobias, las cuales no fueron cuantificadas.

En resumen del uso de BM en FES, se puede mencionar que la mejor respuesta a la producción de PM se observó con los niveles elevados de urea sin MM, donde se podrán obtener valores aproximados de PC, PV, FDA y FDA de 24, 19, 57 y 48%, respectivamente, formulándolo de acuerdo como se indica en el (Cuadro 8).

CUADRO 8. COMPOSICIÓN RECOMENDADA DE LA MEZCLA PARA PRODUCCIÓN DE MANZARINA BM.

Ingredientes	Base Húmeda, %
Bagazo de manzana	97.24
Urea	2.00
Sulfato de amonio	0.26
Premezcla vitaminas y minerales	0.50
Total	100.00

BM= Bagazo de manzana

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- 1.-La proteína cruda y la proteína verdadera disminuyeron a medida que se pospuso el tiempo de utilización del bagazo de manzana, probablemente por el descenso en el pH.
- 2.-La digestibilidad *In Vitro* de la materia orgánica en bagazo de manzana fermentado fue mejor cuando se incrementó el maíz molido y a partir del segundo día.
- 3.-La fibra detergente ácido disminuyó con cuando se utilizó maíz molido y ligeramente por efecto de tiempo.
- 4.-La densidad óptica fue mayor al día uno sin el uso de maíz molido y se redujo después del día dos a cualquier nivel de maíz molido.

CAPITULO 5. PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA MICROBIANA A PARTIR DE MANZANA
DE DESECHO ADICIONADA CON UREA Y PASTA DE SOYA

Daniel Díaz Plascencia

RESUMEN

Con el propósito de evaluar el efecto del nivel de urea y pasta de soja en la fermentación en estado sólido (FES) de subproductos de manzana para la producción de proteína microbial, dos experimentos fueron realizados a temperatura controlada de 36 y 28 °C. En ambos casos fueron utilizados cuatro tratamientos conteniendo manzana de desecho más 1.5 o 2% de urea (UR), así como 3.5 o 7% de pasta de soja (PS) en la mezcla para el primer experimento y 0 y 3.5% de PS para el segundo. Todas las mezclas fueron adicionadas con 0.2% de sulfato de amonio y 0.5% de un suplemento mineral y vitamínico. Cada tratamiento contó con 6 repeticiones consistentes de charolas de un kilogramo de muestra, las cuales fueron depositadas en una incubadora a temperatura controlada de 36 y 28 °C durante 180 y 196 h, respectivamente, con mezclado cada 6 h y muestreos cada 12 h. Las variables evaluadas fueron pH, proteína cruda (PC), proteína verdadera (PV), y densidad óptica de levaduras (DO). Los resultados mostraron un incremento en el pH a partir de las 48 h de inicio de la fermentación y solo se detectó efecto de adición de PS en el segundo experimento ($P < 0.01$), con valores de 4.9 y 5.7 para los niveles de 0 y 3.5% de PS en la mezcla, respectivamente, en tanto que los valores detectados por efecto de UR ($P > 0.05$), fueron de 5.5 y 5.1 para los niveles de 1.5 y 2% de UR en la mezcla, respectivamente. La PC al final de la fermentación mostró diferencia ($P < 0.01$), en ambos experimentos por efecto de la adición de PS con valores de 42.87 y 47.06% para los niveles de 3.5 y 7% de PS a los 36 °C así como, 76.18 y 55.57% de PC con 0 y 3.5% de PS en la mezcla a los 28 °C respectivamente. Igualmente, la PC mostró efecto por la adición de UR a la mezcla ($P < 0.01$), con valores de 42.94 y 46.93% de PC a los 36 °C así como, 61.90 y 69.85% de PC a los 28 °C para los niveles de 1.5 y 2% de UR en la mezcla, respectivamente. La PV al final de la fermentación a 36 °C disminuyó ($P < 0.01$), de 38.62 a 32.18% cuando la PS en la mezcla se aumentó de 3.5 a 7% y aumentó de 33.72 a 37.08% cuando la UR se incrementó en la mezcla de 1.5 a 2%. En el experimento a 28 °C

de fermentación, hubo una interacción para PV entre los factores UR y PS indicando que hay una respuesta favorable en la producción de PV por la adición de 3.5% de PS a la mezcla solo cuando el nivel de UR en la misma es de 1.5%. Se concluye que la adición de UR hasta en un 2% en la fermentación en estado sólido de manzana favorece la producción de PC y PV en tanto que la PS solo mejora la PV cuando la UR no excede del 1.5% de la mezcla.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del Área de Estudio

Esta investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua.

Trabajo Experimental y Tratamientos

El trabajo se dividió en dos experimentos, los cuales tuvieron cuatro tratamientos, estos consistieron en una mezcla a base de manzana de desecho molida que fue el medio de cultivo; las mezclas (tratamientos) se prepararon con los siguientes ingredientes, manzana de desecho molida, pasta de soya, urea, sulfato de amonio y una mezcla comercial de minerales Ganatec 25^{MR}, (Cuadro 9). Las cantidades por tratamiento se describen en porcentaje en los (Cuadros 10 y 11) para el experimento I y II respectivamente.

Cada tratamiento tuvo 6 repeticiones en charolas de aluminio en el experimento I y charolas de plástico en el experimento II, se agregó 1 kg de la mezcla en cada charola, para su fermentación en una incubadora con temperatura controlada de 36 °C para el primer experimento y 28 °C para el segundo y por cada tratamiento se dejó una charola con la mezcla de manzana para evaluar la pérdida de humedad.

Durante el periodo de fermentación, fueron tomadas 6 muestras por tratamiento para los dos experimentos una por cada charola de cada tratamiento, de igual modo para el segundo experimento en los siguientes tiempos 0,12, 15, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96,108, 120, 132, 144, 156, 168, 180 y 192 h.

Se determinó el pH con un potenciómetro manual para cada uno de los tratamientos y se realizó un mezclado, en cada una de las charolas en los tiempos anteriormente mencionados, para favorecer la oxigenación y el secado de las mezclas y se tomó una muestra por tratamiento, para posteriormente evaluar la densidad óptica contando la producción de levaduras con una cámara de Neubauer.

CUADRO 9. COMPOSICIÓN DE LA MEZCLA MINERAL GANATEC 25^{MR 1}

Ingrediente	Cantidad
Proteína Cruda (PC), %	60
Fósforo, g	500
Calcio, g	4,300
Sodio, g	1,790
Azufre, g	130
Magnesio, g	180
Potasio, g	70
Manganeso, g	37,50
Zinc, g	37,50
Hierro, g	50
Cobre, g	7,50
Yodo, mg	750
Selenio, mg	150
Cobalto, mg	150
Bicarbonato de Sodio, g	3,000
Monensina Sodica al 10%, g	28,5
Antibiótico, g	10
Vitamina A, UI	4'500,000
Vitamina D3, UI	750,000
Vitamina E, UI	1,800

¹Indicaciones de uso: 25 Kg. de GANATEC 25 / ton de alimento balanceado

CUADRO 10. COMPOSICIÓN DE CADA UNO DE LOS TRATAMIENTOS DEL EXPERIMENTO I

Ingredientes ¹ %	Tratamientos			
	I	II	III	IV
Manzana molida	94.3	90.8	93.1	89.6
Pasta de soya	3.5	7	3.5	7
Urea	1.5	1.5	2	2
Sulfato de amonio	0.2	0.2	0.4	0.4
Mezcla mineral	0.5	0.5	1	1

¹ Cantidades expresadas en porcentaje

CUADRO 11. COMPOSICIÓN DE CADA UNO DE LOS TRATAMIENTOS DEL EXPERIMENTO II

Ingredientes ¹ %	Tratamientos			
	I	II	III	IV
Manzana molida	97.8	94.3	96.6	93.1
Pasta de soya	0	3.5	0	3.5
Urea	1.5	1.5	2	2
Sulfato de amonio	0.2	0.2	0.4	0.4
Mezcla mineral	0.5	0.5	1	1

¹Cantidades expresadas en porcentaje

Material y Equipo Experimental

El material utilizado para este experimento fue manzana de desecho de la variedad *Golden delicious*, pasta de soya, premezcla de minerales y vitaminas Ganatec 25^{MR}, urea, sulfato de amonio, cloruro de sodio al 0.9% Pisa^{MR}, indicador de proteína (verde de bromo cresol con rojo de metilo), ácido sulfúrico valorado al 0.0491, ácido sulfúrico concentrado, ácido bórico al 4%, hidróxido de sodio al 50%, mezcla reactivo de selenio, matraz erlenmeyer, vasos de precipitado, picadora estacionaria, molino Willey^{MR}, balanza analítica, Bascula Metiller Toledo^{MR}, charolas de aluminio y de plástico, estufa Gallenkamp^{MR}, digestor, congelador Nieto^{MR}, refrigerador Lab-line^{MR}, potenciómetro manual Hanna^{MR}, microscopio Fisher Micromaster^{MR}, porta- objetos Corning^{MR}, micro pipeta Corning^{MR}, cámara de Neubauer^{MR}, aparato Kjeldahl Labconco^{MR}.

Metodología del trabajo. La materia prima para los dos experimentos consistió de 25 kg de manzana de desecho de la variedad *Golden Delicious* para cada experimento, la cual fue molida en una molino estacionario de martillos sin criba, posteriormente se agregaron y mezclaron la pasta de soya, urea, sulfato de amonio y la mezcla mineral para ser homogenizada y preparar los tratamientos de cada experimento como lo mostraron los cuadros 4 y 5 en porciones de 1 kg por charola, mismas que fueron alojadas en una incubadora con temperatura constante de 36 °C durante 180 h, para el experimento I y una temperatura constante de 28 °C durante 192 h, para el experimento II.

Muestreo. Se recolectaron muestras en los tiempos ya mencionados, donde se realizó una homogenización de cada una de las muestras para favorecer su aireación. Se tomaron 6 muestras por tratamiento de 10 g cada una de ellas, se depositaron en bolsas de plástico y se marcaron con el número de muestreo y número de muestra. Se guardaron en un congelador a una temperatura de -3 °C, para su posterior evaluación bromatológica.

Variables Evaluadas

Humedad. Para el monitoreo de pérdida de humedad se utilizó una charola por tratamiento de 1 kg para los dos experimentos realizados, en el cual se tomaba lectura del peso en las horas de muestreo.

pH. Se tomó la lectura de cada una de las muestras, con un potenciómetro manual en las horas de muestreo, tomando la lectura directamente de cada una de las charolas, posteriormente se removía la muestra de cada una de ellas de manera manual, esto con la finalidad de proporcionar una adecuada oxigenación y permitir el secado de la mezcla.

Proteína cruda. La determinación de proteína cruda (PC) se realizó utilizando el procedimiento descrito por la AOAC (2000), la muestra consistió en 0.2 g se llevó a digestión previamente agregándole mezcla de selenio, más 3 ml de H_2SO_4 al 0.0491 N. los valores obtenidos fueron expresados en porcentaje de proteína cruda (% PC).

Proteína verdadera. El contenido de proteína verdadera (PV) fue determinada de acuerdo con Berstein (1970), la muestra consistió en 0.2 g se le añadió 25 ml de agua destilada y se llevó a ebullición por 1 ó 2 min y se deposita 13 ml $CuSO_2$ al 6% y NaOH al 1.25%, se filtro en papel y se llevaron a digestión agregando previamente mezcla de selenio y 3 ml de H_2SO_4 concentrado. El nitrógeno se determinó por micro Kjeldahl hasta colectar 40 ml en un vaso de precipitado, conteniendo 10 ml de ácido bórico al 4% más cinco gotas de indicador para proteína y finalmente se procedió a titular con H_2SO_4 al 0.0491 N. los valores obtenidos fueron expresados en porcentaje de proteína verdadera (% PV).

Densidad óptica. Por cada tratamiento se tomó una muestra al azar de 3 g y se depositó en frascos de plástico de 100 ml donde se añadió 10 ml de una solución salina de NaCl al 0.1%, y se almacenó 5 °C, para su posterior estudio de densidad óptica (DO), con el propósito de comparar la

producción de levaduras con la producción de PC y PV. Las muestras se filtraron en 4 gasas y finalmente se procedió al conteo de levaduras de acuerdo al número de diluciones requeridas para su medición microscópica. Para las diluciones se utilizó 1 ml de muestra filtrada, mas 9 ml de agua destilada, se agitaron de manera manual por un tiempo de 3 min, para su homogenización y se procedió a tomar la muestra de 0.5 μ l y se depositó en la cámara de Neubauer^{MR} y realizar los conteos de levaduras con el lente del microscopio 40x.

Análisis Estadístico

El diseño para los dos experimentos se hizo con un arreglo completamente aleatorio, considerando efectos fijos los dos niveles de urea, los dos niveles de pasta de soya y su interacción; el efecto aleatorio de la charola dentro de cada tratamiento (parcela), el efecto de temperatura, el efecto de las interacciones de temperatura con nivel de urea, con nivel de pasta de soya para el último el efecto de la interacción triple de temperatura, nivel de urea y nivel de soya; los datos se evaluaron con el procedimiento GLM (General Linear Models) del programa SAS (2002), para un diseño al azar con arreglo factorial 2x2. Las variables de respuesta fueron proteína cruda; proteína verdadera; temperatura; pH y densidad óptica.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Experimento 1 a 36 °C

Humedad. Se observó que a medida que se disminuyó el porcentaje de manzana molida en las mezclas la pérdida de humedad fue más lenta.

pH. En el análisis de varianza no se detectaron diferencias significativas ($P>0.05$), sin embargo si hubo diferencias significativas para esta variable por efecto de tiempo ($P<0.02$), con medias de 5.81 ± 0.28 y 5.17 ± 0.28 para los niveles de 7 y 3.5% de pasta de soya respectivamente. Para el nivel urea no hubo efecto para esta variable ($P>0.05$), presentando medias de pH con rangos de 5.71 ± 0.28 y 5.27 ± 0.28 para el 1.5 y 2% de urea respectivamente. Estos resultados indican que la pasta de soya tiene un efecto hacia la acidez cuando se reduce en la mezcla de un 7 a un 3.5% en la fermentación de la manzana.

Datos similares coinciden con que Independientemente del tratamiento, a las 24 h de iniciado el proceso de fermentación el pH se encontraba entre 4.4 y 4.6 y la temperatura en el interior de la incubadora osciló entre 35 y 36 °C se considera que el tiempo de 24 h es suficiente para lograr la máxima síntesis proteica con las condiciones descritas anteriormente (Elías *et al.*, 1994). Se considera que el tiempo de 24 h es suficiente para lograr máxima síntesis proteica con las condiciones descritas anteriormente.

Los resultados de este trabajo sugieren, que las variaciones de pH parecen estar relacionadas con las temperaturas y los niveles de urea utilizados, por lo que los mayores valores de pH obtenidos a 36 °C, fue de 6.0 para todos los tratamientos puede que estén influidos por la presencia de algunas especies de levaduras y bacterias que se desarrollan a esa temperatura (Bergey 1984). El aumento en el pH del tratamiento cuatro a partir de las 60 h pudo ser originada por una mayor presencia de nitrógeno, aportado por la pasta de soya y el nivel de urea.

Proteína cruda. La PC se incrementó ($P<0.01$), a medida que se aumentó la urea en la mezcla (Cuadro 12). En cuanto al nivel de pasta de soya se encontró que también la PC se incrementó ($P<0.01$), a medida que se incorporaron los niveles de urea en la manzana de desecho. De acuerdo a estos porcentajes encontrados de PC se puede observar que la forma más rentable de elevar la PC es utilizando la urea debido a que proporcionó un mayor efecto, sin embargo es más barato el nitrógeno en forma de NNP.

Proteína verdadera. Hubo un efecto altamente significativo ($P<0.01$), en PV de la mezcla al aumentar el porcentaje de urea de 1.5 a 2% con valores de 33.72 y 37.08%, respectivamente (Cuadro 13), lo que indica que una mejor disponibilidad de nitrógeno no proteico favorece el crecimiento de levaduras manifestándose en un mejor contenido de PV, lo cual contrasta esta situación con lo señalado por Ramos (2005) quienes reportaron porcentajes similares de PV en la evaluación de diferentes fuentes energéticas como, sorgo molido, pulidura de arroz y pulpa de cítricos en (FES) de caña de azúcar resultando con mayor porcentaje de PV los tratamientos con los tres cereales 12.65, 12.80 y 13.72% respectivamente y 10.62 para pulpa de cítricos.

Los análisis indicaron que durante la fermentación de la manzana de desecho se produjo un nivel aceptable de PV superior a la encontrada en la elaboración de *saccharina*. Contrariamente, el incremento de la pasta de soya de 3.5 a 7% redujo el contenido de PV de la mezcla de 38.62 a 32.18%, lo cual indica que los microorganismos utilizan de la misma forma el nitrógeno cuando se encuentra en forma de PV como es el caso de la pasta de soya.

CUADRO 12. MEDIAS DE PROTEÍNA CRUDA \pm ERROR ESTÁNDAR DE MANZANA DE DESECHO FERMENTADA A 36 °C CON DOS NIVELES DE UREA Y DOS DE PASTA DE SOYA A 240 h DE FERMENTACIÓN

	Urea 1.5%	Urea 2.0%	PC \pm EE
Soya 3.5%	40.76 \pm 0.21	44.97 \pm 0.21	42.87 \pm 0.21 ^c
Soya 7.0%	45.12 \pm 0.21	49.00 \pm 0.21	47.06 \pm 0.21 ^d
PC \pm EE	42.94 \pm 0.21 ^a	46.93 \pm 0.21 ^b	

^{a, b} Literales distintas indican diferencia ($p < 0.01$) entre filas

^{c, d} Literales distintas indican diferencia ($p < 0.01$) columnas

CUADRO 13. MEDIAS DE PROTEÍNA VERDADERA \pm ERROR ESTANDAR DE MANZANA DE DESECHO FERMENTADA A 36 °C CON DOS NIVELES DE UREA Y DOS DE PASTA DE SOYA A 240 h DE FERNENTACIÓN.

	Urea 1.5%	Urea 2.0%	PV \pm EE
Soya 3.5%	33.77 \pm 0.29	43.47 \pm 0.29	38.62 \pm 0.29 ^c
Soya 7.0%	33.67 \pm 0.29	30.70 \pm 0.29	32.18 \pm 0.29 ^d
PV \pm EE	33.72 \pm 0.29 ^a	37.08 \pm 0.29 ^b	

^{a, b} Literales distintas indican diferencia ($p < 0.01$) entre filas

^{c, d} Literales distintas indican diferencia ($p < 0.01$) entre columnas

Densidad óptica. Esta variable no fue posible analizarla estadísticamente porque no se contó con un número suficiente de repeticiones, sin embargo gráficamente la mejor respuesta en el crecimiento de levaduras se tuvo en el tratamiento cuatro, usando 7% de pasta de soya y el 2% de urea, el cual alcanzó una producción de levaduras de 400×10^6 UFC/ml aproximadamente a las 100 horas de iniciada la fermentación, con respecto a los tratamientos uno y dos se mantuvieron alrededor 300×10^6 UFC/ml dentro de las 100 a 150 horas de haber iniciado la fermentación microbial.

Esta situación pudo ser originada debido a que este tratamiento contó con los niveles máximos de ambos factores y una mayor disponibilidad de nitrógeno en el que las levaduras mostraron una mejor respuesta positiva al nivel de 2% de urea, 0.4% de sulfato de amonio y al 1% de la mezcla mineral con los cuales las levaduras encontraron sus requerimientos para su crecimiento. Elías y Lezcano (1994) encontraron un mayor crecimiento en la población de levaduras cuando se utilizó hidrolizado de caseína o triptona como fuente de N en vez de N ureico. Estas razones pudieran evidenciar la no diferencia en la DO obtenida entre tratamientos donde se incluyó pasta de soya, unido al posible efecto de opalescencia que pudiera producir la presencia de micela del almidón que quedan en suspensión durante el proceso de determinación de ese indicador. Los valores más altos en DO obtenidos con pasta de soya en presencia de urea en relación con pasta de soya pudiera deberse a cierto estímulo en el crecimiento de la microbiota producido por la posible presencia de aminoácidos libres aportados por la pasta de soya. El máximo crecimiento de levaduras para este experimento se obtuvo a las 150 h de iniciada la fermentación, con una producción de 600×10^6 (UFC/ml) y luego bajo debido a que se presentó un incremento de amoníaco producido por los niveles de nitrógeno que se usaron en este tratamiento y por la falta de oxigenación y aireación en la mezcla.

Experimento II a 28 °C

Humedad. La pérdida de humedad de los cuatro tratamientos, durante la fermentación fue constante, desde las 0 h hasta las 150 h y posteriormente a las 180 h se incrementó la temperatura a 60 °C para dar un secado final a las muestras.

pH. En el análisis de varianza se detectaron diferencias significativas ($P < 0.01$) para pasta de soya obteniendo los valores de 4.9 a 5.7 utilizando el nivel de 1.5% de urea y el 3.5% de soya, observándose que en el tratamiento uno y tres los pH se mantienen similares en comparación con los tratamientos dos y cuatro a las 180 h reiniciada la fermentación. En contraste Elías y Lezcano (1994) obtuvieron valores de pH similares cuando utilizaron niveles de urea inferiores a los evaluados en este trabajo, de los que reportan valores de 4.18 y 5.8 para niveles de urea 1 y 1.5% a 37 °C. Los resultados del presente trabajo sugieren que las variaciones de pH parecen estar relacionadas con los niveles de urea y pasta de soya utilizados, por lo que los mayores valores de pH obtenidos pueden estar influidos por la presencia de algunas especies de levaduras y bacterias que se desarrollan a temperatura de 28 °C (Bergey 1984; Elías y Lezcano, 1994). No obstante, es posible que el N-NH₃ que se volatilizó pudiera estar directamente relacionado con la presencia de urea reflejada en la disminución de ambas proteínas (Elías, 1990) sobre todo cuando esta se añadió a la manzana molida y a la soya, posiblemente debido a una fuerte actividad ureolítica proporcionada por esta fuente de NNP que provocó un aumento en el pH del producto cuando se utilizó más del 1.5% de urea en la mezcla (Elías y Lezcano, 2001).

Proteína cruda. Para el efecto de urea en la PC, está se incrementó ($P < 0.01$), a medida que se incorporó la urea a 2%, la PC aumentó de 61.9 a 69.85% no siendo así cuando se utilizó la pasta de soya (Cuadro 14). Con estos datos se puede observar que el uso de la urea favoreció aumentando los porcentajes encontrados de PC, por lo que se considera que esta es la forma más rentable de elevar la PC.

CUADRO 14. MEDIAS DE PROTEÍNA CRUDA \pm ERROR ESTÁNDAR DE MANZANA DE DESECHO FERMENTADA A 28 °C CON DOS NIVELES DE UREA Y DOS DE PASTA DE SOYA A 240 h DE FERMENTACIÓN.

	Urea 1.5%	Urea 2%	PC \pm EE
0% Soya	71.92	80.44	76.18 \pm 0.38 ^c
3.5% Soya	51.89	59.25	55.57 \pm 0.38 ^d
PC \pm EE	61.90 \pm 0.38 ^a	69.85 \pm 0.38 ^b	

^{a, b} Literales distintas indican diferencia ($p < 0.01$) entre filas

^{c, d} Literales distintas indican diferencia ($p < 0.01$) entre columnas

La disminución de PC de 76.18 a 55.57% al adicionar el 3.5% de soya pudo ser provocada por una sobrepoblación de bacterias que hidrolizan urea en amoníaco NH_3 como *Staphylococcus epidermidis*, *Acinetobacter calcoacético* y *Proteus vulgaris*, que son bacterias que desempeñan un papel relevante en la hidrólisis de la urea con la producción de NH_3 , metabolito importante para algunas de estas especies en la síntesis celular, lo que produce un incremento de biomasa total en el producto.

Proteína verdadera. Se observó ($P < 0.01$) interacción entre los factores principales sobre la proteína verdadera, esta interacción indica que hay una respuesta a mejorar la PV de la mezcla al adicionar un 3.5% de pasta de soya, pero solo cuando el nivel de urea en la mezcla es de 1.5% y que cuando esta es de 2% se reduce la PV por efecto de la adición de pasta de soya, probablemente debido a la actividad ureasica de la pasta de soya que inhibe el crecimiento de levaduras o por un excesivo nivel de nitrógeno en la mezcla. En contraste Elías y Lezcano (1994) encontraron incrementos proporcionales en la PV a medida que se aumentó el nivel de soya en caña de azúcar que fluctuó entre 3.9 y 7%.

En base a estos resultados es posible que los valores elevados de PV obtenidos se deban no solamente al conjunto de levaduras, sino que también ésta se pudo haber originado por el desarrollo de otros microorganismos principalmente bacterias las cuales no se identificaron en este trabajo, se puede observar que en relación a la PV en cuanto a los factores urea y soya utilizados se encontró una disminución, debido a que al incrementar ambos factores en la manzana molida la PV disminuyó. Elías y Lezcano (2001) reportaron que en la elaboración de *Sacchasoya* a medida que se incrementó el nivel de urea y se disminuyó el nivel de soya en la manzana molida la PV disminuyó en un rango de 10.1 a 4.8%, donde se observó que al sustituir la PC con urea se afectó la producción de PV.

Densidad óptica. Esta variable no fue posible analizarla estadísticamente porque no se contó con un número suficiente de repeticiones, pero se puede observar numéricamente los resultados de densidad óptica donde se observa una mejor respuesta de crecimiento de 450×10^6 UFC/ml en el tratamiento cuatro a las 190 h de fermentación con una temperatura controlada de 28 °C, mientras que los tratamientos dos y tres se registraron con una producción de levaduras de 240×10^6 UFC/ml, aproximadamente a las 190 h de iniciada la fermentación, en cuanto al tratamiento uno se observó una producción de levaduras de 100×10^6 UFC/ml a las 190 h de haber iniciado la fermentación microbial.

Hang *et al.*, (1981) mencionaron que la fermentación de bagazo de manzana está influenciada por la temperatura en la producción de alcohol y el consumo de azúcares por las levaduras a 28 °C. Es evidente que bajo las condiciones controladas en que se desarrollo este estudio se proporciono la temperatura ideal que favoreciera el crecimiento de levaduras, lo cual pudo ser el reflejo de la alta densidad encontrada y la positiva correlación con la PV. La respuesta contrastante en la DO de levaduras como indicador de PV posiblemente también se haya debido a la presencia de bacterias ácido lácticas como *Lactobacillus amylophilus* L (+) que proliferan en presencia de humedad y abundancia de almidones junto con fuentes de nitrógeno en la fermentación en estado sólido (Altaf *et al.*, 2005).

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La temperatura que mejor efecto mostró sobre la fermentación de la manzana de desecho fue la de 28 °C. Se concluye que la PC disminuye a medida que se incrementa el porcentaje de pasta de soya en la manzana fermentada sin importar el nivel de urea en la mezcla. La inclusión de urea a la mezcla favorece el contenido de proteína cruda durante la fermentación de la manzana de desecho. La proteína verdadera se mejora con la adición de pasta de soya a la mezcla siempre y cuando el nivel de urea no exceda del 1.5%.

Con la inclusión de un 2% de urea en la fermentación en estado sólido de manzana de desecho se mejora la PV cuando no se utiliza la pasta de soya en la mezcla. La pasta de soya provoca un incremento en el pH lo cual se debió a la producción de amoníaco sobre todo cuando se manejan niveles altos de esta en la mezcla.

Los niveles elevados de urea y pasta de soya en la manzana de desecho en la fermentación en estado sólido mostraron los valores más altos de levaduras. Es factible el uso de la fermentación en estado sólido de la manzana de desecho para la producción de proteína microbiana y su empleo en la alimentación animal.

CAPITULO 6. CONTEO DE CÉLULAS SOMÁTICAS EN LECHE, ACTIVIDAD
ANTIOXIDANTE DEL PLASMA Y COMPONENTES CELULARES SANGUÍNEOS DE
VACAS HOLSTEIN EN PRODUCCIÓN

Mario Alejandro Gallegos Acevedo

RESUMEN

La incorporación de antioxidantes a la dieta de rumiantes estimula la actividad inmunológica. Con el fin de evaluar el efecto de adicionar manzarina a raciones de vacas lecheras, el conteo de células somáticas en leche (CCS), actividad antioxidante del plasma (AA) y componentes celulares sanguíneos, se utilizaron 22 vacas con dos a cuatro lactancias y 93 días en leche promedio. Se formaron dos grupos con 11 cuadros latinos 2 X 2 cada uno, con periodos de tiempo comunes. Los tratamientos consistieron en una ración de concentrado con manzarina (TM) y otra sin manzarina (TT) ofrecida durante el ordeño, y forraje de alfalfa y avena subministrado en comedero. Se determinó un periodo de 12 días para adaptación a las dietas correspondientes y un periodo de igual duración para la toma muestras, al fin de los cuales se intercambiaron tratamientos según el método switch back. Se tomaron muestras diarias de leche durante el ordeño vespertino para la cuantificación de CCS. Se obtuvieron dos muestras de sangre por animal al inicio de cada periodo y dos más al final de los mismos, con una de las muestras se efectuó una biometría hemática (BH) y con otra se determinó la AA mediante la técnica FRAP. En CCS se encontró efecto ($P < 0.05$) de interacción periodo-tratamiento; en P1, TM tuvo $6.44 \pm 0.197 \log \times 10^3$ UFC/ml y TT $7.13 \pm 0.207 \log \times 10^3$ UFC/ml; en P2 TM tuvo $6.64 \pm 0.197 \log \times 10^3$ UFC/ml y TT $5.60 \pm 0.197 \log \times 10^3$ UFC/ml, lo anterior probablemente debido a la mejora en la rutina de ordeño durante el experimento. En BH se encontró efecto ($P < 0.05$) de tratamiento en conteo de monocitos, con $7.123 \pm 0.747\%$ en TM y $4.859 \pm 0.747\%$ en TT, lo cual indica una probable proliferación de dichas células en TM. Y en AA se encontró efecto ($P < 0.05$) de periodo con 18.653 ± 0.530 mM Fe² en P1 y 22.522 ± 0.530 mM Fe² en P2, indicando que el contenido de antioxidantes de la manzarina se puede incorporar al torrente sanguíneo, aumentando AA. La manzarina incorporada a la ración de vacas lecheras en lactancia temprana, contribuye a mantener el equilibrio redox, previniendo enfermedades relacionadas con estrés oxidativo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción del Área de Estudio

El experimento se efectuó en las instalaciones del establo Santa Lucía ubicado en el municipio de Aldama, Chihuahua. El establo se localiza a 28° 50' latitud norte y 105° 53' longitud oeste; con una altitud de 1,262 msnm. El clima se clasifica como árido, desértico y extremo, con una temperatura máxima de 44°C y una mínima de -14°C. La precipitación pluvial media anual es de 305.2 mm, una humedad relativa del 45%, un promedio de 49 días de lluvia y vientos dominantes provenientes del oeste (INEGI, 2007).

Descripción de la Población

Se seleccionaron al azar 22 hembras adultas de la raza Holstein (n=22), de dos a cuatro lactancias; con un promedio de 93 días en línea de ordeño.

Distribución de las Vacas en los Grupos de Trabajo

Las vacas fueron distribuidas aleatoriamente en dos corrales; a los animales dentro de cada corral se les nombró grupo A (n=11) o grupo B (n=11) respectivamente; a excepción de la dieta ofrecida para cada grupo, todos los animales tuvieron el mismo manejo.

Duración de Periodos de Adaptación, Alimentación y Muestreo

El experimento tuvo una duración de 48 días (del 21 de Febrero al 9 de Abril del 2007) y se dividió en dos periodos de 24 días cada uno; el primer periodo fue del 21 de Febrero al 16 de Marzo (P1) y el segundo del 17 de Marzo al 9 de Abril del 2007 (P2); en ambos periodos (P1 y P2) hubo 12 días de adaptación a las dietas (del día -11 al día 0), los siguientes 12 días se tomaron muestras en ambos periodos (del día 1 al día 12).

Composición de las dietas. Se prepararon dos dietas, una para el tratamiento experimental (TM) la cual incluyó manzarina como parte del concentrado de la ración (dieta M); y la otra para el tratamiento testigo (TT), la cual no incluyó manzarina (dieta T); las dos dietas fueron isoproteicas e isoenergéticas calculadas, balanceadas y ofrecidas con base en el peso promedio inicial del grupo al que se le iba a ofrecer la dieta M o T al momento de iniciar P1 y P2, el contenido de nutrientes de los ingredientes y los requerimientos nutricionales establecidos por el NRC (2001) para ganado lechero con 30 L de producción (Cuadros 15 y 16).

El concentrado se ofreció durante la ordeña y el forraje después de la ordeña, ambos se ofrecieron en dos partes la mitad en la mañana y la otra mitad en la tarde; el forraje, fue una mezcla de alfalfa y avena. De la dieta M se ofrecieron 13.25 kilogramos por animal por día (kg a-1 d-1) de concentrado y 11.19 kg a-1 d-1 de forraje en P1 y P2. De la dieta T se ofrecieron 11.77 kg a-1 d-1 de concentrado y 12.60 kg a-1 d-1 de forraje en P1 y P2. (Cuadro 17)

Adaptación

Los animales fueron adaptados a las dietas correspondientes durante los días -11 al 0 de ambos periodos, ofreciendo un 25% de la nueva dieta más un 75% de la dieta anterior durante los días -11 y -10; en los días -9 y -8 se aumento a 50% la cantidad ofrecida de la nueva dieta y se disminuyo a 50% la dieta anterior; en los días -7 y -6, se ofreció 75% de la nueva dieta y 25% de la dieta anterior; a partir del día -5 la dieta correspondiente a cada tratamiento se ofreció íntegramente a ambos grupos.

CUADRO 15. DIETAS UTILIZADAS EN EL EXPERIMENTO

Ingredientes*	Tratamiento	
	Testigo	Manzarina
<i>Forraje</i>		
Heno de Avena	35.53	27.69
Heno de Alfalfa	16.11	18.08
<i>Concentrado</i>		
Sorgo Rolado	16.46	19.60
Salvado de Trigo	5.80	4.34
Maíz Rolado	7.73	8.68
Melaza	3.87	4.34
Pasta de Soya	9.67	8.61
Carbonato de Calcio	0.13	0.00
Fosfato dicálcico	0.32	0.00
Sal	0.48	0.54
Harinolina	1.93	0.00
Gluten de Maíz	1.93	2.17
Manzarina	0.00	10.00
Minerales	0.00	0.54

*porcentaje en base seca

CUADRO 16. ANÁLISIS CALCULADO DE LAS DIETAS UTILIZADAS EN EL EXPERIMENTO.

Requerimiento	Tratamiento	
	Testigo	Manzarina
Materia seca (Kg/d)	21.800	21.800
Proteína cruda (Kg/d)	3.488	3.488
Energía Neta de Lactancia (Mcal/d)	35.330	35.330
Calcio (Kg/d)	0.134	0.127
Fósforo (Kg/d)	0.117	0.122
Costo por Día por Vaca (\$)	41.74	42.55

CUADRO 17. RELACIÓN FORRAJE CONCENTRADO.

Alimento*	Dieta	
	Testigo	Manzarina
<i>Concentrado</i>	11.77	13.25
<i>Total forraje</i>	12.6	11.19
Alfalfa	3.93	4.42
Avena	8.67	6.77

*Unidades expresadas en Kg

Tratamientos. TM consistió en ofrecer la dieta M al grupo A en P1 y después al grupo B en P2, TT consistió en ofrecer la dieta T al grupo B en P1 y después al grupo A en P2 según el arreglo experimental switch back. En un diseño de 11 cuadrados latinos 2X2 repetido en el mismo periodo de tiempo.

Variables Evaluadas

Se evaluó el conteo de células somáticas (CCS) presentadas en muestras de leche, además de los conteos de células sanguíneas obtenidos mediante Biometrías Hemáticas (BH) las cuales incluyen: Leucocitos, Neutrófilos, Linfocitos, Monocito, Eocinófilos, Basófilos, Eritrocitos, Hemoglobina, Hematocrito, Población de Eritrocitos y Plaquetas. Por último se consideró la Actividad Antioxidante (AA) del plasma de muestras sanguíneas.

Toma y Análisis de Muestras

Leche. Durante el ordeño vespertino, se tomó una muestra diaria por animal de 120 mL de leche en un frasco estéril identificado al cual se le agregaron tres pastillas de bronopol, para preservar la muestra durante varios días a temperatura de refrigeración (4°C) hasta el momento de su análisis. Para CCS, las muestras se analizaron en un equipo Fosomatic® 5000 en el Centro de Desarrollo Tecnológico para la Industria Láctea (CEDETIL) ubicado en el Campo 70, km 44.5 carretera Ojo de Yegua, en el municipio de Riva Palacio.

Sangre. En los días 13 y 24 de cada periodo, se obtuvieron dos muestras por animal en ambos tratamientos, por punción de la vena caudal; la primera se recolectó en tubos de ensayo con vacío y EDTA como anticoagulante; dichas muestras se trasladaron a las instalaciones de la Clínica Universidad, S.A. de C.V., ubicada en la Avenida Universidad n° 2755 de la Ciudad de Chihuahua donde se analizaron con un aparato COULTER® Ac-T 5diff AL para la realización de una BH por muestra.

La segunda muestra se recolectó en tubos de ensayo con vacío sin anticoagulante, esta se centrifugo el mismo día de la obtención a 3000 rpm durante 30 min (Beckman® modelo TJ-6), el plasma se conservo en congelación hasta el momento del análisis, el cual se descongeló a temperatura de refrigeración (4°C) y se determinó su AA por medio de la técnica FRAP (Ferric Reduction Antioxidant Power) de Benzie y Strain (1996), en el laboratorio de Nutrición de la Facultad de Zootecnia.

Determinación de Actividad Antioxidante

Para esta técnica se prepararon tres soluciones; a la primera (Solución buffer, 300 mMol CH_3COONa , pH 3.6) se le agregaron 3.1 g de acetato de sodio trihidratado, 16 mL de ácido acético glacial y se aforó a un litro con agua destilada. La segunda (solución TPTZ, 10 mMol 2,4,6-tripiridyl-s-triazine), se preparó agregando 0.031 g de TPTZ (2,4,6-tripiridyl-s-triazine) en 10 mL de solución al 40 mMol de HCl.

La tercera (solución de cloruro férrico hexahidratado, 20 mMol $\text{Fe Cl}_3 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$) se preparó agregando 0.054 g de cloruro férrico hexahidratado por cada 10 mL de agua destilada. La solución FRAP o solución de trabajo se preparó mezclando en una proporción 10:1:1 la solución buffer, la solución TPTZ, y la solución de cloruro férrico. (Benzie y Strain, 1996; Szöllösi y Varga, 2002; Oyawoye *et al.*, 2003).

Preparación de estándar y curva de calibración. Se preparó una solución estándar agregando 0.0417 g de sulfato ferroso heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) en 50 mL de metanol grado HPLC (CH_3OH); de la solución estándar se tomaron 0.0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mL, a dichas cantidades se les agregó metanol (excepto a la última) hasta completar 1 mL y posteriormente a cada una se les agregó 3 mL de agua destilada en celdas para espectrofotómetro, se agitaron en vortex, se extrajeron 200 μL y se agregaron en 1,800 μL de solución FRAP y nueva mente se pasaron a vortex; después de 10 minutos de agregada la solución FRAP se procedió a tomar la lectura en un espectrofotometro marca Junior® II

Coleman modelo 6/20^a una absorbancia de 593nm. Con los datos obtenidos se elaboró una curva de predicción en base a una ecuación de regresión (Chacón *et al.*, 2006).

Preparación de Muestras

Una vez descongelado el plasma, se tomaron 7 μL y se añadieron a un tubo en el que previamente se habían colocado 200 μL de agua, posterior a lo cual se agregaron 195 μL de metanol y se mezclaron con vortex; a dichas mezclas se les adicionaron 2,000 μL de solución FRAP, después de 10 minutos de se procedió a tomar la lectura a una absorbancia de 593nm registrando los datos.

Análisis Estadístico

El CCS y las variables contempladas dentro de la BH, se analizaron con el procedimiento GLM y la AA se analizó con el procedimiento MIXED del programa SAS, (2002).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de las diferentes variables evaluadas se presentan y se discuten en los siguientes párrafos:

Conteo de Células Somáticas

Al llevar a cabo el análisis de los datos obtenidos para ésta variable se procedió a estandarizarlos mediante un logaritmo natural, debido a que los resultados no se ajustaron a una distribución normal, por lo tanto se reportarán los resultados en base a dicho logaritmo. Para ésta variable se encontró efecto ($P<0.05$) de la interacción periodo por tratamiento; en el P1 el TM tuvo menor ($P<0.05$) CCS que el TT ($6.44\pm 0.197 \log \times 10^3$ UFC/mL v/s $7.13\pm 0.207 \log \times 10^3$ UFC/mL respectivamente) y en el P2 el TM tuvo mayor ($P<0.05$) CCS que el TT ($6.64\pm 0.197 \log \times 10^3$ UFC/mL v/s $5.60\pm 0.197 \log \times 10^3$ UFC/mL respectivamente). Tal como se observa en el (Cuadro 18).

Se pudo observar una disminución casi constante en el CCS en ambos grupos sin importar el tratamiento bajo el cual se tomaron los datos, lo anterior fue mejorando conforme avanzaba el P2 reflejándose en una diferencia entre el P1 y P2 del 12.97% en el grupo A y del 6.87% en el grupo B. Probablemente debido a la mejora en la rutina de ordeño durante el experimento. En un estudio de un año con rebaños de terneras bien manejadas realizado por Weiss *et al.*, (1990), reveló que la incidencia de mastitis clínica y el CCS, estaban relacionados de forma negativa con la suplementación con selenio y vitamina E.

CUADRO 18. MEDIAS (\pm ERROR ESTANDAR) POR TRATAMIENTOS Y PERIODOS DE CONTEOS DE CELULAS SOMATICAS EN LECHE.

Tratamiento	Periodo		Promedio de Tratamiento*
	1	2	
Manzarina*	6.44 \pm 0.197 ^{ac}	6.64 \pm 0.197 ^{ac}	6.54 \pm 0.139 ^a
Testigo*	7.13 \pm 0.207 ^{bc}	5.60 \pm 0.197 ^{bd}	6.37 \pm 0.143 ^a
Promedio de Periodo*	6.79 \pm 0.143 ^c	6.12 \pm 0.139 ^d	

* Unidades expresadas en logaritmo natural $\times 10^3$ cells/mL.

^{ab} Literales diferentes entre columnas, denotan diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$).

^{cd} Literales diferentes entre filas, denotan diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$).

Existen una infinidad de autores que respaldan que para la disminución del CCS y el control de la mastitis en un hato determinado, la prevención del padecimiento posee un mayor beneficio productivo y por ende económico (Wattiaux 2005). Uno de los dos puntos clave propuestos para obtener CCS y bacteriológicos bajos, es la limpieza, desde la vaca, hasta su medio ambiente (Hillerton, 1998), la adecuada aplicación de las buenas prácticas de manejo, incluyendo un buen proceso de ordeño, uso de selladores, etc. (Farnsworth *et al.*, 1980; Harmon, 1994; Woolford *et al.*, 1998; Huxley *et al.*, 2002; Tepper, 2002; García 2004; Traeder 2004).

Biometría Hemática

La BH también denominada Hemograma, es uno de los estudios de rutina de mayor importancia, ya que la información que de aquí se deriva nos proporciona una idea muy confiable del estado general de la salud del paciente. De ésta determinación sanguínea se obtuvieron las siguientes variables:

Leucocitos, Neutrófilos, Linfocitos, Monocito, Eosinófilos, Basófilos, Eritrocitos, Hemoglobina, Hematocrito, Población de Eritrocitos y Plaquetas. Cabe mencionar que todos los valores obtenidos para cada una de las variables, estuvieron dentro de los rangos normales establecidos para hembras bovinas adultas en producción (Cuadro 19); tomando en cuenta que según Giménez (2006), las vacas en lactancia tienen un recuento leucocitario total menor que las vacas secas.

Se encontró efecto de tratamiento sobre la variable monocitos, cuyas medias en el TM y en el TT fueron diferentes estadísticamente ($P < 0.05$), al obtener $7.123 \pm 0.747\%$ y $4.859 \pm 0.747\%$ respectivamente (Cuadro 20), lo que indica una probable proliferación de dichas células. Dichos datos están dentro de los parámetros normales mostrados en el (Cuadro 19), aunque la media obtenida en el caso del TM se encuentra en el límite superior.

CUADRO 19. VALORES DE REFERENCIA DE BIOMETRÍA HEMÁTICA PARA HEMBRAS BOVINAS EN PRODUCCIÓN.

Determinación	Valor de Referencia
<i>Leucocitos</i> (10^3 /uL)	4.0 – 12.0
Neutrófilos (%)	15.0 – 45.0
Linfocitos (%)	45.0 – 75.0
Monocitos (%)	2.0 – 7.0
Eosinófilos (%)	2.0 – 20.0
Basófilos (%)	0.0 – 2.0
<i>Eritrocitos</i> (10^6 /uL)	
Hemoglobina (gr/dl)	8.0 – 15.0
Hematocrito (%)	24.0 – 46.0
Población de Eritrocitos (%)	10.0 – 14.0
<i>Plaquetas</i> 10^3 /uL	100 – 750

Fuente: Clínica Universidad (2007)

CUADRO 20. MEDIAS (\pm ERROR ESTANDAR) DE TRATAMIENTOS DE BIOMETRÍA HEMÁTICA PARA HEMBRAS BOVINAS EN PRODUCCIÓN.

Determinación	Tratamiento	
	Manzarina	Testigo
<i>Leucocitos</i> (10^3 /uL)	13.845 \pm 0.271 ^a	14.027 \pm 0.271 ^a
Neutrófilos (%)	34.268 \pm 1.997 ^a	35.977 \pm 1.997 ^a
Linfocitos (%)	51.340 \pm 3.392 ^a	53.186 \pm 3.392 ^a
Monocitos (%)	7.123 \pm 0.747 ^a	4.859 \pm 0.747 ^b
Eosinófilos (%)	3.990 \pm 0.713 ^a	2.790 \pm 0.713 ^a
Basófilos (%)	0.414 \pm 0.107 ^a	0.341 \pm 0.107 ^a
<i>Eritrocitos</i> (10^6 /uL)	6.284 \pm 0.047 ^a	6.383 \pm 0.047 ^a
Hemoglobina (gr/dl)	10.586 \pm 0.082 ^a	10.759 \pm 0.082 ^a
Hematocrito (%)	28.818 \pm 0.241 ^a	29.250 \pm 0.241 ^a
Población de Eritrocitos (%)	11.913 \pm 0.327 ^a	12.490 \pm 0.327 ^a
<i>Plaquetas</i> 10^3 /uL	425.364 \pm 29.620 ^a	411.864 \pm 29.620 ^a

^{ab} Literales diferentes entre filas, denotan diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$).

Se tienen algunos antecedentes de trabajos en donde se analizan los efectos de suplementar diferentes tipos de antioxidantes y micronutrientes en dietas de bovinos y su influencia en la función y capacidad de respuesta inmunológica (Takagi y Nakano, 1983; Hogan *et al.*, 1990; Hogan *et al.*, 1993; Weiss *et al.*, 1994).

Reddy *et al.*, (1987), encontraron que la suplementación de vitamina E puede aumentar la respuesta inmune e indican efectos en la proliferación de células del sistema inmune, para ser más exactos linfocitos B y T. Se sabe poco de la acción que provocan los flavonoides sobre las células sanguíneas; Puig *et al.*, (2000), analizaron la influencia de la adición de epicatequina y del extracto de cacao sobre el inicio de la respuesta inmune y descubrieron que dicha adición no modifica significativamente la viabilidad celular pero que intervienen en la actividad proinflamatoria de los macrófagos, modulando la síntesis de las principales citocinas implicadas e inhibiendo la secreción de radicales oxidantes (Puig *et al.*, 2001; Ramiro-Puig *et al.*, 2005).

Weber (1995) señala, que la suplementación de vitamina A tiene una acción limitada sobre la fagocitosis y la destrucción intracelular por los fagocitos, al igual que el Cobre (Weiss *et al.*, 1994). Las medias de las variables de conteo de leucocitos, neutrófilos, monocitos, linfocitos, eosinófilos, eritrocitos, hematocrito, población de eritrocitos y plaquetas, no tuvieron diferencia estadística entre periodos ($P > 0.05$). En cambio, las medias de los conteos de basófilos y cuantificación de hemoglobina, sí fueron diferentes estadísticamente ($P < 0.05$), tal como se puede apreciar en el (Cuadro 21).

Rodríguez *et al.*, (1985), afirman que algunos de los valores sanguíneos obtenidos mediante una biometría hemática disminuyen durante las restricciones alimentarias y Tschopp *et al.*, (1998), aseveran que dichos valores también se elevan al mejorar la alimentación del bovino, lo cual suponemos que sucedió en esta ocasión.

CUADRO 21. MEDIAS (\pm ERROR ESTANDAR) DE PERIODOS DE BIOMETRÍA HEMÁTICA PARA HEMBRAS BOVINAS EN PRODUCCIÓN.

Determinación	Periodo	
	1	2
<i>Leucocitos</i> (10^3 / μ L)	13.963 \pm 0.271 ^a	13.909 \pm 0.271 ^a
Neutrófilos (%)	35.409 \pm 1.997 ^a	34.836 \pm 1.997 ^a
Linfocitos (%)	49.318 \pm 3.392 ^a	55.209 \pm 3.392 ^a
Monocitos (%)	5.363 \pm 0.747 ^a	6.618 \pm 0.747 ^a
Eosinófilos (%)	4.136 \pm 0.713 ^a	2.645 \pm 0.713 ^a
Basófilos (%)	0.095 \pm 0.107 ^a	0.659 \pm 0.107 ^b
<i>Eritrocitos</i> (10^6 / μ L)	6.377 \pm 0.047 ^a	6.290 \pm 0.047 ^a
Hemoglobina (gr/dl)	10.536 \pm 0.082 ^a	10.809 \pm 0.082 ^b
Hematocrito (%)	28.841 \pm 0.241 ^a	29.227 \pm 0.241 ^a
Población de Eritrocitos (%)	11.809 \pm 0.327 ^a	12.595 \pm 0.327 ^a
<i>Plaquetas</i> 10^3 / μ L	455.318 \pm 29.620 ^a	381.909 \pm 29.620 ^a

^{ab} Literales diferentes entre filas, denotan diferencia estadísticamente significativa (P<0.05).

Actividad Antioxidante

Con respecto a esta variable, las medias obtenidas para cada uno de los tratamientos fueron: 21.151 ± 0.530 mM Fe² y 20.024 ± 0.530 mM Fe² para el TM y para el TT respectivamente; los cuales no fueron diferentes entre sí ($P > 0.05$), a pesar de que en la determinación de la AA de cada una de las muestras, los datos para el TM se mantuvieron siempre por encima de los datos del TT. En el (Cuadro 22) se detallan las medias para cada uno de los muestreos. Aún dentro de cada muestreo, las diferencias entre tratamientos nunca fueron significativas ($P > 0.05$), incluso en el caso del muestreo 2, en el cual se puede apreciar una drástica caída de la media de la AA en ambos tratamientos, siendo más notoria en el caso del TT, aún con ello no presentó significancia.

En el análisis referente a los periodos, se pudo observar que la media correspondiente para el P1 fue de 18.653 ± 0.530 mM Fe², para el P2 se encontró un incremento del 20.74% al obtener una media de 22.522 ± 0.530 mM Fe² de la AA del total de las vacas, dicha diferencia fue significativa estadísticamente ($P < 0.05$). Al analizar el comportamiento de los tratamientos ofrecidos en cada periodo, se encontró que el TM y el TT en el P1 no tuvieron diferencia significativa ($P > 0.05$); de igual manera los mismos tratamientos en el P2 ($P > 0.05$); los TM y TT fueron diferentes a sus homólogos en el P2 ($P < 0.05$), tal como se puede apreciar en el (Cuadro 23).

Se debe de tomar en cuenta que la AA de una mezcla, no está dada solo por la suma de las capacidades antioxidantes de cada uno de sus componentes, sino que también depende del microambiente y de la interacción de los compuestos, donde pueden producirse efectos sinérgicos o inhibitorios (Leighton y Urquiaga, 1999). Es esencial considerar, que cada alimento contiene una combinación particular de varios polifenoles, y por lo tanto, el efecto antioxidante fisiológico se debe al conjunto de polifenoles más abundantes en ese alimento y más probablemente al conjunto de metabolitos derivados de éstos (Pietta *et al.*, 1998).

CUADRO 22. MEDIAS (\pm ERROR ESTANDAR) DE LA DETERMINACION DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS MUESTREOS DE CADA TRATAMIENTO.

Día de Muestra	Tratamiento	
	Manzarina	Testigo
1	19.540 \pm 1.035 ^a	19.275 \pm 1.035 ^a
2	19.196 \pm 1.035 ^a	16.601 \pm 1.035 ^a
3	22.113 \pm 1.035 ^a	21.137 \pm 1.035 ^a
4	23.755 \pm 1.035 ^a	23.083 \pm 1.035 ^a
Media de Tratamiento	21.151 \pm 0.523 ^a	20.024 \pm 0.523 ^a

* Unidades expresadas en mM Fe²⁺.

^a Literales diferentes entre filas, denotan diferencia estadísticamente significativa (P<0.05).

CUADRO 23. MEDIAS (\pm ERROR ESTANDAR) DE PERIODOS DE BIOMETRÍA HEMÁTICA PARA HEMBRAS BOVINAS EN PRODUCCIÓN.

Determinación	Periodo	
	1	2
<i>Leucocitos</i> (10^3 /uL)	13.963 \pm 0.271 ^a	13.909 \pm 0.271 ^a
Neutrófilos (%)	35.409 \pm 1.997 ^a	34.836 \pm 1.997 ^a
Linfocitos (%)	49.318 \pm 3.392 ^a	55.209 \pm 3.392 ^a
Monocitos (%)	5.363 \pm 0.747 ^a	6.618 \pm 0.747 ^a
Eosinófilos (%)	4.136 \pm 0.713 ^a	2.645 \pm 0.713 ^a
Basófilos (%)	0.095 \pm 0.107 ^a	0.659 \pm 0.107 ^b
<i>Eritrocitos</i> (10^6 /uL)	6.377 \pm 0.047 ^a	6.290 \pm 0.047 ^a
Hemoglobina (gr/dl)	10.536 \pm 0.082 ^a	10.809 \pm 0.082 ^b
Hematocrito (%)	28.841 \pm 0.241 ^a	29.227 \pm 0.241 ^a
Población de Eritrocitos (%)	11.809 \pm 0.327 ^a	12.595 \pm 0.327 ^a
<i>Plaquetas</i> 10^3 /uL	455.318 \pm 29.620 ^a	381.909 \pm 29.620 ^a

^{ab} Literales diferentes entre filas, denotan diferencia estadísticamente significativa (P<0.05).

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se concluye que la constante disminución del conteo de células somáticas presentada en las vacas, podría deberse a la diferencia en la aplicación de la rutina de ordeño y al manejo, con respecto a las prácticas empleadas antes del experimento.

La proliferación de monocitos encontrada en los animales al momento de consumir la ración con manzarina determinada por la Biometría Hemática, contribuiría a reforzar la segunda línea de defensa, y la respuesta inmune del organismo debido a la función de estas células de presentar antígenos, además, debido a su función de fagocitar y reparar tejido dañado por reacciones inflamatorias, podría ayudar a la restauración del tejido mamario, contribuyendo de esta manera a la disminución de los conteos de células somáticas en leche.

El comportamiento de la Actividad Antioxidante puede indicar que el consumo de manzarina en el ganado lechero con un manejo y alimentación adecuada, podría elevar dicha actividad en sangre y que el contenido de antioxidantes de la manzarina podría incorporarse al torrente sanguíneo, donde mantendría sus propiedades y contribuiría a mejorar el equilibrio redox, previniendo enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, entre ellas la mastitis.

Por todos los aspectos antes mencionados, podemos recomendar la manzarina como un potencial ingrediente funcional de bajo costo, que, al ser consumido, desarrollaría un doble papel en el mantenimiento de la salud y prevención de ciertas enfermedades como el control del estrés oxidativo y de la mastitis subclínica y clínica, que puede ser incorporado a la ración de vacas lecheras en etapa temprana. De igual forma con el fin de obtener datos de mayor calidad y de evitar que los resultados puedan verse encubiertos por el manejo dado a los animales, se recomienda llevar a cabo otros estudios similares, en algunos otros establos en donde se tenga un manejo adecuado y una rutina de ordeño bien establecida.

CAPITULO 7. EFECTO DE LA MANZARINA SOBRE LOS COMPONENTES
FISICOQUÍMICOS Y PRODUCCIÓN DE LECHE

Francisco Javier Gutiérrez Piña

RESUMEN

La manzarina es un ingrediente proteico proveniente de una mezcla de bagazo de manzana, urea, sulfato de amonio y minerales. Se determinó el efecto de la manzarina sobre Caseína, Proteína Total, Grasa, Lactosa, Sólidos Totales y Producción de Leche. Utilizando 22 vacas Holstein, las cuales tenían de 2 a 4 lactancias y un promedio de 93 días en leche, se formaron dos grupos con 11 cuadros latinos 2 X 2 cada uno, con periodos de tiempo comunes. Las dietas del experimento se incorporaron gradualmente dando un periodo de 12 días de adaptación, seguido por otros 12 de toma de muestras, para al término de este hacer el cambio de dietas a los grupos y repetir la misma secuencia. A las muestras de leche se les determinó los parámetros fisicoquímicos, las cuales fueron analizadas con el MilkoScan FT 120 ®. La producción láctea fue medida individualmente con los pesadores presentes en la sala de ordeño. Se realizó una comparación de medias de tratamientos en el programa estadístico SAS. La Caseína, Proteína Total, Grasa y Sólidos totales no se vieron afectadas por ninguno de los dos tratamientos manteniéndose dentro de los rangos aceptables, la Lactosa se mantuvo 0.05 % por debajo de los rangos establecidos, de igual forma en ambos tratamientos. En la Producción de Leche el tratamiento manzarina produjo 780 gr. más, por lo que fue significativamente diferente del tratamiento testigo ($P < 0.05$). Se concluyó que la manzarina se puede incorporar como un ingrediente proteico más al concentrado de la ración de vacas lecheras en etapa temprana de lactancia, mínimamente en un 10%.

MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción del Área de Estudio

El presente estudio se llevó a cabo en el establo Sta Lucía, ubicado en el municipio de Aldama, Chihuahua. En el Km 15 de la carretera que comunica a dichos municipios. Encontrándose en 28° 50' latitud norte y 105° 53' longitud oeste, con una altitud de 1263 metros sobre el nivel del mar y un clima árido desértico con temperaturas extremas que alcanzan 44 °C y mínimas de hasta -14 °C, teniendo alrededor de 49 días de lluvia, produciendo una precipitación pluvial de 305.2 milímetros (INEGI, 2007).

Descripción de la Población

Se seleccionaron 22 vacas de la raza Holstein de la segunda a cuarta lactancia, con un promedio de días en leche de 93, formándose aleatoriamente dos grupos de once vacas cada uno, solo tomando en cuenta los días en leche y el número de lactancias, sin importar la vaca, esto para lograr grupos homogéneos.

Descripción de Tratamientos y Alimentación

El concentrado testigo y tratamiento fueron formulados en base a los requerimientos nutricionales de vacas en producción con 30 Lts, para el primero de estos, se emplearon únicamente ingredientes convencionales para ganado lechero, en tanto para la elaboración del concentrado tratamiento se utilizaron ingredientes del primer concentrado más la manzarina (Cuadro 24). El análisis calculado de los requerimientos se presenta (Cuadro 25). Tanto el concentrado del tratamiento manzarina como el concentrado del tratamiento testigo, eran pesados antes de ser ofrecidos (Cuadro 26). El concentrado que le tocaba a cada vaca por día, se ofreció mitad en cada ordeña, el cual se proporciono individualmente en la sala de ordeño por la mañana a las (0520 h) y (0600 h), por la tarde a las (1720 h) y (1800 h).

CUADRO 24. CONTENIDO DE INGREDIENTES DE LAS DIETAS UTILIZADAS EN EL EXPERIMENTO.

Ingredientes	Testigo (%)	Manzarina (%)
Heno de Avena	35.53	27.69
Sorgo Rolado	16.46	19.60
Salvado de Trigo	5.80	4.34
Maíz Rolado	7.73	8.68
Melaza	3.87	4.34
Pasta de Soya	9.67	8.61
Carbonato de Calcio	0.13	0.00
Fosfato dicálcico	0.32	0.00
Sal	0.48	0.54
Heno de Alfalfa	16.11	18.08
Harinolina	1.93	0.00
Glúten de Maíz	1.93	2.17
Manzarina	0.00	5.42
Minerales	0.00	0.54

(Fuente: Rodríguez, 2007)

CUADRO 25. ANÁLISIS CALCULADO DE LAS DIETAS UTILIZADAS EN EL EXPERIMENTO.

Requerimiento	Testigo	Manzarina
Materia seca (Kg/d)	21.800	21.800
Proteína cruda (Kg/d)	3.488	3.488
Energía Neta de Lactancia (Mcal/d)	35.330	35.330
Calcio (Kg/d)	0.134	0.127
Fósforo (Kg/d)	0.117	0.122
Costo por Día por Vaca (\$)	41.74	42.55

(Fuente: Rodríguez, 2007)

CUADRO 26. DIETAS INTEGRALES PROPORCIONADAS A LAS VACAS.

Dieta	Concentrado (Kg)	Alfalfa (Kg)	Avena (Kg)
Testigo	11.77 / vaca	3.93 / vaca	8.67 / vaca
Tratamiento	13.25 / vaca	4.42 / vaca	6.77 / vaca

(Fuente: Rodríguez, 2007)

Las fuentes de fibra para ambos tratamientos fueron heno de alfalfa y de avena, cada ingrediente era pesado antes de ser ofrecidos a las vacas en el corral (Cuadro 26) dicha alimentación fue por la mañana (0700 h) y por la tarde (1900 h).

Variables Evaluadas

Se evaluó la producción de leche, al igual que las propiedades fisicoquímicas de la leche las cuales incluyen: caseína, grasa, lactosa, proteína total y sólidos totales. La alimentación y peso corporal no entraron en el análisis estadístico, pero se midió consumo total y cambio de peso corporal.

Toma de las Muestras

La lectura de la producción se tomó por la mañana y tarde, registrándose inmediatamente en la hoja de control. Con respecto a la recolección de la leche para el análisis de propiedades fisicoquímicas, se tomó directamente del pesador, una muestra de 120 mL únicamente por las tardes, la cual era representativa de esa ordeña completa, inmediatamente después se agregaban tres pastillas de bronopol para lograr su conservación por cuatro días en refrigeración a 4 °C (periodo recomendado para evitar el crecimiento bacteriano) para su posterior análisis, cada muestra fue identificada con el número de la vaca, el corral que le correspondía, tratamiento y fecha, todo esto al final de la ordeña de cada vaca.

El consumo de concentrado se midió por la mañana y la tarde, donde al final del ordeño de cada grupo se recolectaba el rechazo si era el caso y se pesaba, con respecto al rechazo de forraje se recolecto cada tres días y se peso, en ambos casos se registraron inmediatamente los datos obtenidos para determinar el consumo total. El pesaje de las vacas se realizó individualmente, el primer día y el último de muestreo, siempre por las tardes antes del ordeño, para determinar la pérdida o ganancia de peso de las vacas.

Cuantificación de la Producción

La producción láctea se midió con un pesador (Waikato), cuyo mecanismo es dejar pasar al recipiente de acumulación, una cantidad proporcional de la leche que se está ordeñando de cada vaca. El recipiente del pesador era de color ámbar y tenía una graduación en Kg, con lo que se podía ver hasta donde había llegado la producción y así de esta manera tomar la lectura.

Cuantificación Físicoquímicas

Para medir las variables caseína, grasa, lactosa, proteína y sólidos totales, se utilizó el equipo MilkoScan FT 120 ® el cual se encuentra en el CDTIL (Centro de Desarrollo Tecnológico de la Industria Láctea), propiedad de la empresa Lácteos Menonitas de Chihuahua, ubicada en el campo 70, Km 44.5 carretera ojo de yegua, municipio de Riva Palacio. Dicho aparato trabaja a base de tecnología infrarroja, por lo cual tiene las virtudes de ver todo el espectro combinado con la precisión y la estabilidad de las técnicas tradicionales pero en un tiempo mucho menor, obteniendo resultados alrededor 23 de los 10 segundos, por lo que está aprobado por la AOAC (2000), este equipo emplea un interferómetro FTIR (Fourier Transform Infra Red). La transformación Fourier, se realiza por un procedimiento matemático (MilkoScan FT 120, 2000).

Cuantificación de Consumo Total

Esta variable fue determinada pesando el rechazo de concentrado del grupo tratamiento y del grupo testigo, con respecto al rechazo de forraje este se pesaba cada tres días, registrándose los datos inmediatamente en la hoja de control, de ambos tratamientos se saco un rechazo total y este se le resto a la dieta total ofrecida (Cuadro 27).

Cuantificación de Cambio Peso Corporal

El primero y último día de cada periodo de muestreo se pesaron cada una de las vacas, con una bascula digital TRU TEST 703, registrándose inmediatamente los animales y el peso que les correspondía, una vez obtenidos los pesos se saco el promedio por tratamiento y de esta manera se determino la diferencia de peso por tratamiento (Cuadro 28).

Análisis Estadístico

Se realizó un análisis de varianza, de las variables Caseína, Proteína Total, Grasa, Lactosa, Sólidos Totales y Producción de Leche. Tomando como efectos principales Vaca, Periodo y Tratamiento. Para dicho análisis se empleo el paquete estadístico SAS, (2002) y para la realización de las graficas se empleo el programa Microsoft Excel, (2003).

CUADRO 27. DIETAS TOTALES OFRECIDAS POR TRATAMIENTO.

Dieta	Ofrecido (Kg)	Rechazo (Kg)	Consumo Total (Kg)
Testigo	6350.4	142.5	6207.9
Tratamiento	6451.2	203.3	6247.9

CUADRO 28. CAMBIO DE PESO CORPORAL DURANTE TRATAMIENTOS.

Tratamiento	Kg Día 1	Kg Día 12	Kg Final
Testigo	13659	13581	-78
Manzarina	13647	13594	-53

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del análisis de varianza de las variables; de Caseína, Proteína Total, Grasa, Lactosa, Sólidos Totales (ST) y Producción de leche, se presentan en la siguiente discusión.

Caseína

La caseína tanto en el tratamiento Testigo como en el tratamiento Manzarina no se vio afectada ya que entre tratamientos no existe diferencia ($P>0.05$), sin embargo dicho componente se mantuvo dentro del rango aceptable ya establecido (Cuadro 29). Por otra parte pocos trabajos mencionan específicamente modificaciones enfocándose a la caseína, desde el punto de vista nutricional. Klei *et al.*, (1997) encontraron que la caseína se vio afectada negativamente por la frecuencia de ordeño de tres veces al día, sin embargo no se encontró efecto por la dieta que proporcionaron.

Con respecto al efecto de periodo sobre la caseína no existió diferencia ($P>0.05$), como se muestra en el (Cuadro 30), esto se puede deber a que dicho componente es relativamente estable, por lo que si se quiere modificar se necesita formular, específicamente para este componente con la incorporación de aminoácidos de sobrepaso.

Proteína Total

Con respecto a la proteína total de nuestro experimento no se encontró diferencia entre tratamientos ($P>0.05$), el comportamiento por tratamientos se muestra más adelante, casi como consecuencia esta variable se encuentra al igual que la caseína dentro de los parámetros aceptables establecidos.

CUADRO 29. MEDIAS \pm ERROR ESTANDAR DE LAS VARIABLES FISICO- QUIMICAS Y PRODUCCIÓN LACTEA POR TRATAMIENTO.

Variable	Testigo	Manzarina
Producción (Kg/día/vaca)	22.06 \pm 0.23 ^a	22.84 \pm 0.23 ^b
Caseína (%)	2.45 \pm 0.01 ^a	2.46 \pm 0.01 ^a
Grasa (%)	3.24 \pm 0.05 ^a	3.17 \pm 0.05 ^a
Lactosa (%)	4.45 \pm 0.01 ^a	4.45 \pm 0.01 ^a
Proteína (%)	3.20 \pm 0.01 ^a	3.22 \pm 0.01 ^a
Sólidos Totales (%)	11.63 \pm 0.05 ^a	11.55 \pm 0.05 ^a

Literales diferentes entre columnas indican diferencia ($P < 0.05$).

CUADRO 30. MEDIA \pm ERROR ESTANDAR DE LAS VARIABLES FISICO- QUIMICAS Y PRODUCCIÓN LACTEA POR PERÍODO.

Variable	Periodo 1	Periodo 2	Pr>F
Producción (Kg/día/vaca)	22.30 \pm 0.23 ^a	22.58 \pm 0.23 ^a	0.4372
Caseína (%)	2.45 \pm 0.01 ^a	2.46 \pm 0.01 ^a	0.6962
Grasa (%)	3.35 \pm 0.05 ^a	3.06 \pm 0.05 ^b	0.0006
Lactosa (%)	4.41 \pm 0.01 ^a	4.49 \pm 0.01 ^b	0.0001
Proteína (%)	3.21 \pm 0.01 ^a	3.21 \pm 0.01 ^a	0.8540
Sólidos Totales (%)	11.71 \pm 0.05 ^a	11.48 \pm 0.05 ^b	0.0027

Literales diferentes entre columnas indican diferencia ($P < 0.05$).

En lo que respecta a trabajos con ingredientes proteicos en la dieta de vacas lecheras y su efecto sobre la proteína láctea, Wright *et al.*, (1998), evaluaron niveles de proteína no degradada en rumen (UPR), determinando una respuesta lineal en la producción de proteína láctea al aumentar la UPR de la dieta, pero no una mejora de la concentración de dicho componente por lo que coincidimos con ellos ya que obtuvimos resultados muy parecidos. Sin embargo no coincidimos con Depeters y Cant (1992) que reportaron una mejor respuesta ante restricciones de proteína previas en la dieta, esto coincide con lo reportado por Sutton (1989). Sobre el efecto del bagazo de manzana con una inclusión de 30% en la alimentación de vacas lecheras, Anrique y Dossow (2003) reportaron un aumento en la proteína láctea de 0.14%, por lo que no coincidimos con este resultado.

Con la inclusión del 70% de saccharina del concentrado total, dicho sea de paso, el ingrediente antes mencionado es lo más parecido al ingrediente que utilizamos en el presente trabajo (Manzarina), se reportaron resultados similares a los de nuestro trabajo donde mantuvo los niveles de proteína de la leche dentro de los rangos normales (Reyes *et al.*, 1993), coincidiendo de esta manera con nuestros resultados.

Respecto al efecto de periodo para proteína total, no existió diferencia ($P > 0.05$), esto se debe en gran medida y prácticamente como consecuencia lógica de que en la caseína tampoco existió diferencia y como esta forma alrededor del 80% de la proteína total, era poco probable que esta última en mención sufriera algún cambio.

Grasa

El comportamiento de esta variable no presentó diferencia entre tratamientos ($P > 0.05$), sin embargo en ambos tratamientos los parámetros se mantuvieron dentro de los rangos ya establecidos por Villegas (2004), en lo que respecta a el tratamiento de manzarina nuestros resultados coinciden con los de Reyes *et al.*, (1993), ya que en este caso mantuvieron los parámetros dentro de lo normal aun

que con una pequeña disminución del porcentaje de grasa, sin embargo no coincidimos con lo reportado por Anrique y Dossow (2003), que no solo mantiene el componente sino que lo aumenta. En nuestro caso el no haber podido aumentar la grasa láctea, se puede atribuir a varios factores que no proporcionaron las condiciones necesarias para un aumento, el primero de ellos es una fuente de fibra de pobre calidad (Avena y/o Alfalfa), ya que el forraje es determinante para la formación de ácidos grasos volátiles y estos a su vez son fundamentales para la formación de grasa láctea, principalmente acetato y como segundo en importancia el butirato (McDonald *et al.*, 1999). Un segundo factor que pudo influir es que a medida que la producción de leche aumenta el porcentaje de grasa baja (Kertz, 2002) como sucedió en este trabajo donde el tratamiento manzarina tuvo una mayor producción y por lo cual inferimos que como consecuencia no se logro un aumento en el porcentaje de grasa.

El último punto y a su vez muy importante a considerar por lo específico del mismo, es que Villegas (2004) reporta que en nuestro país las explotaciones intensivas con ganado Holstein tienen un rango de variación de la grasa láctea, que va de 3.0 a 3.5%, por lo que basándonos en la primer cifra podríamos decir que los resultados que obtuvimos en el presente trabajo se produjo un aumento de la grasa en 0.17%.

Con respecto al efecto de periodo en esta variable, si existió diferencia entre periodo ($P < 0.05$), dándose una mayor producción en el primero, esto se pudo deber a que al comienzo del experimento las vacas tenían una menor producción de leche y por lo tanto una mayor concentración de grasa, sin embargo conforme aumento la producción la grasa disminuyó.

Lactosa

El comportamiento de este componente con ambos tratamientos fue de la siguiente manera: los resultados del tratamiento testigo como el de manzarina se mantuvieron ligeramente por debajo (0.05%) de los rangos normales (4.5%), por lo que no existió diferencia entre tratamientos ($P > 0.05$), en ambos

casos esta respuesta la podemos calificar hasta cierto punto como normal y esperada, ya que a pesar de que se conoce gran parte del proceso de síntesis (Bunting, 2004), hasta estos momentos alterar la lactosa por medio de la alimentación ha resultado poco práctico y aplicable según Jenkins y Mc-Guire, (2006). La estabilidad que presenta la lactosa, frente al efecto alimentación se debe a la función osmótica que lleva acabo y que por lo tanto limita o regula la producción y dificulta modificarla, ya que se puede decir que este componente, es el que da el equilibrio a la glándula mamaria y en general el metabolismo de la vaca que se encuentra en producción (Park y Jacobson, 1999). Por los resultados obtenidos en este trabajo con el tratamiento manzarina, coincidimos con lo que reporto Anrique y Dossow (2003), donde no encontré cambios en la lactosa a pesar de que los esperaba. Por otro lado también coincidimos con lo reportado por Reyes *et al.*, (1993), donde igualmente no encontré cambios en la concentración del componente lactosa, por lo que podemos suponer que el ligero decremento de la lactosa en ambos tratamientos de nuestro experimento no se debió a la alimentación sino a otro tipo de factores, pudiendo influir la presencia de mastitis y la genética de los animales que formaron parte del estudio.

Hasta cierto punto resulta confuso este decremento, debido a que la producción de leche con el tratamiento manzarina se logro aumentar, como se discutirá más adelante y para lograr este aumento, forzosamente se tuvo que sintetizar una mayor cantidad de lactosa, por lo que nos inclinamos más por la influencia de los factores antes mencionados para este descenso. Con respecto al efecto de periodo en la variable lactosa, si existió diferencia ($P < 0.05$), la cual reporta un mayor porcentaje en el segundo periodo, que en el primero esto se puede deber a que cuando se inicio el experimento, el manejo de los animales, con respecto a la salud de la glándula mamaria, no era el idóneo, ya que existía un mayor número de vacas con mastitis subclínica, por lo que suponemos que la lactosa aumentó el segundo

periodo, debido a que ya se había establecido un programa de manejo para mantener la salud de la ubre, con lavado de ubres adecuado, selladores y diagnósticos rutinarios de mastitis subclínica.

Sólidos Totales

El comportamiento de esta variable la cual nos indica un comportamiento muy homogéneo, así pues entre tratamientos no existió diferencia ($P>0.05$), de igual forma esta variable se mantuvo dentro de los rangos aceptables, puesto que la suma de la lactosa, grasa y proteína total más minerales, que en este experimento no se tomo como una variable de importancia a medir, sin embargo el sistema Milko Scan FT120® calculó automáticamente el porcentaje de minerales, para hacer la suma y dar el resultado de sólidos totales. Por lo antes dicho esta variable solo corrobora los resultados obtenidos y antes mencionados de los principales componentes de la leche en este experimento. Con respecto al efecto de periodo en la variable sólidos totales, se encontró diferencia entre periodos ($P<0.05$), siendo mayor el porcentaje en el primero que en el segundo, lo que coincide con el primer periodo de la variable grasa, por lo que se le atribuye el aumento de los sólidos totales en el primer periodo.

Producción de Leche

Esta variable en un sistema de producción de leche es la que más interesa, en lo que respecta al presente trabajo en esta variable, existió diferencia entre tratamientos ($P<0.05$), la cual se dio a favor del tratamiento manzarina ya que produjo 780 gr. más en promedio que el tratamiento testigo.

La producción por vaca en ambos tratamientos se muestra más adelante (Cuadro 31). Este cuadro nos indica que existieron vacas (51 y CF169) que tuvieron un producción de 30 Lts o más en el tratamiento manzarina, lo que nos demuestra que esta dieta cubrió las necesidades nutricionales de las vacas para producir dichas cantidades.

CUADRO 31. PRODUCCIÓN DE LECHE POR VACA EN Kg CON Y SIN MANZARINA.

Vaca	Tratamiento	
	Manzarina	Testigo
139	27.171	27.171
193	24.371	23.142
205	14.028	13.085
208	24.314	23.457
221	21.100	24.114
27	26.771	25.657
303	27.228	25.057
51	33.028	30.771
58	15.271	13.842
72	21.800	17.200
B49	27.685	27.585
B53	28.742	26.142
B91	14.385	15.371
B92	17.942	17.700
C66	20.314	20.857
C79	22.042	21.485
CB151	26.657	25.885
CB44	15.742	15.942
CB49	18.142	16.285
CF169	30.428	29.571
D109	26.628	26.400
D112	18.628	18.657

Los primeros cinco días para el tratamiento manzarina fueron un poco variables, ya que del primer día al tercero se produjo el mayor descenso en la producción alcanzando 20.74 kg es decir 1.09 kg menos que el primer día de muestreo, las causas de este descenso, no están claras, pero se pueden atribuir a que el forraje proporcionado al grupo fue de mala calidad en estos días, ya que el resto de los factores de manejo y alimentación fueron controlados y homogéneos, sin embargo del sexto día en adelante se mostró un aumento gradual de la producción hasta llegar al último día de muestreo (12) con una producción de 23.38 kg, lo que nos indica prácticamente una tendencia lineal a seguir aumentando o por lo menos mantenerse en el promedio de los 23 kg por vaca.

Este aumento en la producción se puede inferir que se debe o está influenciado por la proteína de la manzarina, ya que cubrió de una manera más completa las necesidades fisiológicas de las vacas, aportando el nitrógeno necesario para un buen crecimiento bacteriano en el rumen, que a su vez desdobló la fibra proporcionada en la ración y de esta manera se produjo una cantidad suficiente de ácidos grasos volátiles que permitieron cubrir la necesidad de energía metabolizable para lactación y como consecuencia se dio una mayor producción de leche. Este metabolismo y efecto de la proteína de manzarina coincide con lo reportado por Galindo *et al.*, (1996). Respecto al aumento en sí de la producción de leche resultados similares y por lo tanto coincidentes se han reportado en varios experimentos donde mejorando los niveles o tipo de proteína obtuvieron mayores rendimientos en producción (Cressman *et al.*, 1980), (Foster *et al.*, 1983), (McGuffey *et al.*, 1990), (Zimmerman *et al.*, 1991), (Reyes *et al.*, 1993), (O'mara *et al.*, 1998) y (Kalscheur *et al.*, 1999).

Con respecto al efecto de periodo en la variable producción de leche, no se encontró diferencia entre periodos ($P > 0.05$), lo cual se puede deber a que el tratamiento manzarina produjo más independientemente del periodo, por lo que los periodos siempre se mantuvieron con producciones muy similares.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El uso de manzarina en dietas para vacas en producción mejoró la producción de leche en 780 gr en promedio, la cual pudo estar asociada a una mayor calidad en el aporte de proteínas de la manzarina.

El estudio concluye que la caseína esta dentro de los rangos normales formando el 77% de la proteína total, que a su vez cumplió con los rangos necesarios. De igual forma la grasa se mantuvo dentro de los rangos establecidos.

Con respecto a la lactosa, esta no se mantuvo dentro de los rangos mínimos establecidos. Los sólidos totales prácticamente como consecuencia de los resultados de las variables antes mencionadas, se mantuvo dentro de los rangos aceptables. Con excepción de la producción de leche, los resultados antes mencionados fueron tanto para el tratamiento testigo como para el tratamiento manzarina, por lo que podemos concluir que la inclusión de manzarina en dietas para vacas lecheras no afecta los componentes caseína, proteína total, grasa, sólidos totales ni la lactosa.

Por todos los aspectos antes mencionados podemos recomendar a la manzarina como un ingrediente proteico más, que puede ser incorporado a la ración de vacas lecheras en etapa temprana, formando parte del concentrado en un diez por ciento o 5.42% de la dieta total.

De igual forma se recomienda y es necesario llevar acabo otros estudios similares, con la variante de que se aumente el contenido de manzarina en la dieta, utilizar otro tipo de fibra en la dieta como silo de maíz y hacer más extenso el periodo de muestreo. Con el fin de determinar o establecer el rango de uso de la manzarina y conocer si sus efectos sobre los componentes fisicoquímicos y producción de leche mejoran con un consumo más prolongado de este ingrediente.

CAPITULO 8. COMPORTAMIENTO PRODUCTIVO Y CARACTERÍSTICAS DE LA
CANAL DE OVINOS ENGORDADOS CON Y SIN MANZARINA

Camilo Hernández Gómez

RESUMEN

Se evaluó cinética de fermentación *in vitro*, comportamiento en engorda y características de la canal de ovinos alimentados con 10.91% de manzarina (TM) y sin manzarina (TT). Para la cinética de fermentación se utilizaron tres ovinos fistulados en el rumen con peso de 60 ± 2.5 kg como donadores de líquido ruminal. Se midió la cinética de la degradabilidad de materia seca (MS) por la técnica de producción de gas *in vitro* (PG). Se evaluó la PG y la producción de amoníaco (PA) a 2, 4, 8, 16, 24 y 48 h. Los perfiles de PG se ajustaron por el modelo monofásico de Groot *et al.* (1996). La PG, PA y parámetros de fermentación (A, B y C) por h se analizaron con Proc GLM; utilizando como efectos la corrida de gas y la dieta. No hubo diferencia ($P > 0.05$) en la PG ni en los parámetros de fermentación a lo largo de la prueba. La PA no mostró diferencia ($P > 0.05$) entre dietas durante la incubación, únicamente hubo diferencia ($P < 0.05$) a la h 16, siendo en TM 13.97 ± 0.69 y en TT 17.65 ± 0.69 mmol/L. Para el comportamiento productivo y características de la canal, se utilizaron 12 machos (M) y 12 hembras (H) (Charollais X Dorper y Katahdin) con un peso inicial de 25.5 ± 3.3 kg. Los corderos se asignaron aleatoriamente a uno de los dos tratamientos: TM y TT. Las variables productivas fueron peso final por periodo (PFP) y por día, peso vivo final (PVF), consumo de alimento (CONS), ganancia diaria de peso (GDP) y conversión alimenticia (CA). Las características de la canal evaluadas fueron: rendimiento de la canal (REND), área del ojo de la costilla (AOC) y espesor de grasa dorsal (EGD). Las variables productivas se analizaron con el Proc Mixed, con un modelo que incluyó el efecto dieta, sexo y su interacción, la corraleta como efecto aleatorio, el periodo de prueba como variable indicadora y peso inicial a la prueba como covariable. Los datos de la canal se analizaron en Proc GLM, con un modelo que incluyó como efectos fijos el sexo, la dieta y su interacción. Todos los análisis se hicieron con el paquete estadístico SAS 9.0 (2002). La ganancia de peso mostró un incremento lineal ($P < 0.01$) a través de la prueba donde M con TM tuvieron mayor PFP (4.76 ± 0.2 kg) y GDP (0.35 ± 0.02 kg) que los M con

TT (3.9 ± 0.2 y 0.31 ± 0.02 kg), y un PVF de 44.6 ± 0.8 y 42 ± 0.7 kg respectivamente. Las H con TM tuvieron un PFP de (3.65 ± 0.27 kg) y GDP (0.25 ± 0.02 kg) y las H con TT (4.1 ± 0.27 y 0.3 ± 0.02 kg), y un PVF de 38.9 ± 0.7 y 41.4 ± 0.7 kg respectivamente. El CONS fue lineal a lo largo de la prueba ($P < 0.01$) con un incremento de 2.68 g d⁻¹ por cordero. La CA fue diferente ($P < 0.05$) por sexo, en M fue de 5.4 ± 0.2 y en H de 4.5 ± 0.2 . El REND mostró diferencia ($P < 0.06$) en la interacción dieta*sexo, M con TM tuvieron $48.00 \pm 1.25\%$ y M con TT $50.23 \pm 1.14\%$, mientras que en H con TM fue de $51.52 \pm 1.23\%$ y H TT $48.96 \pm 1.15\%$. Para AOC no hubo diferencia ($P > 0.05$) en la interacción dieta*sexo. El EGD mostró significancia ($P < 0.06$) por efecto de sexo, donde H 4.5 ± 0.8 mm y M 2.5 ± 0.8 mm, no hubo efecto de tratamiento ($P > 0.05$). Concluimos que la utilización de manzarina en dietas para ovinos es factible, debido a que la inclusión no alteró drásticamente el comportamiento productivo de los ovinos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción del Área de Estudio

Este estudio se realizó en el laboratorio de nutrición animal y en la unidad metabólica de la Facultad de Zootecnia de la Universidad Autónoma de Chihuahua, la cual se ubica sobre el km 1.5 del periférico Francisco R. Almada, en la Ciudad de Chihuahua, a una altitud de 1440 msnm, con una temperatura media anual de 18.6 °C, precipitación media anual de 336 mm³ y su localización geográfica está en los 28° 35' Latitud Norte y 106° 04' Longitud Oeste (INEGI, 2007).

Elaboración de Manzarina

Para la elaboración de manzarina se utilizó bagazo de manzana el cual se obtuvo en la ciudad Álvaro Obregón, municipio de Cuauhtémoc, del Estado de Chihuahua y se trasladó a esta facultad. Posteriormente, con la ayuda de un tractor se hizo la cama de fermentación con medidas aproximadas de 1.50 m de ancho y 15 m de largo, a las cuales se les añadió 1.5% de urea, 0.5% de una mezcla mineral y 0.4% de sulfato de amonio (en base al peso húmedo total de BM) e inmediatamente se mezcló con un implemento agrícola llamado rotatiller, permitiéndose la fermentación. La cama fue removida para permitir la aireación, cuatro veces el día de mezclado (día 0), y tres veces diariamente del día 1 al día 6 de fermentación con implementos agrícolas (tractor y rotatiller). El día 7 de fermentación, la cama de fermentación se extendió sobre el suelo para deshidratar al sol hasta que alcanzó un contenido de materia seca (90%) que permitiera su almacenamiento. Se reportó un contenido de 26% proteína cruda y 13% de proteína verdadera.

Cinética de Fermentación

Las dietas evaluadas son las mismas que se utilizaron para la fase de alimentación de los ovinos en jaulas metabólicas y su análisis químico se muestra en el Cuadro 32.

CUADRO 32. COMPOSICIÓN DE LAS DIETAS UTILIZADAS EN LA ALIMENTACIÓN DE LOS OVINOS

Ingrediente	Nivel de Manzarina	
	Sin Manzarina	Con 10.91% Manzarina
	% de BS	
Alfalfa	38.43	28.72
Soya	12.44	9.41
Maíz Rolado	42.54	43.34
Manzarina	0	10.91
Grasa animal	1.98	2.29
Melaza	3.12	3.61
Sal	0.66	0.76
Pre mezcla mineral	0.82	0.95
Total	100	100
Parámetros químicos*	% MS	
MS	90.59	91.32
PC	11.44	11.43
EE	5.76	6.43
FDN**	21.45	23.84
FDA**	10.81	13.17
FC	15.0	20.0
CEN	7.23	7.31

*Análisis según la AOAC.

**Análisis según Van Soest *et al.* (1991)

Para la obtención del líquido ruminal fueron utilizados tres ovinos de 60 kg en promedio de peso vivo, provistos de cánula ruminal. Los ovinos fueron alimentados individualmente a las 08:00 h diariamente y recibieron una dieta que contenía 60% alfalfa y 40% concentrado comercial y agua limpia *ad libitum*. Los borregos fueron confinados en corraletas individuales para un mejor manejo. Se extrajo contenido ruminal a cada ovino en diferentes partes del rumen inmediatamente antes de alimentarlos, y el líquido ruminal se mezcló para homogeneizarlo y hacer un concentrado de los tres animales, filtrándose con una malla. Se trasladó al laboratorio en un recipiente térmico a 39°C para su inmediata utilización en la producción de gas. La incubación se realizó mediante la técnica descrita por Menke y Steingass (1988) quienes usaron frascos de vidrio de 50 ml, a los cuales se les puso 200 mg de muestra por triplicado para ajustar la variabilidad de las muestras y los datos se registraron en una libreta de campo.

Prueba de Alimentación

Descripción de la población. Los animales utilizados en esta investigación provienen del rancho Teseachi propiedad de la Universidad Autónoma de Chihuahua. Fueron un total de 24 ovinos, 12 machos con un peso inicial promedio de 25.5 ± 3.3 kg y 148 ± 9.5 días de edad, y 12 hembras con peso inicial promedio de 25.3 ± 2.9 kg y 146 ± 6.2 días de edad, resultantes todos de la cruce de Charolláis como raza paterna y Katahdin y Dorper como raza materna.

Todos los animales fueron acondicionados por un periodo de 30 días y recibieron heno de alfalfa y 300 g de concentrado por animal. Pasado este periodo, se alojaron en jaulas metabólicas individuales en donde permanecieron hasta el final de la engorda.

Distribución de los animales a la dieta. Los ovinos fueron distribuidos aleatoriamente en jaulas metabólicas individuales, quedando 2 grupos de seis hembras y 2 grupos de seis machos, formados aleatoriamente, de los cuales tres ovinos fueron alimentados con manzarina y tres con la dieta

sin manzarina, así mismo para los demás grupos de animales. Ya en las jaulas, a los animales se les dio 5 días de adaptación a la dieta antes de iniciar con la toma de datos.

Descripción de las dietas utilizadas. Se utilizaron dos dietas, la primera contenía 10.91% de manzarina y la otra 0% manzarina, formuladas de acuerdo a la NRC (1985) para ovinos en crecimiento, con un incremento de peso de 300 g^{-1} por día y siendo ambas dietas isoproteicas e isoenergéticas. Los ingredientes utilizados fueron los mismos en ambas dietas y solo cambiaron en su proporción al incluir manzarina en la dieta tratamiento.

Alimentación de los animales. El alimento se elaboró en el laboratorio de procesamiento de alimentos de la Facultad de Zootecnia, mezclándose en forma integral todos los ingredientes. El alimento mezclado fue ofrecido una sola vez a las 08:00 h diariamente y agua a libre acceso. La cantidad de alimento ofrecido se ajustó en base al consumo del día anterior y procurando que fuera más de lo requerido por el animal para que al pesar el rechazo hubiera suficiente el cual fue pesado y registrado cada tercer día. 19

Variables Evaluadas en la Cinética de Fermentación

Producción de gas *in vitro* (PG). La cantidad de gas liberado está estrechamente relacionado con la degradabilidad del alimento. Se hicieron dos repeticiones de PG *in vitro* (incubación), para disminuir la variabilidad entre corridas de gas. El procedimiento de PG se realizó de acuerdo con la técnica de Menke y Steingass (1988). La incubación se llevó a cabo en frascos de vidrio de 50 ml, (cada frasco se consideró como unidad experimental), por triplicado, a los cuales se les agregó 200 mg de muestra, previamente molida en malla de 1 mm y como inóculo 30 ml de líquido ruminal más saliva artificial (1:2, v/v). Se prepararon una solución A (micromineral) con $13.2 \text{ g}^{-1} \text{ CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $10.0 \text{ g}^{-1} \text{ MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $1.0 \text{ g}^{-1} \text{ CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $8.0 \text{ g}^{-1} \text{ FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 100 ml con agua destilada; la solución B (solución búfer) que constó de $39.0 \text{ g}^{-1} \text{ NaHCO}_3$ ó $35.0 \text{ g}^{-1} \text{ NaHCO}_3 + 4.0 \text{ g}^{-1}$ de $(\text{NH}_4) \text{HCO}_3$ en 1 litro

con agua destilada; la solución C (macro mineral) constituida por $5.7 \text{ g}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4$, $6.2 \text{ g}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$, $0.6 \text{ g}^{-1} \text{ Mg SO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ en 1 litro con agua destilada; solución resazurina (100 mg de resazurina) hecha en 100 ml con agua destilada; y la solución reductora que consta de 4 ml 1N NaOH, 625 mg $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, agregado a 95 ml de agua destilada. En un matraz 2 litros se preparó saliva artificial la cual consistió en agua destilada (950 ml), solución macro (480 ml) y micromineral (0.24 ml), solución búfer (480 ml) y resazurina (2.44 ml) (Menke y Steingass, 1988) y se preparó un día antes y se mantuvo en agitación constante a 38°C durante toda la noche dentro de una incubadora. Se usó CO_2 durante la preparación del medio para asegurar un ambiente anaerobio en el tiempo de incubación. Los frascos se sellaron y se colocaron en una incubadora electrónica y de 20 movimiento constante (Shaker I2400) a 39°C por 48 h que duró la fermentación; la presión dentro de los frascos se midió con un transductor de presión a las 2, 4, 8, 16, 24 y 48 h de fermentación. Se extrajeron los frascos correspondientes y se metieron por 24 h a un congelador a -4°C para detener la fermentación; pasado este tiempo se descongelaron y centrifugaron a 3000 rpm durante 30 min. Del líquido sobrenadante se tomaron 5 ml y se congelaron para la posterior determinación de nitrógeno amoniacal y el sedimento se desechó. Los datos se ajustaron al modelo monofásico de Groot *et al.*, (1996), el cual fue:

$$CCIBAG+=1$$

En esta ecuación, G ($\text{ml g}^{-1} \text{ MS}$) denota la cantidad de gas producido por gramo de MS incubada, en el tiempo t después de la incubación. A ($\text{ml g}^{-1} \text{ MS}$) representa la producción de gas asintótica. B (h) es el tiempo después de la incubación en la cual la mitad de la asintótica de la cantidad de gas ha sido formada y C es una constante que determina la forma y las características del perfil, por lo tanto la posición del punto de inflexión.

Producción de amoníaco (PA). Del sobrenadante obtenido de la centrifugación del contenido de los frascos en los que se llevó a cabo la PG, se determinó la concentración de amoníaco ($\text{mg NH}_3/\text{l}$) con la técnica adaptada de Broderick y Kang (1980). Para esta técnica se usaron soluciones de fenol e hipoclorito, la determinación se realizó por triplicado para disminuir la variabilidad entre muestras, tomándose la absorbancia (intensidad de la luz que es pasada por una muestra) con un espectrofotómetro marca Coleman 460 a 21 630 nm. La ecuación de predicción a la cual se ajustaron las absorbancias se obtuvo en base a estándares de solución de sulfato de amonio.

Variables Evaluadas Durante la Prueba de Alimentación

Consumo diario de alimento (CDA). Se pesó diariamente el alimento ofrecido en una charola tarada con una balanza electrónica y el rechazo fue medido de la misma forma cada tercer día. Por diferencia entre ambos se obtuvo el CDA.

Ganancia diaria de peso (GDP). Para la medición de esta variable los corderos fueron pesados antes de ser alimentados, cada 14 días en una báscula electrónica Tru-test AG 500 Series equipada con jaula metálica, obteniendo los valores por diferencia del peso actual con respecto al peso anterior, cuyo peso fue considerado como ganancia por periodo y dividiendo el peso entre 14 días para sacar la GDP.

Conversión alimenticia (CA). Esta variable mide la capacidad que tienen los animales para transformar el alimento en tejido corporal y es el resultado del cociente entre CDA y GDP.

Variables Evaluadas al Sacrificio de los Animales

Sacrificio de los ovinos. Al llegar a término la engorda (56 d) los animales fueron pesados para obtener el peso final de la engorda, dietándose por 24 h para posteriormente sacrificarlos en el rastro de la Facultad. El sacrificio fue rápido utilizando una pistola de aire con el fin de insensibilizar al animal y así desangrarlos cortando la yugular.

Se recolectó la sangre depositándola en bolsas para posteriormente desecharlas, la piel del animal fue retirada, la cabeza, patas y vísceras se depositaron en bolsas de plástico y se desecharon. El peso de la canal caliente fue medido y se dejaron orear las canales por 2 h 22 para después meterlas a un cuarto frío a temperatura de 4 °C por 24 h. Al día siguiente fue tomado el peso de la canal fría y la canal fue cortada longitudinalmente para hacer las mediciones de AOC y EGD.

Rendimiento de la canal (REND). Se tomó el peso de la canal fría para sacar el REND comercial ya que han pasado 24 h y ha ocurrido pérdida de humedad, y es expresado en porcentaje, tomando como referencia el peso vivo del animal al sacrificio. Es sumamente importante porque indica la eficiencia carnicera del animal, para obtenerlo, el peso de la canal fría se divide entre el peso vivo y se multiplica por 100 (Boggs *et al.*, 1998).

Área del ojo de la costilla (AOC). Esta medida es rápida y fácil de realizar en la canal y es un indicador del rendimiento de cortes. Para esta medición se tomó el lado derecho de la canal y se cortó transversalmente entre la 12a y 13a costilla con la finalidad de observar el músculo *Longissimus dorsi*. La medición del AOC se hizo con una cuadrícula de puntos graduada en cm², de la cual cada punto correspondió a un cm².

Espesor de grasa dorsal (EGD). La medición del espesor de la grasa alojada en la zona dorsal de la canal, es una de las determinaciones objetivas más empleadas. La medición del EGD se hizo con una regleta graduada en mm. Se llevó a cabo a la altura de la 12a y 13a costilla tomando como referencia el borde del músculo *Longissimus dorsi* en forma transversal y la parte dorsal.

Análisis Estadístico

Se ajustó el modelo de Groot a los datos de producción de gas y amoníaco a través de las horas de incubación en cada repetición de las dietas con y sin manzarina por el Proc NLIN del SAS (2002). Las estimas de los 23 parámetros A, B y C del modelo de Groot obtenidas con el ajuste en cada repetición fueron analizadas por un Proc GLM del SAS (2002) para evaluar el efecto del nivel de manzarina sobre los parámetros de la curva de producción de gas. Las variables productivas se analizaron con un Proc Mixed con dieta, sexo y su interacción como efectos fijos, el animal como efecto aleatorio y como covariable el peso inicial de los animales a la prueba. Los datos de la canal se analizaron con el Proc GLM con un modelo que incluyó el efecto de la dieta, del sexo y de su interacción. Estos análisis se desarrollaron en el paquete estadístico SAS V9.0 (2002).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Producción de Gas

La producción de gas acumulativa (ml/200mg MS) durante la fermentación in vitro de dietas con y sin manzarina se muestra en el (Cuadro 33). La PG en ambas dietas se incrementó conforme transcurrió el tiempo de la incubación, no encontrándose diferencia ($P>0.05$) en los diferentes tiempos de fermentación, pero al final de la fermentación (48 h), en la dieta con manzarina la PG fue mayor que la dieta sin manzarina (64.06 ml vs 63.36 ml). Lo anterior no coincide con lo reportado por Menke y Steingass (1988) quienes mencionaron que los perfiles de producción de gas de forrajes o raciones completas son diferentes cuando sus componentes nutricionales varían en sus concentraciones. Los forrajes y raciones con concentraciones similares pueden variar en su perfil o en los parámetros (A, B y C) de degradabilidad ruminal, debido a factores asociados entre nutrientes y a la conformación o arreglo de estos en cada ingrediente (Liu *et al.*, 2002), lo cual en esta investigación no ocurrió así. En este caso la concentración de nutrientes en las raciones no fue diferente entre dietas ni tampoco los volúmenes de producción de gas indicando que tienen un comportamiento de degradabilidad similar, aunque el origen de los nutrientes en la ración haya variado al incluir la manzarina en una de ellas.

Los parámetros de PG (A, B y C) no mostraron diferencia ($P>0.05$) entre dietas ni entre horas de incubación, siendo mayores en la dieta con manzarina (A 77.04 ml, B 10.71 h y C 1.15 ml/h) que en la dieta sin manzarina (A 76.52 ml, B 10.0 h y C 1.11 ml/h), lo cual quiere decir que la inclusión de manzarina en la dieta para ovinos no afectó la fermentación ruminal. Esto coincide con lo reportado por Cone y Van Gelder (2000), quienes mencionaron que la proteína no es extensamente fermentada y la producción de amoníaco, reduciendo así el volumen de producción estimada de gas.

CUADRO 33. MEDIAS DEL VOLUMEN DE PRODUCCIÓN EN ml DE GAS (\pm EE) DE DIETAS CON Y SIN MANZARINA A DIFERENTES TIEMPOS DE INCUBACIÓN, Y LA ESTIMACIÓN DE LOS PARÁMETROS DEL MODELO DE GROOT AJUSTADO A LOS DATOS

Horas **	Nivel de Manzarina		EE*
	Con 10.91% Manzarina	Sin manzarina	
2	11.06	12.39	0.65
4	19.80	21.53	0.89
8	32.84	34.32	1.14
16	47.02	47.71	1.62
24	55.66	55.71	2.74
48	64.06	63.36	4.14
Estimación de los parámetros del modelo monofásico de Groot			
A (ml)	77.04	76.52	6.33
B (h)	10.71	10.0	1.48
C (ml/h)	1.15	1.11	0.07

* Error estándar igual para las estimas de ambas dietas

** La producción de gas en cada hora se presenta en ml

Aun cuando la manzarina reemplazó parte de la pasta de soya y alfalfa (10% en conjunto) no afectó el comportamiento de las dietas durante la cinética de producción de gas.

Producción de Amoniaco

La ecuación de predicción ($Y = -0.359620 + 10.0750 X1$) y un ajuste de ($R^2=93.4\%$) a la cual se ajustaron las absorbancias fue hecha con una regresión lineal en el software Minitab 14. La producción de amoniaco durante la fermentación *in vitro* se muestra en el (Cuadro 34). Únicamente se encontró diferencia ($P<0.05$) entre dietas a las 16 h (13.97 mmol/l en la dieta con manzarina y 17.65 mmol/l en la dieta sin manzarina) indicando diferencia en el parámetro de fermentación de la proteína, lo que se interpreta de alguna manera como una cierta tendencia a retrasar la degradabilidad de la proteína cuando se incluye manzarina en la dieta, sin embargo esto no alteró el volumen de producción de gas, lo cual es indicio de que ésta diferencia no fue persistente. Se sabe que altas concentraciones de proteína degradable en el rumen afectan los perfiles de producción de gas debido a la acumulación de bicarbonato amónico (NH_4HCO_3) cuando el amoniaco es liberado por la degradación de las proteínas, pero estos efectos no se presentan *in vivo* pues los metabolitos ruminales están en constante flujo (Menke y Steingass, 1988). Para optimizar la fermentación ruminal del forraje, un suministro de NH_3 adecuado en el rumen es necesario para proporcionar la mayoría del Nitrógeno para el crecimiento bacteriano (Satter y Slyter, 1974).

Sin embargo, esta investigación muestra que para dietas similares a las que se evaluaron (con manzarina y sin manzarina), la pasta de soya y heno de alfalfa pueden ser sustituidos como ingredientes por la manzarina en el porcentaje utilizado en este trabajo, debido a que la adición de ésta a la dieta no muestra diferencias en la degradabilidad de la materia seca ni en la producción de amoniaco *in vitro*.

CUADRO 34. MEDIAS DE PRODUCCIÓN DE AMONIACO (mmol NH₃/L) (± EE) EN DIETAS CON Y SIN MANZARINA A DIFERENTES TIEMPOS DE INCUBACIÓN *IN VITRO*

Horas	Nivel de Manzarina		EE*
	Con 10.91% manzarina	Sin manzarina	
2	4.12	5.02	0.82
4	5.36	5.50	1.48
8	7.34	7.15	0.94
16	13.97 ^a	17.65 ^b	0.69
24	16.6	17.8	0.49
48	20.11	20.61	0.17
Estimación de los parámetros del modelo monofásico de Groot			
A (mmol)	22.14±1.0	23.53±0.87	
B (h)	10.97±0.88	10.51±0.76	
C (mmol/h)	1.72±0.24	1.37±0.20	

^{a,b} Literales distintas en el mismo renglón indican diferencia estadística (P<0.05)

*Error Estándar de las horas igual para las estimas de ambas dietas

Peso Vivo Final (PF) a la Prueba

Esta variable tuvo un comportamiento lineal ($P < 0.01$) a través de la prueba. Sin embargo, en la muestra el comportamiento más detallado a lo largo de la prueba. La covariable peso inicial tuvo un efecto importante ($P < 0.05$) en el PF. Estos resultados muestran un comportamiento biológico similar entre dietas y sexos, debido a que las dietas se formularon isoproteíca e isoenergéticamente de acuerdo con los requerimientos nutricionales para ovinos para desarrollo (NRC, 1985). Para esta variable se encontró significancia ($P < 0.05$) en la interacción dieta*sexo. Los machos que consumieron manzanarina tuvieron un incremento promedio de 4.76 ± 0.19 kg por periodo, y un PF de 44.58 ± 0.77 mientras que en los que consumieron la dieta sin manzanarina fue de 3.96 ± 0.19 kg y 41.97 ± 0.71 kg de PF. Sin embargo, las hembras que consumieron manzanarina mostraron un menor incremento de 3.65 ± 0.27 kg por periodo, en tanto las que consumieron la dieta sin manzanarina mostraron 4.05 ± 0.27 kg, con PF promedio de 38.95 ± 0.76 y 41.46 ± 0.72 kg respectivamente. Sin embargo, Manzanilla (2005) reportó en ovinos alimentados con alfalfa, pasta de soya maíz y heno de alfalfa que el PF a 210 días de edad para crías machos de sementales Dorper fue de 55.70 ± 0.97 kg, Charollais fue de 48.58 ± 1.50 kg, Pelibuey 49.23 ± 1.01 kg y Blackbelly 44.43 ± 1.05 kg.

Consumo de Alimento (CONS)

Las medias de cuadrados mínimos para el CONS se muestran en el (Cuadro 35). No se encontró diferencia ($P > 0.05$) en los efectos dieta, sexo y su interacción. El comportamiento del CONS mantuvo una tendencia lineal ($P < 0.01$) a lo largo del experimento (56 d). Se observó, tanto en los ovinos alimentados con manzanarina como en los alimentados sin manzanarina, un CONS promedio inicial a los 14 días de iniciada la prueba de 1.317 kg, incrementándose hasta 1.467 kg a los 56 días de la prueba.

CUADRO 35. MEDIAS DE LOS CUADRADOS MÍNIMOS (\pm EE) DEL COMPORTAMIENTO PRODUCTIVO DE OVINOS ALIMENTADOS CON Y SIN MANZARINA

Variable	Nivel de Manzarina			
	Con (10.91%) de manzarina		Sin manzarina	
	Machos	Hembras	Machos	Hembras
Peso Final (kg)	44.6 \pm 0.7 ^a	38.9 \pm 0.7 ^b	41.9 \pm 0.7 ^c	41.5 \pm 0.7 ^c
GP (kg)	4.7 \pm 0.3 ^a	3.5 \pm 0.3 ^b	4.3 \pm 0.2 ^c	4.1 \pm 0.2 ^c
GDP (kg)	0.339 \pm 0.02 ^a	0.246 \pm 0.02 ^b	0.309 \pm 0.02 ^c	0.290 \pm 0.02 ^d
CONS (kg)	1.469 \pm 0.05	1.375 \pm 0.05	1.369 \pm 0.05	1.377 \pm 0.05
CA (kg alim*kg peso ⁻¹)	4.46 \pm 0.29	5.70 \pm 0.30	4.49 \pm 0.28	5.03 \pm 0.27

^{a, b, c, d} Literales distintas como superíndice indican diferencia ($P < 0.05$) entre columnas

GP= Ganancia de peso por periodo

GDP= Ganancia diaria de peso

CONS= Consumo de alimento

CA= Conversión alimenticia

El CONS fue superior para lo que fue formulada la dieta según la NRC (1985) para ovinos en crecimiento, la cual recomienda 1.200 kg por día. Los datos muestran un incremento en el CONS de 2.68 g d⁻¹ por animal. La covariable peso inicial tuvo un efecto importante ($P<0.05$) sobre el CONS.

Ganancia Diaria de Peso (GDP)

Las medias de cuadrados mínimos para GDP se muestran en el (Cuadro 35). Para esta variable se encontró efecto ($P<0.05$) en la interacción dieta*sexo. Los machos que recibieron manzarina en la dieta tuvieron mayor GDP ($P<0.01$), con valores de 0.339 kg contra 0.309 kg para los alimentados con la dieta testigo. Mientras tanto, las hembras alimentadas sin manzarina tuvieron mayor GDP (0.290 kg) que las alimentadas con manzarina (0.246 kg). Esto es debido tal vez a que los machos tienen una mayor capacidad de consumo que las hembras por su mayor tamaño corporal. Estos datos difieren a los presentados por Silva (2006) quien reportó que en ovinos alimentados con raciones a base de ensilaje de maíz, maíz molido, pasta de soya, harinolina y premezcla mineral no hubo diferencia ($P>0.05$) en la ganancia diaria de peso (Pelibuey 232 g d⁻¹, Blackbelly 188 g d⁻¹, Katahdin 247 g d⁻¹, Dorper 236 g d⁻¹). McClure *et al.*, (1994) demostraron que la GDP en corderos alimentados con ryegrass ganó en promedio 140 g d⁻¹ comparados con los alimentados con concentrado y que ganaron en promedio 230 g d⁻¹. Rodríguez *et al.*, (2006 c) reportaron en su investigación que los corderos Suffolk tuvieron una GDP de 293±20 g y en Chorollais 274±20 g.

Conversión Alimenticia (CA)

Las medias de cuadrados mínimos para CA se muestran en el (Cuadro 35). Esta variable se vio afectada ($P<0.05$) únicamente por el efecto de sexo. La covariable peso inicial tuvo un efecto importante ($P<0.05$) sobre la CA. Donde los machos tuvieron una CA más alta que las hembras (5.4±0.21 y 4.5±0.21, respectivamente), debido a que los machos son más eficientes que las hembras. De la Cruz *et al.*, (2006) encontraron diferencias ($P\leq 0.05$) entre razas para CA, en donde los corderos Suffolk

tuvieron mayor CA (5.8 ± 0.2) con respecto a Hampshire (3.9 ± 0.01) y Dorset (4.6 ± 0.01), los cuales tuvieron una conversión similar ($P>0.05$). Sin embargo, Rodríguez *et al.*, (2006 c) en su investigación reportaron una CA de 4.31 ± 0.41 en corderos Charollais y 3.29 ± 0.40 en corderos Suffolk.

Rendimiento de la Canal (REND)

El REND mostró tendencia ($P<0.06$) en la interacción ocurrida entre dieta y sexo. Así, en el Cuadro 5 se muestra como los machos que consumieron manzanina mostraron un REND de $48.00\pm 1.25\%$, mientras que los que consumieron la dieta sin manzanina mostraron un $50.23\pm 1.14\%$. En tanto, las hembras con manzanina tuvieron un REND de $51.52\pm 1.23\%$ y las hembras sin manzanina mostraron un $48.96\pm 1.15\%$. Silva (2006) en su investigación con ovinos reportó porcentajes similares de REND para Dorper ($50.73\pm 0.77\%$) y Katahdin ($48.65\pm 0.77\%$). Rodríguez *et al.*, (2006c) mencionaron que corderos Charollais obtuvieron un REND de $58.17\pm 0.81\%$, mientras que en corderos Suffolk hubo $56.48\pm 0.78\%$. Esto es debido probablemente a que el rendimiento en las hembras está asociado a una mayor presencia de tejido adiposo a que los machos.

Área del Ojo de la Costilla (AOC)

Las medias de los cuadrados mínimos para la variable AOC se presentan en el (Cuadro 36). Se encontró que existe un efecto similar ($P>0.05$) tanto para machos y hembras alimentados con y sin manzanina, respectivamente. En esta investigación se presentaron valores similares, sin embargo, Rodríguez *et al.*, (2006 c) quienes hicieron comparaciones entre razas de ovinos, los cuales reportaron datos de AOC en Charollais de 29.25 ± 1.20 cm² y 29.51 ± 1.09 cm² para Suffolk. Mientras que, De la Cruz *et al.*, (2006) no encontraron diferencia ($P>0.05$) entre razas, quedando para corderos Hampshire 28.1 ± 0.6 , Dorset 25.4 ± 0.6 y para corderos Suffolk 27.6 ± 1.1 , respectivamente.

CUADRO 36. MEDIAS DE LOS CUADRADOS MÍNIMOS ± ERROR ESTÁNDAR DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LA CANAL DE OVINOS ALIMENTADOS CON Y SIN MANZARINA

Variable	Tratamientos					
	Dieta con Manzarina		Dieta sin manzana			
	Machos	Hembras	Media de Tratamiento	Machos	Hembras	Media de Tratamiento
Número de animales (n)	6	6	12	6	6	12
Peso Sacrificio (kg)	44.7±0.1 ^a	40.4±0.1 ^b	42.57±0.6	42.9±0.1 ^a	41.6±0.1 ^b	42.3±0.6
Rendimiento (%)	49±1.25 ^a	51.5±1.23 ^b	49.7±0.78	50.2±1.13 ^a	48.9±1.15 ^b	49.6±0.8
AOC (cm ²)	30.7±2.0	30.3±2.0	30.5±1.0	33±2.0	33.6±2.0	33.3±1
EGD (mm) *	3.3±1.1	4.7±1.1	4.0±0.7	1.7±1.0	4.4±1.0	3.0±0.7

^{a, b} Literales distintas como superíndice indican diferencia (P<0.05) entre columnas

* Para EGD, se encontró tendencia con un valor P<0.06

Espesor de Grasa Dorsal (EGD)

Las medias de los cuadrados mínimos para la variable EGD se presentan en el (Cuadro 36). La medición de EGD fue alta ($P < 0.06$), teniendo las hembras (4.5 ± 0.81 mm) comparado con los machos (2.5 ± 0.81 mm). Las pautas en el desarrollo de tejidos se encuentran mayormente diferenciadas en el depósito del tejido adiposo, siendo las hembras más precoces que los machos (Ruiz *et al.*, 2000), y por ende las hembras alcanzan más rápidamente la conformación corporal que los machos. Estos resultados son menores a los presentados por De la Cruz *et al.*, (2006) quienes reportaron que no hubo diferencia ($P > 0.05$) en EGD para corderos machos Hampshire y Dorset (5.0 ± 0.3 y 5.2 ± 0.3 mm), pero si encontraron diferencia ($P < 0.05$) con respecto a corderos Suffolk (8.3 ± 0.5 mm). Esta diferencia es debida probablemente a que las razas de lana son más pesadas que las de pelo.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En dietas similares a las que se evaluaron, la pasta de soya puede ser sustituida como ingrediente por la manzarina en el porcentaje utilizado en este trabajo, ya que la adición de esta a la dieta no muestra diferencias en la cinética de degradabilidad de la materia seca ni en la producción de amoníaco *in vitro*.

La inclusión de manzarina en la dieta mantuvo un comportamiento distinto para peso final en su interacción dieta*sexo, ya que en la dieta con manzarina los machos fueron 2.7 kg más pesados que los machos de la dieta sin manzarina, mientras que las hembras sin manzarina fueron 2.6 kg más pesadas que las hembras con manzarina.

La GDP fue diferente debido a la interacción dieta*sexo, ya que en la dieta con manzarina los machos tuvieron 30 g más de ganancia que los machos de la dieta sin manzarina, mientras que las hembras sin manzarina ganaron 56 g más que las hembras sin manzarina.

La conversión alimenticia se vio afectada por el efecto del sexo, en donde los machos fueron más eficientes que las hembras. En espesor de grasa dorsal las hembras fueron superiores a los machos. El rendimiento de la canal se vio favorecido tanto en hembras como en machos que no se alimentaron con manzarina.

Es factible la utilización de un 10.91% (BS) de manzarina en la dieta y es una buena alternativa para la alimentación de ovinos en engorda, bajo las condiciones dadas en este experimento. Recomendamos el uso de manzarina en dietas en ovinos debido al bajo costo por kilogramo de alimento.

CAPITULO 9. DINÁMICA DE LA FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO DE
SUBPRODUCTOS DE MANZARINA PARA LA OBTENCIÓN DE MANZARINA

Héctor Esteban Rodríguez Ramírez

RESUMEN

La manzarina (Mzn) se obtiene de la Fermentación en Estado Sólido (FES) de manzana (MD) y del bagazo de manzana (BM), estos tienen diferente contenido de carbohidratos, lo cual genera variación en la Mzn. Para evaluar esa variación y la dinámica de FES, se prepararon cuatro tratamientos (t1:100.0% BM, n=6; t2:66.4% BM+33.4% MD, n=6; t3:33.4% BM+66.6% MD, n=6 y t4:100.0% MD, n=5). Durante la FES, se midió temperatura (T), pérdida de humedad (- Δ H), pH, levaduras (CL), amoníaco (NH₃), ácido láctico (AcL), materia seca (MS), cenizas (Cen), proteína cruda (PC), proteína verdadera (PV), proporción de PV/PC y polifenoles totales (PoT). En la manzarina obtenida, se midió fibra cruda (FC), extracto etéreo (EE), energía metabolizable (EM), degradabilidad (Deg), producción de gas (PG) *in vitro* y los parámetros de fermentación *in vitro*. El análisis estadístico de la dinámica de la FES, se realizó con un modelo mixto (MIXED del SAS 9.0) en el cual se usó como efecto fijo el tratamiento, el día de FES como covariable para análisis de tendencias y como efecto aleatorio, la repetición anidada en tratamiento. Para comparar FC, EE, EM y Deg, se usó un modelo completamente aleatorio (GLM del SAS 9.0). Los perfiles de PG se compararon con un modelo multivariado (GLM del SAS 9.0, instrucción MANOVA). En todos los sustratos, el incremento ($P < 0.01$; efecto cuadrático) del pH coincidió con un aumento ($P < 0.05$; efecto cúbico) de NH₃ y con la disminución ($P < 0.01$; efecto cúbico) del AcL. El pH se incrementó ($P < 0.01$) de 3.9 ± 0.2 (d2) a 5.6 ± 0.2 (d5) en t1, en t2 de 3.0 ± 0.2 (d3) a 4.0 ± 0.8 (d5), en t3 de 3.8 ± 0.9 (d3) a 5.4 ± 0.8 (d5) y en t4 de 4.7 ± 0.6 (d3) a 8.1 ± 0.8 (d5). Del d0 al d5, el NH₃ (mg*g⁻¹), se incrementó ($P < 0.05$) de 0.09 ± 0.03 a 0.62 ± 0.03 en t1, de 0.05 ± 0.03 a 0.59 ± 0.05 en t2, de 0.07 ± 0.03 a 0.61 ± 0.05 en t3 y de 0.05 ± 0.03 a 0.58 ± 0.05 en t4. Del d0 al d3, el AcL (mg*g⁻¹) disminuyó ($P < 0.01$) de 2.96 ± 0.37 a 0.85 ± 0.21 en t1, de 3.32 ± 0.34 a 1.21 ± 0.55 en t2, de 2.20 ± 0.31 a 0.09 ± 0.54 en t3 y de 2.27 ± 0.34 a 0.17 ± 0.55 en t4. La CL (cel*g⁻¹ MS) más alta ($P < 0.04$), se observó el d3 de la FES, las cantidades fueron, 4.4×10^8 en t1, 3.5×10^8 en t2, 4.7×10^8 en t3 y

1.0×10^8 en t4. La PV (% de la MS) se incrementó ($P < 0.01$) del d0 al d2 para después permanecer estable, tuvo un comportamiento cuártico con diferencias ($P < 0.01$) entre tratamientos, al d2 t1 alcanza hasta un 16.6 ± 1.5 , t2 un 16.9 ± 2.6 , t3 un 17.0 ± 2.6 y t4 un 13.2 ± 2.7 . La proporción de PV/PC de t4 fue la menor ($P < 0.01$). La concentración de PoT ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ de MS) fue menor ($P < 0.01$) en t4, su concentración en la manzarina (d6) fue de 8.0 ± 1.4 en t1, 8.4 ± 2.1 en t2, 9.4 ± 2.1 en t3 y 1.7 ± 2.1 en t4. La manzarina obtenida a partir de BM como principal componente del sustrato produce una mayor ($P < 0.05$) cantidad de gas *in vitro*. Se concluye el BM es mejor como sustrato para obtener Mzn.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tratamientos

Se prepararon cuatro tratamientos (t) para evaluar la fermentación en estado sólido de bagazo de manzana (BM), manzana de desecho molida (MD) y sus combinaciones en 23 recipientes de plástico de ~1.2 L de capacidad. En cada uno se depositaron ~500 g de BM, MD o sus combinaciones, cada uno se consideró una repetición.

El tratamiento uno (t1) consistió en la FES de 6 repeticiones de BM; en el t2 se fermentaron 6 repeticiones de una combinación de BM más MD en una proporción de 2:1 en base húmeda; en el t3 se fermentaron 6 repeticiones de la combinación de BM más MD en una proporción de 1:2 y en el t4 se fermentaron 5 repeticiones de MD; el diseño de tratamientos se muestra en el (Cuadro 37), como referencia se incluyen en el (Cuadro 38) valores de la composición del BM y de la MD; el BM fue obtenido 6 d antes de iniciar el procedimiento, se conservó en un congelador a -4 °C hasta un día antes de usarse, la MD fue obtenida con dos días de anticipación y se molió un día antes.

Condiciones de Fermentación

La fermentación se llevó a cabo en una incubadora a una temperatura de 32°C, a los sustratos (BM, MD o sus combinaciones) se les agregó urea, minerales y sulfato de amonio en una proporción de 1.5, 0.5 y 0.4% con base en el peso húmedo del sustrato, esto se realizó tomando como base datos de trabajos previos similares (Becerra, 2006; Díaz, 2006). El sustrato con nutrientes, se mezcló cada 4 h desde el inicio (d0) hasta el sexto día (d5) de fermentación, se dio término al proceso de FES aumentando la temperatura de la incubadora a 60 °C para deshidratar el producto y conservarlo; el material sólido fermentado obtenido el d6 (después de deshidratarlo a 60 °C), se consideró el producto terminado (Manzarina).

CUADRO 37. DISEÑO DE TRATAMIENTOS

Tratamiento	Sustratos		Repeticiones
	BM (%)	MD (%)	
t1	100.0	0.0	6
t2*	66.6	33.4	6
t3*	33.4	66.6	6
t4	0.0	100.0	5

*Combinación de BM y MD

CUADRO 38. ALGUNOS NUTRIENTES DEL BAGAZO DE MANZANA (BM) Y DE LA MANZANA (M)* Y SU pH

**	Variable								
	MS ¹	pH	PC ²	FC ³	EE ⁴	Cen ²	E ⁵	CHO ⁶	Az ⁷
BM ^a	9.7	4.0	6.2	28.7	---	2.2	(2.65)	---	
BM ^b	---	4.2	6.0	15.3	4.1	1.9	2.95	---	50.0
M ^c	14.9	---	2.0	---	2.0	2.0	4.03	93.9	---
M ^d	14.4	---	1.8	(16.6)	1.2	1.3	3.60	95.6	71.9

* Fuentes: ^a Anrique y Viveros (2002), ^b Joshi y Sandhu (1996), ^c FAO/LATINFOODS (2002) y ^d USDA (2007); algunos datos fueron adaptados

** Producto

¹ Porcentaje

² Porcentaje de la MS

³ Fibra cruda, el valor entre paréntesis es fibra total

⁴ Extracto etéreo o grasa cruda, porcentaje en BS

⁵ Concentración total de energía en Mcal kg⁻¹, el valor entre paréntesis es Energía Metabolizable

⁶ Total de carbohidratos en porcentaje de la MS

⁷ Azúcares totales, porcentaje en BS

Del d0 al d5, diariamente se tomó una muestra del contenido de cada recipiente y se depositó en bolsas de plástico, dichas muestras fueron congeladas a -4°C para detener el proceso fermentativo y conservarlas.

Variables Medidas

Los análisis realizados se clasificaron en mediciones directas, mediciones en muestras líquidas y mediciones en muestras deshidratadas. Las mediciones directas fueron: temperatura (T) y pérdida de humedad ($-\Delta\text{H}$); las mediciones en muestras líquidas fueron: pH, conteo de células de levaduras (CL), nitrógeno amoniacal (NH_3) y ácido láctico (Acl); las mediciones en muestras deshidratadas fueron: materia seca (MS), proteína cruda (PC), proteína verdadera (PV), proporción de PV (PV/PC), polifenoles totales (PoT), fibra cruda (FC), extracto etéreo (EE), concentración de energía metabolizable (EM), degradabilidad *in vitro* (Deg), producción de gas *in vitro* (PG) y los parámetros de fermentación *in vitro* (A, B, C); esto último se realizó para evaluar el valor nutricional del producto terminado como alimento para rumiantes con la técnica de PG de Menke y Steingass (1988).

Mediciones Directas

Temperatura (T). Esta variable se midió Diariamente, en cada repetición del d0 al d3 del proceso de fermentación, con un termómetro de mercurio.

Pérdida de humedad en porcentaje ($-\Delta\text{H}$). Se calculó del d0 al d6 de la FES. Para esto, diariamente se registró el peso de cada recipiente con sustrato, antes y después de la toma de muestras. Con estos datos y el peso de los recipientes sin sustrato, se calculó el peso del sustrato y su pérdida de peso diaria; aunque esta pérdida de peso no se debe solo a la vaporización de agua del sustrato, sino que incluye la volatilización de productos solubles y gases producidos por la FES, en general, todo esto se considero como pérdida de humedad; la $-\Delta\text{H}$ en los d1, d2, d3, d4 y d5 se calculó dividiendo el peso del sustrato en gramos en cada día de muestreo entre el peso inicial del sustrato.

Mediciones en Muestras Líquidas

Del d0 al d5 se tomó diariamente una muestra de cada repetición, se congeló a $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ para detener el proceso de fermentación y posteriormente, se descongelaron a temperatura de refrigeración ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) para determinar pH, CL, NH_3 y AcL como se describe a continuación.

pH. Se midió en las muestras del d0 al d5. En vasos de plástico con tapa, se depositaron 10 g de muestra descongelada más 90 ml de agua destilada (H_2O), se obtuvo una solución con una relación p/v de 1:9; esta se agitó mecánicamente por 30 minutos; posteriormente se filtró con una gasa y el líquido obtenido se consideró como la muestra líquida; en esta se determinó el pH midiéndolo con un potenciómetro portátil de una precisión de ± 0.1 unidades, se tomo como base la metodología descrita por Rodríguez *et al.*, (2001a).

Conteo de levaduras (CL). Para este análisis se tomó como base, la metodología descrita por Díaz (2006). La cantidad de levaduras se determinó en las muestras del d0, d1, d2, d4 y d5 únicamente. Para esto, se preparó una solución con 2 g de muestra más 18 ml de solución de NaCl al 0.9% (solución salina inyectable), se agitó por 30 minutos y después se filtró con una gasa estéril, el filtrado se consideró como la muestra líquida para CL; en cada muestra, se agregaron de dos a tres gotas de solución de formalina al 10% para preservarla en refrigeración para su posterior conteo.

El CL se realizó por microscopía; con una pipeta de volumen variable con un rango de 100 a 1000 μl y puntas desechables se tomó 1 ml de muestra líquida y se preparó una dilución serial utilizando solución salina como diluyente; con una pipeta de volumen variable con un rango de 0.5 a 10 μl y puntas desechables se tomaron 10 μl de la dilución -3 o -4 de cada muestra, y se colocaron en un hematocímetro (cámara de Neubauer) para el conteo.

La cámara de Neubauer se lavó con alcohol etílico desnaturalizado después de cada CL. La cantidad de células identificadas como levaduras, de manera individual o en gemación se contaron en las cuatro esquinas del hematocímetro (4 cuadrantes de 1 mm² cada uno). Se calculó el promedio de células de levaduras (cel) por cuadrante y se calculó la cantidad de células por mililitro (cel*ml⁻¹). los datos se reportaron en cantidad levaduras por gramo de muestra (cel*g⁻¹) de muestra, para su análisis estadístico, los datos se convirtieron a logaritmo base 10 (Log₁₀ cel*g⁻¹ MS).

Nitrógeno amoniacal (NH₃). Para este análisis se utilizó parte de la muestra líquida en la que se determinó el pH, el análisis se realizó diariamente del d0 al d5 de FES, para esto se tomaron 20 ml de muestra líquida, se les agregaron dos gotas de cloruro de mercurio y se congelaron para su conservación (-5°C) hasta el momento del análisis.

Las muestras líquidas de 20 ml, se descongelaron a temperatura de refrigeración, de cada una se tomaron 10 ml, se les agregó 10 ml de tetraborato de sodio al 5% (Borax al 5%) y la solución resultante se destiló (Rapidstill II de Labconco®) hasta coleccionar 40 ml en un vaso de precipitado, el cual contenía 10 ml de ácido bórico al 2% más tres gotas de solución indicadora para titular; el contenido de cada vaso de precipitado se tituló con H₂SO₄ (~0.05 N).

La cantidad en ml de H₂SO₄ 0.05 N utilizada para titular, es equivalente a la cantidad en mg de NH₃ por cada 100 ml de muestra líquida (Preston, 1986); los resultados se ajustaron a 0.05 N (normalidad del H₂SO₄); los resultados se utilizaron para calcular la cantidad de miligramos de nitrógeno amoniacal (mg) de NH₃ por gramo de muestra en base húmeda (BH; mg NH₃*g⁻¹) cada muestra líquida se analizó por duplicado.

Ácido láctico (AcL). De las muestras líquidas obtenidas del d0 al d5 para determinar pH, se tomaron 30 ml de la solución, se colocaron en recipientes de plástico, se agregaron tres gotas de ácido ortofosfórico y se congelaron (-5°C) para su conservación hasta el momento de la determinación de

A_{CL}. Al momento de la determinación, las muestras se descongelaron a temperatura de refrigeración, se centrifugaron a 1,500 g por 15 minutos y permanecieron en refrigeración (no más de 48 h) mientras se procedió con el análisis.

La concentración de A_{CL} de las muestras líquidas se determinó por colorimetría según el procedimiento de Taylor (1996), en un espectrofotómetro Coleman Junior® II modelo 6|20. Las muestras se diluyeron con agua destilada, a una concentración de entre 3 y 7.5% de muestra líquida en agua. Como estándar se utilizaron soluciones con una concentración de 5, 10, 15, 20 y 25 µg de A_{CL}*ml⁻¹ y agua destilada como blanco (0 µg de A_{CL}*ml⁻¹). El análisis se realizó por triplicado, para esto se agregaron 3 ml de H₂SO₄ concentrado y 0.5 ml de la muestra diluida, del estándar o del blanco, las soluciones obtenidas se mezclaron en vórtice (Vortex Genie II) y se incubaron por 10 minutos en baño de agua caliente (temperatura de 95~100°C).

Posteriormente, se agregaron 100 µl de solución de CuSO₄ al 4% y 200 µl de solución de 1.5% de p-fenilfenol en etanol al 95% en cada celda; las soluciones obtenidas se mezclaron en vórtice nuevamente y se dejaron reposar por al menos 30 minutos a temperatura ambiente (no menos de 20°C). La absorbancia del contenido de cada celda se midió a una longitud de onda de 570 nm. Este procedimiento se describe brevemente por Madrid *et al.*, (1999), ellos utilizaron 6 ml de solución de H₂SO₄ concentrado y 1 ml de muestra líquida para el análisis, en este trabajo se modificó a 3 ml de H₂SO₄ y 0.5 ml de muestra debido al tamaño de las celdas del espectrofotómetro. La concentración de A_{CL} se calculó en miligramos por gramo de muestra (mg*g⁻¹) en base húmeda (BH).

Mediciones en las Muestras Deshidratadas

Las muestras de sustrato tomadas del d0 al d5 conservadas en congelación, fueron descongeladas a temperatura de refrigeración, después de haber utilizado una parte de estas para obtener las muestras líquidas, se tomó el resto de cada muestra, se registró su peso y se deshidrataron

a 60°C por 48 h, de este modo se calculó su contenido de humedad y posteriormente, con estos datos se calculó la proporción de MS de las muestras durante el proceso de FES.

La excepción a lo anterior fue que, en el d5 se dio término al proceso de fermentación aumentando la temperatura de la incubadora a 60°C para deshidratar el contenido restante de sustrato de cada recipiente (repetición) y detener completamente la FES, después de 48 h a esta temperatura, el residuo deshidratado se conservó en bolsas de plástico y se consideró el producto terminado (muestras del d6 de FES), su porcentaje de humedad se calculó restando el peso del sustrato fermentado y deshidratado en el d6 del peso del sustrato después de la toma de muestra del d5. Las muestras deshidratadas del d0, d1, d2, d3, d4, d5 y d6 se molieron (malla de 1 mm, molino Wiley) y se utilizaron para las determinaciones que se mencionan a continuación.

Materia seca (MS) y cenizas (Cen). Se determinó la MS residual y el contenido de Cen (en porcentaje de la MS) en las muestras deshidratadas de los d0, d1, d2, d4 y d6, utilizando los procedimientos de la AOAC, (2000) el porcentaje de muestra libre de humedad se multiplicó por el porcentaje de MS de la muestra deshidratada para calcular el porcentaje de MS total.

Proteína cruda (PC). Se determinó únicamente en las muestras de los d0, d1, d2, d4 y d6 del proceso de fermentación, el análisis se hizo con el procedimiento Kjeldahl (AOAC, 2000) el resultado se expresó en porcentaje de PC en BS.

Proteína verdadera (PV). Se determinó únicamente en las muestras de los d0, d1, d2, d4 y d6 de fermentación; para esto entre 0.1 y 0.2 g de cada muestra (envueltos en papel filtro), se lavó en 25 ml de agua destilada calentando hasta ebullición, en ese momento se agregaron 12.5 ml de solución de CuSO_4 al 6% más 12.5 ml de solución de NaOH al 1.25% y 0.5 ml de HCl concentrado; la solución con la muestra se calentó nuevamente hasta ebullición, se agitó de dos a tres veces durante el proceso y posteriormente se lavó con agua destilada de dos a tres veces hasta eliminar los residuos de las

soluciones. Este procedimiento elimina el NNP de las muestras (Berstein, 1970, citado por Meir, 1986). Después de lo anterior, las muestras (envueltas en papel filtro) se secaron a temperatura ambiente por 24 h para posteriormente determinarles el contenido de nitrógeno por el procedimiento Kjeldahl.

Proporción de PV (PV/PC). Con los resultados de PV y PC de cada muestra, se calculó la fracción en porcentaje de PV en función a la cantidad de PC de la muestra, este valor es representativo de la eficacia de las poblaciones de microorganismos para transformar el NNP disponible en PV (Rodríguez *et al.*, 2001b), dando a la vez un parámetro más para evaluar la calidad nutritiva de la manzanina.

Polifenoles totales (PoT). Para obtener un extracto con los PoT de las muestras deshidratadas de los d0, d1, d2, d4 y d6, se tomaron entre 0.10 y 0.20 g de cada muestra, se registró su peso, se depositaron en tubos de ensayo de 50 ml y se les agregó 10 ml de acetona al 70%; la solución se agitó (~120 rpm) por 2 h a una temperatura de 38°C; después se filtró con dos capas de gasa para separar los sólidos; la parte líquida obtenida es el extracto con PoT. Este último se filtró con membranas Pall® con poros de 0.45 µm, con apoyo de una bomba de vacío.

La concentración de PoT en el extracto filtrado, se midió por colorimetría (Idania Scull Rodríguez, comunicación personal). En celdas para espectrofotómetro se depositaron de 0.1 a 0.2 ml del extracto y se agregó agua destilada hasta completar 1 ml, posteriormente se agregaron 2 ml de solución de Na₂CO₃ al 20% y 0.5 ml de solución Folin-Ciocalteu al 50%. Se preparó un blanco con 1 ml de agua; las muestras y el blanco con las soluciones, se mezclaron en vórtice (Vortex Genie II) y se dejaron reposar por 40 minutos. Pasado este tiempo la absorbancia de las soluciones se midió en un espectrofotómetro Coleman Junior® II 6J20, a una longitud de onda de 520 nm, ajustando previamente a 0 con el blanco.

Como estándar, se utilizó una solución de ácido tánico ($0.5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$), se prepararon alicuotas con 0 (blanco), 20, 30, 40, 50 y 60 μl de la solución estándar, mas agua destilada hasta completar 1 ml. El análisis se hizo por triplicado. Los resultados de la concentración de PoT de las muestras se expresaron en miligramos por gramo de MS ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ MS).

Fibra cruda (FC) y extracto etéreo (EE). Estos análisis solo se realizaron en las muestras del d6. La FC se determinó con un equipo Fibertec System M 1020 de Tecator® y el EE en un equipo Soxhlet, con base en lo descrito por la AOAC, (2000) los resultados se expresaron en porcentaje de la MS.

Producción de Gas (PG) *in vitro*

Esta variable solo se determinó en las muestras del d6 de FES. Para esto, se utilizó la técnica de PG *in vitro* de Menke y Steingass (1988). El líquido ruminal para la incubación se obtuvo no más de una hora antes de iniciar con el procedimiento de tres borregos canulados ruminalmente cuya dieta era de 60% de alfalfa más 40% de concentrado. El líquido se extrajo antes de que los animales fueran alimentados durante la mañana.

La incubación se llevó a cabo en frascos de vidrio de 50 ml; dentro de estos se colocaron 0.2 g de muestra, 10 ml de líquido ruminal y 20 ml de saliva artificial a una temperatura controlada de 39°C con agitación constante (68 rpm), durante 48 h. La presión interna de los frascos (ejercida por la PG debido a la fermentación) se midió con un transductor de presión a las 2, 4, 6, 8, 12, 16, 24, 36 y 48 h de incubación y los valores de presión observados se convirtieron a volumen de producción de gas (PG en ml) según Theodorou *et al.*, (1994) citados por Rivera (2005). Los resultados se expresaron en mililitros de PG por cada 0.2 gramos de muestra en base seca ($\text{ml de PG} \cdot 0.2 \text{ g}^{-1}$ MS). A las 48 h, los frascos se congelaron (-4°C) para detener la fermentación y posteriormente determinar la degradabilidad *in vitro*.

Energía Metabolizable (EM)

Este valor se calculó con la ecuación de Menke y Steingass (1988), la cual se utiliza para evaluar el aporte energético de forrajes (Getachew *et al.*, 2002), los resultados se obtienen en megajoules por kilogramo de MS ($\text{MJ}\cdot\text{kg}^{-1}$ MS), en este caso, los resultados se convirtieron a megacalorías ($\text{Mcal}\cdot\text{kg}^{-1}$ MS). La ecuación se describe a continuación:

$$\text{EM} = 2.20 + 0.136 (\text{G24h}) + 0.057 (\text{PC}) + 0.0029 (\text{EE})^2$$

Donde:

EM.- es la energía metabolizable en $\text{MJ}\cdot\text{kg}^{-1}$ MS

G24h.- es la PG a las 24 h de iniciado el procedimiento ($\text{ml}\cdot 0.2 \text{ g}^{-1}$ MS)

PC.- es el porcentaje de proteína cruda de la muestra en BS

EE.- es el porcentaje de grasa cruda de la muestra en BS

Degradabilidad Ruminal *in vitro* (Deg)

El contenido de los frascos después de la PG, se descongeló y por filtración (papel filtro Whatman cualitativo), se separó la fracción no degradada (FND) en el proceso; posteriormente se calculó su peso en gramos; para esto, cada papel fue identificado, se obtuvo su peso constante a 60°C por 24 h y después de filtrar, ya con la FND de cada muestra, se secó nuevamente a 60°C por 24 h; por diferencia, con el peso constante del papel antes y después de filtrar el contenido de los frascos, se calculó la cantidad de la FND en gramos.

Con el promedio de la FND de los blancos, se obtuvo la cantidad de la FND aportada por el líquido ruminal, esta se restó de la cantidad de FND de las muestras para corregir la cantidad aportada por el líquido. Con el resultado de la FND corregida por el blanco y la cantidad de muestra al inicio de la PG, se calculó el porcentaje de MS degradable *in vitro*.

Parámetros de Fermentación Ruminal *in vitro* (Parámetros A, B, C)

Con las cantidades de PG acumulada *in vitro* y el modelo matemático de Groot *et al.*, (1996), se obtuvieron los parámetros de fermentación *in vitro* A, B y C; los cálculos se hicieron con el procedimiento NLIN del SAS 9.0 (SAS, 2002). Se utilizó la curva monofásica del modelo debido al número de observaciones con las que se obtuvo el perfil de PG. El modelo es el siguiente:

$$G = A / (1 + (B / t) C)$$

Donde:

- G.- es la PG en un tiempo dado
- A.- es la asíntota de PG (ml)
- B.- es el tiempo (h) en el se produce la mitad de la asíntota de PG
- C.- es una constante que determina la forma de la curva formada por el perfil de PG
- t.- Es el tiempo en h

Análisis Estadístico

Se utilizaron tres modelos estadísticos. Con el primer modelo, se analizaron las variables de respuesta T, $-\Delta H$, pH, CL, NH_3 , AcL, MS, Cen, PC, PV, PV/PC y PoT, esto permitió evaluar la dinámica de FES de los diferentes sustratos (tratamientos), indicando cual fue el comportamiento de esos compuestos y/o componentes durante el proceso.

Con el segundo modelo, se analizaron las variables de respuesta FC, EE, EM y Deg, para evaluar las características de la manzarina como producto terminado. Con el tercer modelo, se compararon los perfiles de PG observados en un periodo de 48 h, en la fermentación ruminal *in vitro* de los diferentes tipos de manzarina, solo se evaluaron muestras del d6 de cada tratamiento debido a la cantidad de muestra disponible para la evaluación.

Primer modelo. Este análisis, se realizó con un modelo mixto, en el cual se utilizó como efecto fijo el tipo de sustrato (tratamiento) para llevar a cabo la FES, el día de FES se usó como un efecto de covariable para realizar un análisis de tendencia (cuadrática, cúbica o cuártica) de las variables, así también se incluyeron como efectos, las interacciones del día de fermentación (efecto cuadrático, cúbico y cuártico) con el efecto de tratamiento. El efecto aleatorio, fue la repetición anidada en tratamiento. Cuando los efectos del análisis de tendencia cúbica o cuártica no fueron significativos, se eliminaron del modelo. Los resultados se obtuvieron con el procedimiento MIXED del SAS 9.0 (SAS, 2002).

Segundo modelo. El segundo análisis, se realizó con un modelo completamente aleatorizado, en el cual se utilizó como único efecto el tipo de manzarina (tratamiento) obtenida después del proceso de fermentación; los resultados del análisis de varianza, medias, error estándar y comparaciones entre medias, se obtuvieron con el procedimiento GLM del SAS 9.0 (SAS, 2002).

Tercer modelo. Los perfiles de PG de las muestras de manzarina, se compararon con un método multivariado para el análisis de medidas repetidas en el tiempo. El análisis se realizó con el procedimiento GLM del SAS 9.0, usando la instrucción MANOVA (Khattree y Naik, 1999); el único efecto evaluado fue el tratamiento (tipo de manzarina), se realizaron contrastes para evaluar si los perfiles por tratamiento fueron paralelos. La medida repetida en el tiempo fue la PG acumulada a las 2, 4, 6, 8, 12, 16, 24, 36 y 48 h.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Temperatura (T). Los organismos que consumen oxígeno, producen calor debido a su actividad metabólica, por esta razón esta variable es un indicador de actividad metabólica y es importante en la FES ya que indica si existe o no ese tipo de actividad biológica. Esta variable tuvo un comportamiento cúbico ($P < 0.01$), el efecto de la interacción del tratamiento por el efecto cúbico del transcurso de la FES (día) fue significativo ($P < 0.01$).

La temperatura se incrementó ($P < 0.01$) del d0 al d1 en todos los tratamientos, posteriormente disminuyó ($P < 0.01$) para mantenerse cerca de la temperatura de la incubadora a partir del segundo día de FES. Los valores estimados de las medias en el d1 de FES fueron $35.2 \pm 0.3^\circ\text{C}$ en t1, $39.2 \pm 0.5^\circ\text{C}$ en t2, $38.2 \pm 0.5^\circ\text{C}$ en t3 y $39.9 \pm 0.5^\circ\text{C}$ en t4. Las T más altas se observaron en el d1 de FES. El calor acumulado en sustratos fermentados es resultado de la actividad metabólica de los microorganismos; la T, también puede ser afectada por la conductividad del material biológico fermentado (Ibarra *et al.*, 2002).

En el proceso de obtención de la Saccharina (similar al de manzarina), la T interna tiende a mantenerse constante a pesar de los cambios de T ambiental; aún así, esta puede influenciar ligeramente la T del sustrato (Ruíz *et al.*, 2002). Según los datos estimados, en todos los tratamientos, la T en el d1 fue mayor que la T de la incubadora (32°C), indicando actividad biológica como lo mencionan Ibarra *et al.*, (2002). A partir del d2, todos los tratamientos mostraron una T ligeramente menor a la T de la incubadora, indicando disminución en la actividad microbiológica.

Pérdida de humedad en porcentaje (- ΔH). Esta variable, medida a través de la pérdida de peso, refleja la pérdida en el ambiente de los líquidos del sustrato durante la FES, sirve para conocer en que momento, un sustrato presenta una concentración alta de MS o si retiene humedad, lo influye sobre la posibilidad de obtener un producto seco y fermentado en mayor o menor tiempo.

Esta variable tuvo un comportamiento cúbico ($P < 0.01$) a través de la FES. Así también se encontró un efecto ($P < 0.02$) de la interacción de tratamiento por día indicando que los tratamientos tienen un cambio de peso distinto entre tratamientos conforme la FES progresa. Según los valores estimados, al d5 de FES, los sustratos pueden llegar a tener un peso $\sim 25.5\%$ del peso que tenían inicialmente ($t_1, 25.5 \pm 1.8\%$; $t_2, 25.5 \pm 2.4\%$; $t_3, 25.3 \pm 2.4\%$; $t_4, 25.7 \pm 2.6\%$), lo que significa que para ese momento se puede llegar a perder casi un 75% del peso en los sustratos en forma de humedad y gases.

Algunos de los sólidos de los sustratos, se solubilizan y se agregan al contenido de agua de estos debido a la FES (Reid, 1983). En procesos de FES de otro tipo de sustratos, se ha encontrado pérdida de peso durante el proceso de FES (Rolz *et al.*, 1986), esta pérdida de peso debe ser resultado de la evaporización del agua liberada y de los gases formados a partir de sólidos durante la respiración; además puede haber pérdida de metabolitos intermediarios que son volátiles a la temperatura a la que se someten las muestras (Rodríguez *et al.*, 2001b).

La $-\Delta H$, permite conocer cual sustrato pierde más peso en forma de humedad debido a la temperatura de FES, si este valor es alto y la MS del sustrato es baja al final del proceso, se sabrá de manera indirecta cual sustrato pierde más componentes de la MS por su conversión a metabolitos intermediarios y productos de fermentación solubles, líquidos y volatilizables. Junto con la $-\Delta H$ debe considerarse la MS del sustrato, estas dos variables se discuten en conjunto al final de la sección de resultados y discusión.

pH. Este indicador representa una condición química, cuando se encuentra a un nivel bajo, inhibe la proliferación de ciertas bacterias, su nivel alto o bajo es dependiente de la presencia de ácidos y otros compuestos como el NH_3 . Esta variable mostró un claro incremento con efecto cuadrático ($P < 0.01$) durante el proceso de FES; así también, esta variable mostró una interacción ($P < 0.01$) de

tratamiento por el efecto cuadrático del día, indicando que ese incremento fue distinto entre tratamientos.

Según los valores estimados, del d2 al d5 de FES, el pH del sustrato de t1 puede incrementarse de un valor de 3.9 ± 0.2 (d2) hasta un 5.6 ± 0.2 (d5). El pH del sustrato de t2 puede incrementarse desde 3.0 ± 0.9 (d3) hasta 4.0 ± 0.8 (d5). En el sustrato de t3 puede incrementarse desde 3.8 ± 0.9 (d2) hasta 5.4 ± 0.8 (d5) y en t4 puede ir desde 4.7 ± 0.6 (d0) a 8.1 ± 0.8 (d5). En la FES de algunos sustratos, la disminución del pH está relacionada con el incremento de la concentración de ácidos orgánicos; la producción de ácidos orgánicos es resultado del consumo de carbohidratos de fácil fermentación (Calderón *et al.*, 2005). El incremento del pH está relacionado directamente con la producción de NH_3 y con una menor producción de ácidos orgánicos (Elías *et al.*, 2001; Rodríguez *et al.*, 2001b).

El incremento de pH también está relacionado con el incremento del contenido total de aminoácidos y productos alcalinizantes (Peñaloza *et al.*, 1985). Rodríguez *et al.*, (2001b), en el proceso de FES de mezclas de bagazo de caña y boniato, observaron que el pH se incrementó después de 72 h de fermentación.

Conteo de levaduras (CL). Se ha demostrado que el BM expuesto a FES específicamente con levaduras, mejora su calidad nutritiva (Hang *et al.*, 1981; Joshi y Sandhu, 1996), por esta razón es importante la evaluación de esta variable en las condiciones de la FES de los sustratos en este trabajo.

Sobre esta variable, se observó un efecto ($P < 0.04$) de la interacción de tratamiento con el comportamiento cuártico de la variable, esto indica que hubo diferencia en la cantidad de levaduras con un comportamiento fluctuante en los distintos sustratos en función al tiempo de FES. La concentración más alta de levaduras se observó en los d3 y d4 de FES, según los estimados, la cantidad de levaduras en los diferentes tratamientos en el d3 fueron, en t1, $4.4 \cdot 10^8 \text{ cel} \cdot \text{g}^{-1} \text{ MS}$, en t2, $3.5 \cdot 10^8 \text{ cel} \cdot \text{g}^{-1} \text{ MS}$, en t3, $4.7 \cdot 10^8 \text{ cel} \cdot \text{g}^{-1} \text{ MS}$ y en t4, $1.0 \cdot 10^8 \text{ cel} \cdot \text{g}^{-1} \text{ MS}$. En el d4, los valores estimados fueron, t1, $4.5 \cdot 10^8$

cel*g⁻¹ MS, t2, 3.6*108 cel*g⁻¹ MS, t3, 4.8*108 cel*g⁻¹ MS y t4, 1.0*108 cel*g⁻¹ MS. En el d5 (como producto terminado), los valores estimados fueron, t1, 3.7*108 cel*g⁻¹ MS, t2, 3.0*108 cel*g⁻¹ MS, t3, 4.0*108 cel*g⁻¹ MS y t4, 8.5*107 cel*g⁻¹ MS.

El crecimiento de algunos microorganismos que se encuentran presentes de manera natural en diferentes tipos de sustratos, se ve potencializado por la presencia de carbohidratos fermentables, iniciando el proceso de FES, cuando hay condiciones de presencia de oxígeno y otros nutrientes como el NNP, las levaduras son las más favorecidas; en este caso el NNP se agregó con la adición de urea y sulfato de amonio (Elías *et al.*, 1990; Rodríguez *et al.*, 2001b; Becerra, 2006; Díaz, 2006).

El incremento en la calidad nutritiva de algunos sustratos fermentados, se puede atribuir en gran parte al incremento de la población de levaduras ya que es conocido desde hace décadas que su concentración de proteína es alta y como concentrado proteico, las levaduras pueden ser comparables a la pasta de soya, aún y cuando tienen un bajo contenido de metionina (Klose y Fevold, 1945). En este trabajo, la población de levaduras se incrementó en mayor proporción en los sustratos en los que se incluyó BM, basado en esto, el producto fermentado del BM y del BM en combinación con la MD como sustrato, pueden tener un valor nutritivo potencialmente mayor de acuerdo a su contenido de levaduras.

Nitrógeno amoniacal (NH₃). La urea añadida a los sustratos en procesos de FES, es transformada a NH₃ por efecto de especies microbianas ureolíticas (Valiño *et al.*, 2002; Calderón *et al.*, 2005), si el sustrato proporciona una disponibilidad energética baja, los microorganismos no pueden incorporarlo en la formación de aminoácidos para su crecimiento o lo hacen en baja proporción, además cuando se tiene un pH bajo, esto impide la pérdida del NH₃ (Rodríguez *et al.*, 2001b). El NH₃ también puede producirse por actividad desaminativa (Calderón *et al.*, 2005).

Sobre esta variable, se observó un incremento con un comportamiento cúbico ($P < 0.05$) sin diferencias ($P > 0.05$) entre tratamientos. En este trabajo, del d0 al d5 de la FES las concentraciones de NH_3 estimadas se incrementaron ($P < 0.05$) de 0.09 ± 0.03 a $0.62 \pm 0.03 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ en t1, de 0.05 ± 0.03 a $0.59 \pm 0.05 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ en t2, de $0.07 \pm 0.03 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ a $0.61 \pm 0.05 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ en t3 y de 0.05 ± 0.03 a $0.58 \pm 0.05 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ en t4, indicando actividad de los microorganismos ureolíticos. El NH_3 como compuesto puede ser utilizado por ciertos microorganismos que no hidrolizan la urea agregada, como resultado de esto el contenido de microorganismos en sustratos fermentados se puede incrementar (Valiño *et al.*, 2002). Calderón *et al.*, (2005) sugieren que tanto lactobacilos como levaduras son capaces de captar NH_3 para sintetizar proteína unicelular. Rodríguez *et al.*, (2001a) mencionan que no todo el NH_3 producido es utilizado, ya que la producción de NH_3 es más rápida que su utilización para la síntesis de aminoácidos.

Ácido Láctico (AcL). Este ácido es producido por el catabolismo de los carbohidratos (Rodríguez *et al.*, 2001b) y es el mejor indicador de la correcta fermentación de los forrajes en condiciones anaerobias (Madrid *et al.*, 1999), en condiciones anaerobias, es un producto común en la fermentación, por lo que se utiliza para evaluación de ensilajes. En el ensilaje de BM y durante el tiempo en que este permanece almacenado, se produce fácilmente (Anrique y Viveros, 2002). Lo anterior lo hace un indicador importante en los procesos fermentativos.

Sobre esta variable se observó diferencia ($P < 0.01$) entre tratamientos, con una disminución ($P < 0.01$; efecto cúbico) durante el proceso de FES, la concentración de AcL disminuyó en todos los tratamientos del d0 al d2 de la FES. En los tratamientos con mayor cantidad de BM (t1 y t2), la presencia de AcL en mayor cantidad en el d0, confirman que en este subproducto (BM), hay formación de AcL desde el momento en que es producido (Anrique y Viveros, 2002), haciéndolo naturalmente ácido, pero empieza a decrecer al ser expuesto al proceso de FES para obtener manzanarina.

Los valores estimados de Acl en los d0, d2 y d3 de la FES en los diferentes tratamientos fueron $2.96\pm 0.37 \text{ mg}^*\text{g}^{-1}$, $0.78\pm 0.22 \text{ mg}^*\text{g}^{-1}$ y $0.85\pm 0.21 \text{ mg}^*\text{g}^{-1}$ en t1, $3.32\pm 0.34 \text{ mg}^*\text{g}^{-1}$, $1.14\pm 0.57 \text{ mg}^*\text{g}^{-1}$ y $1.21\pm 0.55 \text{ mg}^*\text{g}^{-1}$ en t2, $2.20\pm 0.31 \text{ mg}^*\text{g}^{-1}$, $0.02\pm 0.56 \text{ mg}^*\text{g}^{-1}$ y $0.09\pm 0.54 \text{ mg}^*\text{g}^{-1}$ en t3 y por último, $2.27\pm 0.34 \text{ mg}^*\text{g}^{-1}$, $0.09\pm 0.58 \text{ mg}^*\text{g}^{-1}$ y $0.17\pm 0.55 \text{ mg}^*\text{g}^{-1}$ en t4. Según la tendencia cúbica ($P<0.01$) de esta variable, después del d3 puede haber incrementos en la concentración de Acl durante la FES.

El incremento del pH, coincide con la disminución en la concentración de Acl. La disminución de la concentración de Acl, pudo haber estado asociada a una fermentación secundaria del Acl, formando otros ácidos orgánicos más débiles (Anrique y Viveros, 2002).

Materia seca (MS) y cenizas (Cen). El objetivo de medir la MS durante este trabajo fue determinar cuál de los sustratos fermentados requiere un menor tiempo de FES para la obtención de manjarina, para la posibilidad de almacenar este producto. La concentración de cenizas indica la mayor o menor cantidad de materia inorgánica en un alimento. La MS tuvo se incrementó ($P<0.01$) de forma cúbica en todos los tratamientos, hubo una interacción ($P<0.06$) de este comportamiento con el efecto de tratamiento, indicando que hay diferencia ($P<0.06$) en como la concentración de MS se incrementa en los diferentes tipos de sustrato.

Era de esperarse por la temperatura (32°C) y el movimiento del sustrato (cada 4 h) que la MS se incrementara paulatinamente debido a la pérdida de humedad. El sustrato que tuvo mayor ($P<0.06$) concentración de MS durante la FES fue el de t1, según los datos estimados el sustrato de t1 tuvo un $16.9\pm 2.7\%$ de MS en el d0 y $69.8\pm 3.3\%$ de MS en el d6. El sustrato de t2 tuvo un $13.0\pm 2.7\%$ de MS en el d0 y $65.9\pm 5.0\%$ de MS en el d6. El sustrato de t3 tuvo un $10.4\pm 2.7\%$ de MS en el d0 y $63.4\pm 5.0\%$ de MS en el d6 y el sustrato de t3 tuvo un $14.3\pm 3.0\%$ de MS en el d0 y $67.2\pm 5.1\%$ de MS en el d6.

La Saccharina, se obtiene a partir de la caña de azúcar limpia y sin cogollo (Elías *et al.*, 1990), los principios y fundamentos en los se basa ese proceso, son los mismos que se utilizaron como base para desarrollar el proceso de obtención de manjarina (Díaz, 2006).

Una de las características de la obtención de Saccharina rústica es que durante y después del proceso de FES, el producto puede ser secado al sol, por lo que el objetivo de esto es lograr obtener un producto seco que pueda almacenarse y que tenga un contenido de menos del 14% de humedad (Vivas y Carvajal, 2004). Al exponer el sustrato al sol, la Saccharina tiene un secado rápido (Ruíz *et al.*, 2002) y pierde gran parte de su contenido de humedad, lo mismo sucede durante el proceso de obtención de la manjarina.

Se observó que después de seis días de fermentación el sustrato que alcanza más rápido un menor porcentaje de fue el de t1. Con lo anterior se puede deducir hasta el momento que en el proceso de obtención de manjarina a partir de BM, se necesita menor tiempo, tiene una cantidad de levaduras alta y se su concentración de Acl disminuye durante la FES. La concentración de Cen en BS en los tratamientos, se incrementó ($P<0.01$) de manera cuártica en los diferentes sustratos, se observó un efecto ($P<0.02$) de tratamiento con un incremento cuadrático (interacción de tratamiento por efecto cuadrático del día de fermentación). El comportamiento de la concentración de Cen (BS).

El punto más alto de concentración de Cen en los diferentes sustratos se observaron en el d3 según los valores estimados. La concentración de Cen en BS del sustrato de t1 fue de $2.24\pm 0.29\%$ en el d0 y de $4.76\pm 0.37\%$ en el d3. El sustrato de t2 tuvo un $2.59\pm 0.29\%$ en el d0 y $5.11\pm 0.54\%$ en el d3. El sustrato de t3 tuvo un $3.77\pm 0.29\%$ en el d0 y $6.29\pm 0.54\%$ en el d3. El sustrato de t4 tuvo un $4.08\pm 0.32\%$ en el d0 y $6.61\pm 0.55\%$ en el d3.

El incremento de la concentración de cenizas en un sustrato durante la FES, indica que se pierde parte de la materia orgánica durante el proceso, esta pérdida es el resultado del consumo de los carbohidratos fácilmente fermentables como fuente de energía para el crecimiento de los diversos microorganismos (ya sean bacterias, levaduras u hongos), los cuales, durante su metabolización producen agua, bióxido de carbono y compuestos solubles o volátiles (Rodríguez *et al.*, 2001b).

Esta pérdida también provoca un efecto de incremento en la concentración relativa en BS de otros componentes, como por ejemplo la fibra, la PC (Rodríguez *et al.*, 2001a) y todos los indicadores que dependen de la MS (Rodríguez *et al.*, 2001b). La pérdida de materia orgánica fue mayor ($P<0.02$) en el sustrato de t4 como se puede deducir en base a su concentración de Cen.

Proteína cruda (PC). Durante la FES, la PC del sustrato se incrementa (Calderón *et al.*, 2005; Ibarra *et al.*, 2002; Joshi y Sandhu, 1996). Esta variable, mostró un comportamiento cuártico ($P<0.01$) durante la FES. Se encontró un efecto ($P<0.025$) de tratamiento con un comportamiento cuadrático (interacción de tratamiento por efecto cuadrático del día de fermentación) durante la FES. Los valores de concentración de PC más altos se encontraron en el d1 de FES, mientras que los valores de concentración de PC más bajos se encontraron en el d3 de FES según los estimados.

La concentración de PC en BS del sustrato de t1 fue de $26.6\pm 1.4\%$ en el d1 y de $17.9\pm 1.7\%$ en el d3. La concentración de PC del sustrato de t2 fue de $26.4\pm 2.4\%$ en el d1 y de $17.7\pm 2.6\%$ en el d3. En el sustrato de t3, la concentración fue de $26.4\pm 2.4\%$ en el d1 y de $17.7\pm 2.6\%$ en el d3. En el sustrato de t4, la concentración fue de $24.6\pm 2.5\%$ en el d1 y de $15.8\pm 2.6\%$ en el d3. Según los estimados, puede haber un incremento en la concentración de PC después del d3, es posible que esto se deba al efecto de pérdida de MO.

La toma de muestras del d0 se realizó antes de añadir urea, sulfato de amonio y minerales a los sustratos, es por eso que se observan niveles bajos de PC en este día y un incremento drástico en su concentración del d0 al d1. La PC en BS puede disminuir ligeramente debido a una pérdida de NH₃ por volatilización (Rodríguez *et al.*, 2001a), esto pudo haberse en este experimento, ya que la disminución en la concentración de PC, coincide con el incremento de NH₃ en BH.

Proteína verdadera (PV). Este componente se incrementa durante la FES de diversos tipos de sustrato (Peñaloza *et al.*, 1985; Rodríguez *et al.*, 2001b; Ibarra *et al.*, 2002). Rodríguez *et al.* (2001a), mencionan que la PV es un indicador importante de la síntesis microbiana.

Esta variable mostró un efecto ($P<0.01$) de la interacción de tratamiento por el efecto cuártico de día de fermentación. Lo que significa que hubo un comportamiento fluctuante durante el proceso y que los sustratos tuvieron diferente ($P<0.01$) concentración de PV durante el proceso. Según los datos estimados, la concentración de PV en BS alcanzó su punto máximo a partir del d2 de la FES. t4 fue el que tuvo menos ($P<0.01$) PV, coincidiendo con una menor cantidad de levaduras en ese sustrato.

Las concentraciones de PV en BS, en los d0, d2 y d3 de la FES en los diferentes sustratos fueron, en t1 $4.6\pm 1.5\%$, $16.6\pm 1.5\%$ y $16.8\pm 1.8\%$, en t2 $4.9\pm 1.5\%$, $16.9\pm 2.6\%$ y $17.1\pm 2.7\%$, en t3 $5.1\pm 1.5\%$, $17.0\pm 2.6\%$ y $17.2\pm 2.7\%$ y en t4 $1.3\pm 1.6\%$, $13.2\pm 2.7\%$ y $13.4\pm 2.8\%$. Al d5 de la FES, las concentraciones de PV en BS fueron de $15.5\pm 1.8\%$ en t1, $15.8\pm 2.8\%$ en t2, $15.9\pm 2.8\%$ en t3 y $12.2\pm 2.9\%$ en t4.

Proporción de PV (PV/PC). Esta variable muestra la relación que existe en la concentración de proteína en forma de proteína verdadera y la concentración total de nitrógeno en un sustrato, incluyendo el nitrógeno no proteico. Esta variable, mostró un comportamiento cuártico (fluctuante; ($P<0.05$) con diferencia ($P<0.01$) entre tratamientos.

El d3 de la FES se alcanzó la mayor proporción de PV/PC según los datos estimados. Los valores de esta variable en los diferentes sustratos en el d3 de FES son, $90.2 \pm 5.7\%$ en t1, $97.9 \pm 8.3\%$ en t2, 98.9 ± 8.3 en t3 y 49.9 ± 8.6 en t4. Rodríguez *et al.*, (2001b), utilizaron esta relación para evaluar la eficiencia de conversión de NNP a PV. Ellos reportan que la máxima eficiencia de uso de NNP se encontró a las 96 h en la FES en sustratos de mezclas de caña de azúcar con boniato. En este trabajo, los tratamientos en los que se incluyó BM en mayor proporción como sustrato, fueron los que mostraron una proporción PV/PC mayor superior, esto indica mayor eficiencia de uso de NNP a las 96 h coincidiendo con lo reportado por Rodríguez *et al.*, (2001b). Cabe mencionar que a las 96 h es cuando se observó la mayor cantidad de levaduras por gramo de MS en todos los tratamientos. La proporción PV/PC tiene relación con los conteos de levaduras en la FES de subproductos de manzana.

Polifenoles totales (PoT). La razón por la cual los PoT se consideraron dentro del análisis de este trabajo y se hace énfasis en la importancia de su concentración en la manzarina, es porque algunos de ellos se consideran compuestos antioxidantes importantes (Pérez-de-Alejo *et al.*, 1998).

Esta variable, mostró un efecto ($P < 0.01$) de la interacción de tratamiento por el efecto cuártico del día de fermentación. Esto indica que la concentración de PoT tuvo un comportamiento fluctuante durante el proceso con diferencias en concentración entre los distintos sustratos.

La manzana puede tener una cantidad de PoT en un rango de 0.27 a $2.98 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ en base húmeda (Bravo, 1998), si consideramos que esta tiene 14.4% de MS (USDA, 2007), la concentración de PoT en la manzana en BS puede ir desde 1.875 hasta $20.694 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ MS. Los valores estimados de concentración de PoT ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ de MS) en los sustratos fermentados en este trabajo fueron, en el d0, 13.7 ± 1.1 en t1, 14.1 ± 1.1 en t2, 15.1 ± 1.1 en t3 y 7.4 ± 1.3 en t4. El momento en el que se observó una mayor concentración de PoT durante el proceso fue en el d2, las concentraciones fueron ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ de MS) 14.5 ± 1.1 en t1, 15.0 ± 1.9 en t2, 15.9 ± 1.9 en t3 y 8.2 ± 2.0 en t4.

Al finalizar el proceso de FES (d6), la concentración de PoT en los diferentes sustratos fue ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de MS) 8.0 ± 1.4 en t1, 8.4 ± 2.1 en t2, 9.4 ± 2.1 en t3 y 1.7 ± 2.1 en t4. Los sustratos que contenían BM fueron los que presentaron una mayor concentración de PoT. Del d1 al d2 de FES, la concentración de PoT se incrementó; esto puede ser resultado de un incremento relativo de PoT, debido al consumo de MS por el uso de los carbohidratos fermentables. A partir de las 48 h de FES, hubo una disminución de la concentración de PoT en todos los tratamientos.

En subproductos agroindustriales, pueden encontrarse sistemas heterogéneos de microorganismos, en estos sistemas, puede haber gran diversidad de especies (Valiño *et al.*, 2002) y dentro de esa diversidad, puede haber presencia de hongos, como lo mencionan Rodríguez *et al.* (2001b). La razón de mencionar esto, es porque algunos de estos microorganismos, pueden relacionarse con la disminución de PoT (Camarero *et al.*, 1994). La solubilidad de los polifenoles contenidos en la manzana es alta, lo que permite un ataque más rápido de los microorganismos sobre este sustrato, dando lugar a su disminución. Otro factor que puede contribuir a este hecho son los procesos oxidativos que pueden sufrir estos compuestos.

Fibra cruda (FC) y extracto etéreo (EE). Es conocido que la fibra cruda es un valor representativo de la concentración de los carbohidratos estructurales en los alimentos, así como el extracto etéreo nos muestra la concentración de grasa. Las muestras del d6, mostraron diferencia ($P<0.05$) en su contenido de FC. La concentración de t1 y t2 fue mayor ($P<0.05$) que la de t3 y t4.

El contenido de FC del BM puede ir desde un 15.3% (Joshi y Sandhu, 1996) hasta un 28.7% (Anrique y Viveros, 2002) en BS. La manzana tiene un 16.6% de fibra total en BS. Por lo anterior, es comprensible que el mayor contenido de fibra del BM, comparado con el de la MD haya provocado que después de la FES, la concentración de FC de la manzanina obtenida de sustratos con mayor cantidad

de BM, fuera mayor que la cantidad de FC observada en la manzarina obtenida de sustratos con mayor cantidad de MD (Cuadro 39). La concentración de EE no mostró diferencia ($P>0.05$) entre tratamientos.

Producción de Gas (PG) *in vitro*

La evolución de la producción de gas como técnica *in vitro* de evaluación de alimentos para rumiantes, representa la cinética de fermentación microbiana de un alimento en el rumen (Fondevila y Barrios, 2001), siendo el gas el reflejo y producto principal de esa fermentación (Groot *et al.*, 1996). Sobre el perfil de PG se observó un efecto ($P<0.05$) de tratamiento. Las muestras de manzarina (producto fermentado del d6) de t1 produjo un perfil de PG distinto ($P<0.05$) al perfil de PG producido por la manzarina de t3 y t4. El perfil de PG de la manzarina de t2 fue distinto ($P<0.05$) al perfil de PG de la manzarina de t4, pero similar ($P>0.05$) al perfil de PG de la manzarina de t1 y t3. Los perfiles de PG de t3 y t4 fueron similares ($P>0.05$).

El ajuste del perfil de PG al modelo matemático de Groot *et al.*, (1996), fue adecuado ($P<0.01$). Los resultados obtenidos con este modelo indican que las muestras de manzarina de t1 pueden tener una PG alta (parámetro A o asíntota de PG), sugiriendo el desarrollo de microorganismos ruminales.

CUADRO 39. CARACTERÍSTICAS NUTRITIVAS DE LA MANZARINA (MUESTRAS d6; MEDIA±ERROR ESTÁNDAR).

Variable	Tratamiento			
	t1; 100% BM	t2; 66.6% BM, 33.4% MD	t3; 33.4% BM, 66.6% MD	t4; 100% MD
Aporte de Levaduras (cel*g ⁻¹ MS) ^{1,2}	3.75*10 ⁸	3.02*10 ⁸	4.01*10 ⁸	8.49*10 ⁷
<i>Características Físico-Químicas</i>				
MS (%) ²	69.8±3.3	65.9±5.0	63.4±5.0	67.2±5.1
Gen (% MS) ²	3.23±0.26	3.57±0.55	4.76±0.55	5.07±0.56
PC (% MS) ²	21.6±1.7	21.4±2.6	21.4±2.6	19.5±2.7
PV (% MS) ²	15.5±1.8	15.8±2.8	15.9±2.8	12.2±2.9
Relación PV/PC (%) ²	63.4±5.6	71.1±8.5	72.1±8.5	23.1±8.7
PoT (mg*g ⁻¹ MS) ²	8.0±1.4	8.4±2.1	9.4±2.1	1.7±2.1
FC (% MS) ³	35.1±1.1 ^a	32.4±0.8 ^a	29.3±1.1 ^b	18.9±0.8 ^c
EE (% MS) ³	3.2±1.3	3.5±0.9	5.9±1.3	5.5±1.0

a,b,c,d Literales distintas como superíndice indican diferencia (P<0.05) entre tratamientos

¹ Valores correspondientes al día de FES

² Valores estimados con base en el modelo mixto

³ Medidas calculadas con base en el modelo completamente aleatorio

Las muestras de manzanina de t2 y t3 pueden llegar la producción máxima de gas en menor tiempo, o bien en otras palabras, la fermentación de los carbohidratos estructurales de la manzanina de t2 y t3 por parte los microorganismos ruminales, se lleva a cabo con mayor rapidez, según lo indica un parámetro B (es el tiempo en el que se produce la mitad de la producción asintótica de gas) más bajo.

El parámetro C (forma de la curva del perfil de PG) y un parámetro B altos, indican que la manzanina de t4 promueve más lentamente y en menor proporción el desarrollo de microorganismos ruminales. Las curvas formadas por los valores predichos de PG obtenidos con el modelo matemático de Groot *et al.*, (1996). Lo anteriormente mencionado, nos permite entender que la manzanina de t4, como alimento, es la que aporta menos energía para el desarrollo y reproducción de microorganismos ruminales, provocando que su crecimiento sea más lento; la manzanina de t1 fue el producto que demostró ser el mejor sustrato para el desarrollo y crecimiento de microorganismos ruminales.

El valor del parámetro A (Cuadro 40), está relacionado con la actividad fermentativa de los microorganismos ruminales sobre los componentes del sustrato (Groot *et al.*, 1996), la composición y el contenido de nutrientes de la manzanina de t1, estimuló más el desarrollo de microorganismos ruminales que la manzanina de los otros tratamientos. Basados en los resultados del parámetro B, se puede deducir que los microorganismos ruminales fermentaron los carbohidratos presentes alcanzando una tasa máxima de PG más rápido (Groot *et al.*, 1998) en la manzanina obtenida de t2 y t3.

El parámetro C, indica la forma de la curva formada por el perfil de la PG acumulada de un alimento (Groot *et al.*, 1998); el perfil de la curva de PG de la manzanina de t4, indica que esta tiene una forma sigmoidea más marcada que la manzanina del resto de los tratamientos, en términos biológicos, esto indica que los microorganismos ruminales, se tardaron más tiempo en establecerse en el sustrato sólido fermentable de este tipo de manzanina (t4) durante las primeras horas de fermentación, retardando el momento (parámetro B) en que se produce la mayor cantidad de gas.

CUADRO 40. PARÁMETROS OBTENIDOS DE LA FERMENTACIÓN RUMINAL *in vitro* DE LA MANZARINA (MUESTRAS 06; MEDIA±ERROR ESTÁNDAR)¹.

Variable	Tratamiento			
	t1; 100% BM	t2; 66.6% BM, 33.4% MD	t3; 33.4% BM, 66.6% MD	t4; 100% MD
Parámetro A (ml*0.2g ⁻¹ MS)	45.45±1.17	40.36±0.87	34.40±1.36	29.17±1.18
Parámetro B (h)	12.86±0.55	11.68±0.40	11.90±0.71	12.38±0.68
Parámetro C ²	1.72±0.08	1.94±0.10	2.27±0.24	2.98±0.40
Deg (%)	49.7±11.9	54.4±11.9	69.4±13.7	83.8±11.9
EM (Mcal kg ⁻¹ MS) ³	1.94±0.04 ^a	1.96±0.03 ^a	1.94±0.04 ^a	2.21±0.03 ^b

^{a, b} Literales distintas como superíndice indican diferencia (P<0.05) entre tratamientos

¹ Obtenidos con la aplicación del el modelo matemático de Groot *et al.* (1996) y la aplicación de la técnica de producción de gas *in vitro* de Menke y Steingass (1989).

² Forma de la curva formada por el perfil de producción de gas, si C≥1, entonces la curva tiene forma sigmoidea, si C<1, entonces la curva tiene forma de parábola.

³ Calculada con la aplicación de la técnica de producción de gas *in vitro* y la ecuación de predicción para determinación de EM de Menke y Steingass (1989)

Si con el perfil de PG de una muestra de alimento se obtiene un parámetro C mayor que 1 (perfil con forma sigmoidea), se puede asumir que la tasa máxima de producción de gas se alcanza en un lapso de tiempo mayor, conforme mayor es el parámetro B, o bien esa tasa máxima de producción de gas se alcanza en un tiempo menor conforme menor es el parámetro B (Groot *et al.*, 1998).

En términos biológicos, si C es mayor a 1 y B tiene un valor elevado, entonces los microorganismos ruminales tardan más tiempo en empezar a degradar los carbohidratos fermentables de un alimento, si C es mayor a 1 y B tiene un valor bajo, entonces, los microorganismos ruminales tardan menos tiempo en degradar los carbohidratos fermentables de un alimento, ambas situaciones, con un pequeño retraso de tiempo en las primeras horas de fermentación para el establecimiento de los microorganismos en los sólidos fermentables no solubles de los sustratos evaluados.

Es probable, que en la manzarina de t2 y t3 algunos carbohidratos fueron fermentados más rápidamente por los microorganismos ruminales que en la manzarina de t1 y t4, de acuerdo a los parámetros B y C; sin embargo hubo mayor desarrollo de poblaciones de microorganismos en la manzarina de t1.

Degradabilidad ruminal *in vitro* (Deg). Los perfiles de PG, no necesariamente están linealmente relacionados a la degradabilidad de un sustrato, puesto que no todo el material degradado es necesariamente fermentable (Groot *et al.*, 1998), por lo que además de conocer la PG, es bueno determinar que tanto material es soluble y degradable al evaluar un alimento.

Sobre esta variable, no se encontró diferencia ($P>0.05$) entre tratamientos, para evaluarla es necesario utilizar un mayor número de repeticiones (Cuadro 40) debido a la variabilidad que obtuvo en los resultados. A pesar de lo anterior, se puede observar una diferencia numérica entre las medias, mostrando que la manzarina obtenida en t4 es altamente degradable en condiciones ruminales,

contrastando con su menor PG (indicador de fermentación ruminal) y su menor valor obtenido en el parámetro A, al compararla con la manzarina de los otros tratamientos.

Fondevila y Barrios (2001) mencionan que existe una relación inversa entre la concentración de proteína y la PG *in vitro* de los alimentos, también mencionan que la grasa no aporta gas durante su fermentación, pero es soluble. La manzarina de t4 tuvo la mayor concentración de PC, Cen y EE, contrastando con una menor PG.

La alta Deg pudo deberse a que una alta proporción de los componentes de la manzarina de t4 (PC, Cen y EE; Cuadro 39), debe haberse solubilizado sin reflejarse en el perfil de PG. Cabe mencionar que la manzarina de t4 tuvo la menor proporción de PV/PC, indicando una alta cantidad de NNP en su composición, es conocido que el NNP de los alimentos es altamente soluble en medios líquidos. Con esto se confirma como la PG permite contrastar el efecto de cómo algunos componentes de la MS, aportan energía en una muy pequeña cantidad para el desarrollo de microorganismos ruminales (Fondevila y Barrios, 2001).

Energía metabolizable (EM). La energía de los alimentos es una variable importante en la evaluación cualitativa de los alimentos. La manzarina de los obtenida en los diferentes tratamientos, fue diferente ($P < 0.05$) en su concentración de EM. La manzarina de t4 tuvo la mayor ($P < 0.05$) concentración de EM; la concentración de EM de la manzarina obtenida en el t1, t2 y t3 fue similar ($P > 0.05$; Cuadro 40). Es necesario recordar que la ecuación de predicción de EM se basa en la PG, concentración de PC y EE (Menke y Steingass, 1988), en la manzarina de t4, aún y cuando su PG fue la más baja, la concentración de PC y EE fue alta, estos componentes aportan energía e influyen en el valor calculado de la EM, sin embargo debe considerarse que gran parte de la PC de la manzarina de t4 se encuentra en forma de NNP.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Durante el proceso de FES para obtención de manzarina, el pH de los sustratos se incrementa, esto coincide con un aumento en la concentración de amoníaco y con la disminución en la concentración de ácido láctico.

La cantidad de levaduras, la concentración de proteína verdadera, la proporción de proteína verdadera en función a la cantidad de proteína cruda y la concentración de polifenoles totales, son mayores en la manzarina obtenida a partir de BM como el principal componente del sustrato.

La manzarina obtenida a partir de MD como principal componente del sustrato tiene una pérdida de materia orgánica mayor que la que se obtiene a partir de BM.

La producción de gas *in vitro* de la manzarina obtenida a partir de BM como principal componente del sustrato, es mayor que la producción de gas *in vitro* de la manzarina obtenida a partir de MD.

De acuerdo a lo anterior, la manzarina obtenida a partir de BM como principal fuente del sustrato, es de mayor valor nutritivo que la manzarina obtenida a partir de MD.

Para evaluar la cantidad de materia seca que se pierde debido al consumo de energía en el proceso de FES para obtención de manzarina, se recomienda realizar un diseño experimental, donde se determine con exactitud la cantidad metabolizada de materia seca.

CAPITULO 10. CONCENTRACIÓN DE CARBOHIDRATOS ESTRUCTURALES,
LEVADURAS VIABLES TOTALES Y PÉRDIDA DE MATERIA SECA EN LA
OBTENCIÓN DE MANZARINA A PARTIR DE BAGAZO DE MANZANA

Héctor Esteban Rodríguez Ramírez

RESUMEN

Ya que algunos carbohidratos del bagazo de manzana (BM) son fermentados por levaduras, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar como la adición de manzana de desecho (MD) en sustitución de parte del BM como sustrato para la obtención de manzarina, afecta a la población de esos microorganismos, al comportamiento de la concentración de carbohidratos estructurales (CHO) del sustrato, en la producción de gas (PG) *in vitro* del producto obtenido y en la pérdida de materia seca (MS) que se presenta durante la FES. Se utilizaron dos tratamientos (t1: BM 100.0% y t2: BM 66.6%+33.4% de MD). Se midieron MS, cenizas (Cen), pérdida de MS (ConsMS), levaduras (CL), pH, amoníaco (NH₃), ácido láctico (AcL), ácidos grasos volátiles (AGV's), proteína cruda (PC), proporción de proteína verdadera (PV/PC). Éstas variables se analizaron con un modelo mixto (MIXED del SAS 9.0), como efecto fijo se usó el tratamiento, el día de FES se usó como covariable para el análisis de tendencias y como efecto aleatorio, se usó la repetición anidada en tratamiento. La proteína verdadera (PV), la fibra detergente neutro (FDN), la fibra detergente ácida (FDA) y la digestibilidad (DIVMS) de los sustratos se analizaron con un modelo mixto (MIXED del SAS 9.0) con el día de FES, tratamiento y su interacción como efectos fijos y como efecto aleatorio, la repetición anidada en tratamiento. Las muestras de sustrato antes (d0) y después (d8) de la FES, se evaluaron con la técnica de PG. Los perfiles de PG se analizaron con un modelo multivariado para análisis de medidas repetidas (GLM del SAS 9.0, instrucción MANOVA). En los resultados relevantes se encontró que en el sustrato de t1 se produce una CL (2.84×10^{10} UFC \cdot g⁻¹ MS) mayor ($P < 0.025$) que en el sustrato de t2 (3.18×10^9 UFC \cdot g⁻¹ MS) en el d8 de la FES. Del d0 al d8, hubo pérdida ($P < 0.01$) de MS, en t1 fue de 21.2% en el d4 y de 42.0% en el d8. En t2, la pérdida fue de 20.7% y 41.5% en el d4 y en el d8. El AcL disminuyó ($P < 0.01$) del d0 al d2, de 2.73 ± 0.2 a 0.74 ± 0.2 mg \cdot g⁻¹. La PV se incrementó ($P < 0.05$) de manera lineal en ambos tratamientos (en t1, de 6.9 ± 1.0 en el d0 a 15.5 ± 1.0 en el d8 y en t2, de 8.5 ± 1.0 en el d0 a 12.9 ± 1.0 en el d8).

en el d8), no hubo diferencia ($P>0.05$) entre tratamientos en el d8. La FDN y FDA de t1 disminuyeron ($P<0.05$) mientras que en t2 se incrementaron ($P<0.05$). El t1, tuvo menor ($P<0.05$) digestibilidad que t2. El perfil de PG de las muestras de sustrato no fermentado fue diferente ($P<0.05$) al perfil de PG de las muestras de manzarina (sustrato fermentado, d8). La PG de la Mzn (d8) fue más lenta, que la PG del sustrato no fermentado, debido a la diferente concentración Cen, PC y PV. Se concluye que la adición de MD al sustrato en sustitución parcial del BM no favorece el desarrollo de levaduras.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tratamientos

Se prepararon dos tratamientos (t) para evaluar la fermentación en estado sólido de sustratos compuestos principalmente por bagazo de manzana (BM), para lo cual se utilizaron 72 recipientes de plástico de una capacidad de 500 ml; en los cuales se depositaron ~350 g de sustrato a fermentar, cada uno se consideró una repetición.

El tratamiento uno (t1) consistió en la FES de 36 repeticiones de BM como sustrato; en el tratamiento dos (t2) se fermentaron 36 repeticiones de una combinación de BM más MD en una proporción de 2:1 en base húmeda; los sustratos se prepararon de esta manera, con el fin de tener diferencia en la concentración de carbohidratos (ver Cuadro 37).

Se planteó la hipótesis de que en el t2 habría una mayor disponibilidad de carbohidratos fermentables al agregar MD en sustitución de parte del BM como sustrato, generando la posibilidad de tener una mayor disponibilidad de energía para el desarrollo de levaduras, sin existir una diferencia considerable en la consistencia de los sustratos. El BM fue obtenido 3 d antes de iniciar el procedimiento y la MD dos días antes, esta fue molida un día antes de iniciar.

Condiciones de Fermentación

La fermentación se llevó a cabo en dos incubadoras a una temperatura de $30 \pm 1^\circ\text{C}$, a los sustratos (BM o BM más MD) se les agregó urea, minerales y sulfato de amonio como nutrientes como se indica en la primera parte de este trabajo. El sustrato con nutrientes, se mezcló 4 veces diarias cada 5 h iniciando a las 08:00 h, durante 16 d; en los d0, d1, d2, d4, d8 y d16 de fermentación se tomaron 6 recipientes (repeticiones) de cada tratamiento, se pesaron y su contenido se utilizó para realizar los análisis correspondientes.

Este proceso se evaluó por un periodo de 16 d con el objetivo de encontrar el momento que se puede considerar como óptimo o mejor para la obtención de manzanarina de mejor calidad en estas condiciones de FES, así también se buscó observar si existen riesgos de putrefacción del sustrato y determinar a partir de que momento se presentan esos riesgos.

Variables Medidas

Las variables evaluadas fueron: materia seca (MS) y cenizas (Cen), pérdida de materia seca debida al proceso de FES (ConsMS), cantidad de levaduras viables totales en el sustrato (CL), pH, concentración de amoníaco (NH₃), concentración de ácido láctico (Acl); concentración de ácidos grasos volátiles (AGV's), porcentaje de proteína cruda (PC), porcentaje de proteína verdadera (PV), proporción de PV (PV/PC), las variables anteriores se determinaron en las muestras de los días 0, 1, 2, 4, 8 y 16.

Se determinaron la concentración fibra detergente neutro y fibra detergente ácida, el porcentaje de digestibilidad de la MS in vitro (DIVMS), la producción de gas in vitro (PG) y los parámetros de fermentación in vitro (A, B, C), estas determinaciones se hicieron solo en las muestras del d0 y del d8.

Las variables MS, Cen, pH, Acl, PC, PV, proporción de PV y parámetros de fermentación in vitro, fueron obtenidos de la misma manera que en la primera parte de este trabajo por lo que no son descritos en esta sección, a continuación solo se describen los procedimientos para determinaciones que no fueron aplicadas en dicha parte o que fueron modificados de algún modo.

Pérdida de materia seca debida al proceso de FES (ConsMS). Para calcular la pérdida de MS disponible en cada repetición, con el porcentaje promedio de MS total del d0 de cada tratamiento y con el peso del sustrato dentro de cada recipiente al inicio del proceso (d0), se calculó la cantidad inicial de MS en gramos, de los sustratos, disponible para la FES en cada repetición; los recipientes con sustrato tomados en cada día de muestreo (n=12, 6 de cada tratamiento), fueron pesados

inmediatamente después de ser retirados de las incubadoras y con ese valor y su respectivo porcentaje de MS total, se calculó la MS disponible en gramos en el momento del muestreo.

La diferencia de la cantidad de MS disponible en gramos en cada repetición al inicio del experimento, menos su correspondiente cantidad de MS disponible en gramos en cada momento de muestreo (d1, d2, d4, d8 o d16) fue la pérdida de MS en gramos consumida por el proceso de FES; esta pérdida, se consideró que se debió a la solubilización de algunos componentes, uso de carbohidratos como fuente de energía, producción de alcoholes, ácidos orgánicos y gases y la consecuente vaporización o pérdida en el ambiente de estos. La pérdida de MS debida al proceso de FES se expresó en porcentaje.

Cantidad de levaduras viables totales en el sustrato (CL). El conteo de levaduras se realizó por medio de la preparación de cultivos en cajas petri estériles. Como medio de cultivo se utilizó agar extracto de malta. Para la dilución serial y la extracción de levaduras de la muestra, se utilizó una solución de agua destilada con un 0.1% de peptona, dicha solución, los recipientes donde se manejó la muestra para la dilución serial y el medio de cultivo fueron esterilizados en autoclave antes de utilizarlos.

La dilución -1 fue vigorosamente mezclada durante 30 minutos a una velocidad de 120 rpm con un agitador mecánico para desprender (extraer) las células de levaduras de la muestra, después de esto, del sobrenadante de la dilución -1, se tomó 1 ml y se depositó en tubos de ensayo con agua con peptona y se llevó a cabo la dilución serial. De la dilución -4 a -9 se tomó una muestra de 1 ml y se utilizó como inóculo para el cultivo, cada muestra se cultivó por triplicado, para el manejo de las diluciones se utilizó una pipeta automática de volumen variable de 100 a 1000 μ l con puntas esterilizadas.

Los cultivos se incubaron a 30°C por 36 h, para posteriormente contar la cantidad de colonias de levaduras formadas. La cantidad de unidades formadoras de colonias se expresó base seca ($\text{ufc} \cdot \text{g}^{-1}$ MS). Los resultados se convirtieron a \log_{10} para ser analizados estadísticamente.

pH. Se determinó con un potenciómetro con una precisión de ± 0.01 unidades. Las muestras líquidas en las que se determinó el pH, se utilizaron también para determinar NH_3 , Acl y AGV's, después de que se centrifugaron a 1,500 g por 15 minutos, las muestras permanecieron en refrigeración (4°C) durante su manejo para estas determinaciones.

Concentración de amoníaco (NH_3). Este compuesto se determinó en las muestras líquidas por espectrofotometría con el procedimiento de Broderick y Kang (1980); debido a la concentración de este componente en las muestras, fue necesario diluirlas al 15% con agua destilada, brevemente, el análisis consiste en agregar 0.05 ml de la muestra líquida diluida más 2.5 ml de reactivo fenol y 2.0 ml de reactivo hipoclorito. Esta mezcla se calienta en baño de agua a $\sim 95^\circ\text{C}$ por 5 minutos y después de enfriar, su absorbancia se mide a 630 nm. Como blanco se utilizó agua destilada y estándar; se utilizó una solución de sulfato de amonio (1, 2, 4, 6 y 8 mM) para la obtención de la ecuación de predicción. El análisis se realizó por triplicado, los resultados se muestran en base húmeda (BH) y en base seca (BS).

Concentración de ácido láctico (Acl). La concentración de Acl de las muestras se determinó por colorimetría según el procedimiento de Taylor (1996). Debido a la concentración de Acl, fue necesario diluir las muestras con agua destilada a un 7% para poder analizarlas. El procedimiento se describe en la primera parte de este trabajo. La concentración de Acl en se mostró en BH y en BS.

Concentración de ácidos grasos volátiles (AGV's). La concentración de ácido acético, propiónico y butírico en las muestras líquidas, se determinó por cromatografía de gases. Los análisis se hicieron en un cromatógrafo SRI 8610, con una columna Alltech phase EC™ 1000, de 15 metros de largo, 0.53 mm de diámetro interno y un espesor de capa de 1.20 μm . Las muestras se inyectaron con

una jeringa Hamilton de 10 μl . Cada muestra se inyectó (2.5 μl) tres veces; se utilizó nitrógeno como gas acarreador y un detector de iones con flama alimentada por una mezcla de hidrógeno y aire.

El programa de temperatura usado fue: inició 100°C, incrementó desde 100 hasta 130°C en dos minutos ($\Delta 15^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$), incremento desde 130 hasta 140°C en 1 minuto ($\Delta 10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$), para terminar, la temperatura se incrementó desde 140 hasta 200°C en 2.4 minutos ($\Delta 25^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$). La columna se calentó a 200°C por al menos 30 minutos antes de comenzar a realizar el análisis de las muestras diariamente.

El estándar de ácidos grasos volátiles se preparó únicamente con ácido acético (3.46 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), ácido propiónico (3.97 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) y ácido butírico (1.53 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) con las concentraciones recomendadas por Galyean (1997). Los resultados se expresaron en BH y en BS.

Porcentaje de carbohidratos estructurales (FDN, FDA). La concentración en porcentaje de la MS de fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente ácida (FDA) se determinaron únicamente en las muestras de sustrato del d0 y del d8 del proceso de FES. Las determinaciones se realizaron con ~ 0.45 g de muestra, utilizando bolsas para análisis de fibra (ANKOM™); las determinaciones se realizaron de manera secuencial, con un aparato para análisis de fibra ANKOM200 y las soluciones comercialmente disponibles para los procedimientos (ANKOM, 2005a; ANKOM, 2005c).

Digestibilidad de la MS *in vitro* (DIVMS). Esta variable se determinó únicamente en las muestras molidas de sustrato deshidratado de los d0 y d8 del proceso de FES. Para determinar la digestibilidad, se utilizó el procedimiento de digestibilidad verdadera *in vitro* de ANKOM (2005b), en el cual las muestras se introducen en bolsas para análisis de fibra, se sellan y posteriormente se incuban a 39°C por 48 h en una solución compuesta por solución amortiguadora más líquido ruminal como inoculante. La solución para incubación, se preparó purgando la superficie del líquido con CO_2 ; el proceso se realizó en un aparato incubador DAISYII.

Producción de gas (PG) *in vitro*. Este procedimiento se llevó a cabo con la técnica de producción de gas *in vitro* de Menke y Steingass (1988) y con las mismas condiciones que se describen en la primer parte de este trabajo, sin embargo, para el análisis de estas muestras, el líquido ruminal utilizado se obtuvo de dos vacas Hereford con cánula cuya alimentación fue únicamente alfalfa.

Análisis Estadístico

Las variables de respuesta MS, Cen, ConsMS, CL, pH, NH³ (en BH y en BS), Acl (en BH y en BS), AGV's, PC, PV/PC se analizaron con un modelo mixto, utilizando como efecto fijo el tipo de sustrato (tratamiento) utilizado para la FES, el efecto del día de fermentación se utilizó como covariable para realizar un análisis de tendencia (cuadrática, cúbica o cuártica) de la variable de interés a través del proceso, en el modelo se incluyeron las interacciones del día de fermentación (efectos cuadrático, cúbico o cuártico) con el efecto de tratamiento. Como efecto aleatorio se utilizó la repetición anidada en tratamiento. Cuando los efectos de tendencia cúbica o cuártica no fueron significativos, se eliminaron del modelo.

La PV, FDN, FDA y DIVMS, se analizaron con un modelo mixto, utilizando como efectos fijos el tipo de sustrato utilizado para la FES (tratamiento), el día de fermentación y su interacción; como efecto aleatorio se utilizó la repetición anidada en tratamiento.

Los perfiles de PG de las muestras (t1 vs. t2) antes (d0) y después (d8) de la FES, se compararon con un método multivariado para el análisis de medidas repetidas en el tiempo. En este caso, las poblaciones se formaron por la agrupación de los datos por tratamiento, día y su interacción. Los datos se procesaron en el SAS 9.0, como se describió en el estudio IV de este trabajo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Materia Seca (MS) y Cenizas (Cen)

La concentración de MS, puede indicar en la FES el tiempo en que se puede obtener un producto fermentado con posibilidad de almacenarse. La concentración de Cen puede ser en la FES, un indicador de la pérdida de MS cuando hay consumo de carbohidratos durante el proceso, además de que permite conocer la concentración de materia inorgánica en los alimentos.

La concentración de MS tuvo un comportamiento cúbico ($P < 0.02$) durante el proceso de la FES, sin diferencia ($P > 0.05$) entre tratamientos. La cantidad de MS promedio en los sustratos se incrementó ($P < 0.02$) del d8. Los valores estimados de concentración de MS en t1 fueron $18.1 \pm 2.6\%$ en el d0, 18.7 ± 2.9 en el d8 y 72.7 ± 3.0 en el d16. Los valores estimados de concentración de MS en t2 fueron $14.3 \pm 2.6\%$ en el d0, 12.3 ± 8.8 en el d8 y 61.6 ± 22.7 en el d16. La concentración de humedad fue alta (mayor al 80%) en ambos tratamientos del d0 al d8.

En este experimento, el proceso de FES de los sustratos no se interrumpió y la temperatura de fermentación ($30 \pm 1^\circ\text{C}$) se mantuvo durante 16 d, con el fin de conocer si el porcentaje de humedad disminuía más rápido en alguno de los tratamientos, de manera que pudiera indicar con cuál de ellos se tiene la posibilidad de obtener con mayor rapidez un producto fermentado y seco, además de conocer que tan necesario es deshidratar el sustrato para detener el proceso fermentativo y el momento óptimo para esto, cuando se utiliza bagazo de manzana como el principal componente del sustrato para producción de la manzanarina.

Al llevar a cabo una FES de BM para obtener manzanarina a gran escala, el proceso debe ser detenido por deshidratación para poder almacenar el producto; el momento ideal para detener el proceso, puede ser determinado en función a la concentración de PV, ya que este es uno de los

mejores indicadores de la síntesis microbiana de proteína (Rodríguez *et al.*, 2001a), los resultados de esta variable se muestran más adelante.

La concentración de cenizas en BS (%), mostró un comportamiento cuártico ($P < 0.02$), su concentración se incrementó de manera fluctuante, sin diferencia ($P > 0.05$) entre tratamientos. La concentración de cenizas en t1 fue de $3.4 \pm 0.2\%$ en el d0, de 4.1 ± 0.2 en el d4 y de 5.6 ± 0.2 en el d8. La concentración de cenizas en t2 fue de $3.9 \pm 0.2\%$ en el d0, de 4.5 ± 0.2 en el d4 y de 6.0 ± 0.2 en el d8.

Es conocido que los sustratos pierden MS durante la FES (Hang *et al.*, 1981; Peñaloza *et al.*, 1985; Rolz *et al.*, 1986; Joshi y Sandhu, 1996; Rodríguez *et al.*, 2001b; Ruíz *et al.*, 2002; Calderón *et al.*, 2005) provocando un incremento en la concentración relativa en BS de algunos componentes, como por ejemplo la fibra, proteína cruda (Rodríguez *et al.*, 2001b) y la concentración de cenizas (Peñaloza *et al.*, 1985; Joshi y Sandhu, 1996).

Ese efecto fue observado en el incremento de la concentración de Cen en los dos tratamientos de este trabajo. Esta variable puede funcionar como un indicador de la pérdida de materia orgánica en el proceso de obtención de la manzarina, esto puede servir para medir el rendimiento. Según la NRC (2001), el BM puede llegar a tener hasta un 35.9% de MS y 2.6% de Cen (BS) y según Anrique y Viveros (2002), puede llegar a tener 9.7% de MS y 2.2% de Cen (BS); en este trabajo el BM utilizado tuvo un 18.26% (d0) de MS; según USDA (2007), la manzana puede llegar a tener 14.4% de MS y 1.3% de Cen (BS); según la FAO/LATINFOODS (2002), la manzana puede llegar a tener 14.9% de MS y 2.0% de Cen (BS); lo anterior permite observar que en general, el BM tiene más MS y Cen que la manzana. Una alta concentración de Cen en el d0, es resultado de la adición de minerales para el proceso de la FES.

Pérdida de Materia Seca Debida al Proceso de FES (ConsMS)

Hay pérdida de MS de los sustratos durante su FES (Hang *et al.*, 1981; Peñalosa *et al.*, 1985; Rolz *et al.*, 1986; Joshi y Sandhu, 1996; Rodríguez *et al.*, 2001b; Ruíz *et al.*, 2002; Calderón *et al.*, 2005); esto se debe al uso de carbohidratos fermentables como fuente de energía para el crecimiento de los microorganismos durante la FES, la metabolización de los carbohidratos, producen agua, bióxido de carbono y compuestos solubles o volátiles (Rodríguez *et al.*, 2001b).

Esta variable, mostró un comportamiento cuártico ($P<0.01$), con diferencia ($P<0.01$) entre tratamientos. El estimado de pérdida de materia seca durante la FES en t1 fue de 21.2% en el d4 ($100-78.8\pm 1.4\%$), de $42.0\pm 1.4\%$ en el d8 y de $49.6\pm 1.4\%$ en el d16. En t2 fue de 20.7 \pm 2.3% en el d4 ($100-79.3\pm 2.3\%$), de $41.5\pm 2.4\%$ en el d8 y de $49.1\pm 2.4\%$ en el d16.

El consumo de componentes de la MS y su consecuente producción de agua, compuestos líquidos y de algunos gases, explica la pérdida de MS de los sustratos. A pesar de la pérdida de peso, la producción de compuestos líquidos durante la FES explica porque la humedad de los sustratos, no disminuyó durante los primeros 8 d de FES.

Joshi y Sandhu (1996) encontraron que el BM puede sufrir una pérdida de MS de 35 a 46% en un periodo de fermentación de 96 h. Hang *et al.*, (1981), encontraron que en la FES de BM, su contenido de carbohidratos fermentables disminuyó, produciendo etanol.

Cantidad de Levaduras Viables Totales en el Sustrato (CL)

Un aspecto importante de la manzarina de BM como alimento, es la cantidad de levaduras que puede aportar. Esta variable, se incrementó ($P<0.025$) cúbicamente y de manera distinta entre tratamientos.

La CL de t1, se incrementó ($P < 0.025$) de 2.36×10^9 (d0) a 2.84×10^{10} ufc*g⁻¹ MS (d8). En t2, la CL se incrementó ($P < 0.025$) de 1.84×10^9 (d0) a 9.13×10^9 ufc*g⁻¹ MS (d4), la CL en el d8 fue de 3.18×10^9 ufc*g⁻¹ MS. Después de alcanzar esos valores, la CL en ambos tratamientos comenzó a decrecer ($P < 0.025$). Cierta tipo de cultivos de levaduras vivas pueden mejorar la producción láctea al ofrecerlas como parte de la dieta (Putnam *et al.*, 1997; Wohlt *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2001; Bitencourt *et al.*, 2008).

En dietas para cerdos, cierto tipo de levaduras vivas y algunos productos obtenidos de las levaduras, ejercen un efecto de modulación y estabilización de la cantidad de microorganismos patógenos en el intestino (Walker *et al.*, 2008; Weedman *et al.*, 2008), existiendo la posibilidad de incrementar su productividad (Kim *et al.*, 2008). Si la cantidad y tipo de levaduras contenidas en la manjarina obtenida a partir de BM como sustrato, pudieran ejercer algún efecto como los mencionados, existe la posibilidad de que este producto fermentado se use como un aditivo alimentario para rumiantes y monogástricos, previa ejecución de los trabajos de investigación necesarios para probar esto.

pH

El pH es una condición química que refleja la concentración de productos acidificantes o alcalinizantes en un medio. Esta variable, mostró un comportamiento cuártico y distinto ($P < 0.01$) entre tratamientos. Del d0 al d4, el pH se incrementó ($P < 0.01$) en ambos tratamientos, en t1 el incremento fue de 3.4 ± 0.1 a 9.4 ± 0.1 , en t2, el incremento fue de 3.6 ± 0.1 a 9.6 ± 0.2 según los estimados, posterior a este incremento, el pH de los dos sustratos descendió ($P < 0.01$) hasta alcanzar un pH neutro en el d16 de la FES.

El pH alto se relaciona con la producción de NH₃ y con una baja producción de ácidos orgánicos (Eliás *et al.*, 2001; Rodríguez *et al.*, 2001b), su incremento, coincide con el incremento del total de aminoácidos y productos alcalinizantes (Peñaloza *et al.*, 1985). En FES de mezclas de bagazo de caña

y boniato, Rodríguez *et al.*, (2001b), observaron que el pH se incrementó después de 72 h de FES; en este caso, presentó un marcado incremento, indicando producción de NH₃ y proteína verdadera.

Concentración de Amoníaco (NH₃)

El NH₃ se produce en la FES debido a la actividad ureolítica de algunos microorganismos. En base húmeda, se observó que esta variable se comportó de manera cuártica y distinta ($P < 0.01$) entre tratamientos.

En t2, los valores estimados fueron de $1.19 \pm 0.38 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ en el d0, $1.03 \pm 0.54 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ en el d1, $2.13 \pm 0.61 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ en el d2 y $5.24 \pm 0.61 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ en el d4. Posterior a esto, el NH₃ descendió ($P < 0.01$) del d4 al d8 y nuevamente se incrementó del d8 al d16.

En BS, el NH₃ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ MS), se comportó de una manera distinta y cuártica ($P < 0.01$; fluctuante) en los diferentes sustratos. Con base en la proporción de este compuesto en base seca son más claras las diferencias en la concentración entre tratamientos. En t1, el NH₃ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ MS), se incrementó de 5.48 ± 0.94 (d1) a 30.11 ± 1.29 (d4), posteriormente descendió hasta llegar a 19.05 ± 1.30 (d8). En t2, el NH₃ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ MS), se incrementó de 6.56 ± 2.00 (d1) a 31.20 ± 2.27 (d4), posteriormente descendió hasta llegar a 20.14 ± 2.32 (d8).

La urea añadida a los sustratos en procesos de FES, es transformada a NH₃ por efecto de microorganismos ureolíticos (Valiño *et al.*, 2002; Calderón *et al.*, 2005); si las características del sustrato lo permiten, hay retención del NH₃ producido (Rodríguez *et al.*, 2001a), los microorganismos que lo utilizan, pueden no ser los mismos que hidrolizan la urea (Valiño *et al.*, 2002).

Es importante señalar que en el t1, los incrementos de pH coinciden con el incremento del NH₃ y con una mayor cantidad de levaduras, al parecer, la disponibilidad de NH₃ en el sustrato, puede llegar a facilitar el desarrollo de las levaduras. Las levaduras son capaces de captar NH₃, produciendo como resultado proteína unicelular (Calderón *et al.*, 2005), sin embargo, no todo el NH₃ producido es utilizado,

debido a que su producción es más rápida que su asimilación, permitiendo que una parte se pierda en el ambiente (Rodríguez *et al.*, 2001a).

El NH_3 se incrementó ($P<0.001$) del d1 al d4 de la FES en en ambos tratamientos, en el t1, los valores estimados fueron $1.22\pm 0.35 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ en el d0, $1.06\pm 0.25 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ en el d1, $2.16\pm 0.27 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ en el d2 y $5.27\pm 0.35 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ en el d4.

Concentración de Ácido Láctico (AcL)

La presencia de ácido láctico en los procesos fermentativos, indica la presencia de microorganismos productores de ácido láctico y de condiciones de anaerobiosis. En base húmeda, la concentración de AcL ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$), tuvo un comportamiento cuártico ($P<0.01$; fluctuante). No hubo diferencia ($P>0.05$) entre tratamientos. El AcL, disminuyó ($P<0.01$) del d0 ($2.73\pm 0.2 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$) al d2 (0.74 ± 0.2), posteriormente se mantuvo bajo con ligeras fluctuaciones.

Al analizar esta variable en bse seca (BS), se puede observar que su comportamiento cuártico ($P<0.01$) se mantiene; así también, se observa una diferencia ($P<0.05$) entre tratamientos, mostrando que, según los estimados, la concentración de AcL en BS ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ MS) es mayor en la FES del sustrato de t2. En t1, la concentración de AcL en BS, disminuyó de $15.0\pm 0.8 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ MS (d0) a $4.1\pm 0.7 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ MS (d2), al d8 de fermentación, llegó a $2.8\pm 0.9 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ MS. En t2, la concentración de AcL en BS, disminuyó de $17.9\pm 0.9 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ MS (d0) a $7.0\pm 1.5 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ MS (d2), al d8 de fermentación, llegó a $5.7\pm 1.5 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ MS.

El AcL es un producto del catabolismo de los carbohidratos (Rodríguez *et al.*, 2001a), es el mejor indicador de la fermentación de forrajes en condiciones anaerobias (Madrid *et al.*, 1999) y es un producto común en el ensilaje de BM, la presencia de este ácido en una cantidad alta en el d0 de FES en los sustratos, pudo ser resultado de la consistencia pastosa del BM utilizado, esta característica, junto con la disponibilidad de carbohidratos fermentables y una alta carga de microorganismos

presentes de manera normal en este subproducto, causan la formación de Acl desde el momento en el que el BM es producido hasta el momento en el que es utilizado (Anrique y Viveros, 2002).

La incorporación de oxígeno por el movimiento del sustrato, elimina las condiciones de anaerobiosis y por lo tanto impide la producción de Acl, pero la marcada y rápida disminución de su concentración en los sustratos evaluados en este trabajo, podría deberse a su uso y fermentación secundaria por parte de algunos de los microorganismos presentes (Anrique y Viveros, 2002; Rodríguez *et al.*, 2001a). Van Soest *et al.*, (1982), menciona que en algunas reacciones del metabolismo aerobio, el Acl y otros componentes, son metabolizados a CO₂ y agua, generando a la vez una alta producción de calor; este tipo de reacciones, pudieron haber causado la marcada disminución de Acl.

Parece ser, que al agregar MD al BM para incrementar la proporción de carbohidratos fermentables, puede originar la producción de Acl, antes y durante ciertos momentos de la FES (del d1 al d2), esto podría ser resultado de una alta disponibilidad de carbohidratos fermentables aportados por la MD, en combinación con una amplia diversidad de microorganismos presentes en el BM.

Concentración de Ácidos Grasos Volátiles (AGV's)

Los ácidos orgánicos, son productos de excreción de algunos microorganismos involucrados en fermentaciones anaerobias. La concentración de ácido acético fue diferente ($P<0.01$) entre tratamientos, la concentración tuvo una tendencia cuadrática. La concentración de C2 (mg^*g^{-1} de MS) en el sustrato de t1 fue alta en el d0 (29.2 ± 1.4).

La concentración de C2 en el sustrato de t1, disminuyó ($P<0.01$) hasta llegar a $0 \text{ mg}^*\text{g}^{-1}$ MS del d0 al d2 y posteriormente se produjo más de este ácido hasta llegar a $13.6\pm 1.4 \text{ mg}^*\text{g}^{-1}$ MS en el d4, según los estimados. En t2, este ácido disminuyó ($P<0.01$) del d0 ($8.5\pm 1.5 \text{ mg}^*\text{g}^{-1}$ MS) al d1 ($0 \text{ mg}^*\text{g}^{-1}$ MS) y no se volvió a producir.

La concentración de ácido propiónico (C3), se tuvo un comportamiento cúbico distinto ($P<0.05$) en los dos sustratos. Del d0 al d1, el C3 se incrementó ($P<0.05$), posteriormente descendió ($P<0.05$) del d0 al d2 y se mantuvo bajo. En t1, las concentraciones de C3 ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ MS) fueron de 0.6 ± 0.3 en el d0, 1.8 ± 0.4 en el d1 y 0.3 ± 0.4 en el d2. En t2, las concentraciones de C3 ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ MS) fueron de 0.7 ± 0.2 en el d0, 1.9 ± 0.5 en el d1 y 0.4 ± 0.5 en el d2.

El ácido butírico (C4), mostró un comportamiento cúbico ($P<0.01$). La cantidad de C4 ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ MS) fue baja, se incrementó ($P<0.01$) en ambos tratamientos del d0 al d1 y posteriormente disminuyó ($P<0.01$). No se encontró diferencia ($P>0.05$) entre tratamientos.

Los AGV's son un producto de desecho de algunos microorganismos en condiciones anaerobias (Van Soest, 1982); en la FES de mezclas de caña de azúcar y boniato, puede haber producción de C2 y sus niveles pueden ser fluctuantes durante el proceso; también puede haber presencia de C3 en concentraciones muy bajas, este último puede desaparecer después de 48 h de FES (Rodríguez *et al.*, 2001a); en este trabajo, sucedió algo similar, hubo presencia de C2 y C3; la concentración de C2 fue fluctuante y la concentración de C3 fue baja y disminuyó a partir de las 24 h de FES, encontrando además, pequeñas cantidades de C4.

La disminución de C2 y los incrementos de C3 y C4 del d0 al d1 de la FES de los sustratos de t1 y de t2, coinciden con la disminución de AcL. Van Soest (1982), describe que en ciertas reacciones químicas presentes en los procesos metabólicos, se pueden producir C3 y C4 a partir del AcL. El proceso evaluado en este trabajo es en condiciones aerobias, esto explica que las cantidades detectadas de C3 y C4 durante el proceso hayan sido bajas.

En el desarrollo de fermentaciones no lácticas, si hay AcL y C2 disponibles, se pueden producir C4, CO₂ y H₂. El C3 puede formarse a partir del lactato, el cual es la forma ionizada del AcL (Van Soest, 1982). Basándose en lo descrito por Van Soest (1982) y considerando que en la FES de algunos

sustratos puede haber una gran diversidad de especies de microorganismos (Valiño *et al.*, 2002), se puede explicar que debido a la incorporación de oxígeno en la FES en este trabajo, la disminución del Acl y el C2 en los sustratos, se debió a que fueron utilizados como fuentes de energía en rutas del metabolismo de microorganismos aerobios presentes en el proceso. Cierta cantidad de esos ácidos fue metabolizada a C3 y C4, debido a la presencia de microorganismos anaerobios.

La disminución de C3 y C4 después de 24 h de FES, pudo deberse a que también se utilizaron como fuentes de energía (Van Soest, 1982). El incremento de C2 durante la FES del t1 (del d2 al d4), pudo ser resultado de diferentes procesos, como el de la metabolización de aminoácidos por bacterias clostrídicas o el de la metabolización de hexosas, pentosas y/o ácidos orgánicos por acción de bacterias heterolácticas, homolácticas, enterobacterias y/o levaduras (Ojeda *et al.*, 1987).

Para conocer de manera concreta que especies de microorganismos fueron responsables de estos cambios, es necesario realizar un análisis microbiológico detallado de la dinámica de las principales poblaciones de bacterias, hongos y levaduras que actúan en la FES del BM, durante el proceso de obtención de manzanarina.

Porcentaje de Proteína Cruda (PC)

La PC representa la concentración de nitrógeno de fuentes proteicas y no proteicas en los alimentos. Esta variable, se comportó de manera cuártica ($P < 0.02$) y diferente entre tratamientos. En t1, la concentración de PC (%), disminuyó ($P < 0.02$) del d1 ($25.0 \pm 0.8\%$) al d4 ($14.9 \pm 0.8\%$) de la FES, posteriormente se incrementó ($P < 0.02$) del d4 al d16 ($25.5 \pm 0.9\%$). En t2, la concentración de PC (%), disminuyó ($P < 0.02$) del d1 ($28.5 \pm 1.2\%$) al d4 ($17.5 \pm 1.4\%$) de la FES, posteriormente se incrementó ($P < 0.02$) del d4 al d16 ($28.1 \pm 1.4\%$). El alto valor de PC en ambos tratamientos en el d0, se debe al aporte de nitrógeno no proteico (NNP) de la urea y el sulfato de amonio agregados a los sustratos.

La disminución de PC coincidió con los incrementos de NH₃. La urea, se transforma a NH₃ (Valiño *et al.*, 2002; Calderón *et al.*, 2005), Rodríguez *et al.*, (2001b) mencionan que no todo el NH₃ producido es utilizado y su producción, es más rápida que su asimilación para síntesis de aminoácidos, esto permite que en algunos casos se pierda algo de NNP en el ambiente, debido a la volatilización del NH₃. Es posible que esto haya sucedido en ambos sustratos, explicando las disminuciones de PC.

El incremento en la concentración de PC, se puede explicar debido la pérdida de MS lo que provoca que, como sucede con las cenizas y otros componentes se presente un incremento relativo (Rodríguez *et al.*, 2001a).

Porcentaje de Proteína Verdadera (PV)

La PV es un indicador importante de la síntesis microbiana. Esta variable mostró un incremento lineal con una interacción ($P<0.05$) del efecto de tratamiento por el día de FES. La concentración de PV en BS se incrementó ($P<0.05$) en los dos tratamientos de manera paulatina del d0 ($6.92\pm 0.99\%$ en t1 y $8.52\pm 0.99\%$ en t2), al d16 ($23.60\pm 0.99\%$ en t1 y $18.12\pm 0.99\%$ en t2); solo se encontró diferencia ($P<0.05$) entre tratamientos en el d16 de FES.

Las concentraciones de PV en BS en el d8 de FES fueron de $15.53\pm 0.99\%$ en t1 y $12.86\pm 0.99\%$ en t2. La PV se incrementa en la FES de diferentes tipos de sustratos (Peñalosa *et al.*, 1985; Rodríguez *et al.*, 2001b; Ibarra *et al.*, 2002), este parámetro es el indicador más importante de la síntesis microbiana (Rodríguez *et al.*, 2001a) y está relacionado con el desarrollo de los microorganismos (Rodríguez *et al.*, 2001b).

Al parecer, una mayor disponibilidad de carbohidratos fermentables en el BM, resultado de la adición de MD molida en sustitución parcial del BM como sustrato, no produce un efecto que permita obtener un incremento mayor de la cantidad de PV, reflejando que la síntesis microbiana de proteína, puede ser similar en la FES de los sustratos evaluados.

Proporción de PV (PV/PC)

La proporción de PV/PC en la FES, puede indicar que proporción del nitrógeno en un alimento, proviene de fuentes principalmente orgánicas. Esta variable, mostró un comportamiento cuártico ($P<0.05$) sin diferencia ($P>0.05$) entre tratamientos. La proporción PV/PC se incrementó ($P<0.05$) en ambos tratamientos, este incremento fue marcado del d0 al d4 de la FES y paulatino del d0 al d16. Según los valores estimados, en el d4, la proporción de PV/PC en t1 fue de 72.2 ± 4.1 y en t2 fue de 74.7 ± 6.8 . En el d8, la proporción de PV/PC llegó a $79.9\pm 4.1\%$ en t1 y a $82.4\pm 6.9\%$ en t2.

En las condiciones de este experimento, entre las 96 (d4) y 192 h (d8) de FES, se alcanza un valor de PV/PC alto, con una concentración de levaduras mayor en el sustrato de t1 (BM). Sin embargo la concentración de PV es similar en los sustratos evaluados. A partir de las 96 h existe el riesgo de desarrollo de poblaciones de bacterias no deseables, como lo indica el incremento de C2, esto puede ser resultado de un pH alto, la disminución de Acl y la disponibilidad de NH_3 .

Entre las bacterias no deseables, se encuentran algunas que pueden hidrolizar aminoácidos (Van Soest, 1982), es conocido que el pH bajo y el Acl son los que impiden el desarrollo de esas bacterias (Van Soest, 1982; Anrique y Viveros, 2002).

Porcentaje de Carbohidratos Estructurales (FDN y FDA)

En la FES, generalmente la principal fuente energética para los microorganismos proviene de los carbohidratos fácilmente fermentables, sin embargo puede haber cambios en la concentración de los carbohidratos estructurales. Sobre estas variables se observó un efecto ($P<0.05$) de interacción de tratamiento por día de FES. Del d0 al d8 de FES, las concentraciones de FDN y FDA disminuyeron ($P<0.05$) en el sustrato de BM (t1), mientras que en el sustrato de BM más MD (t2) se incrementaron ($P<0.05$; Cuadro 41).

Lo anterior indicó que una alta cantidad de carbohidratos estructurales fue degradada en el BM, durante su FES, mientras que en la FES de la combinación de BM más MD se observó un incremento de este tipo de carbohidratos debido a una pérdida de MS.

Valiño *et al.*, (2002) reportaron que en la FES de bagazo de caña de azúcar, existe una disminución en la concentración de FDN, esto debido al desarrollo de hongos celulolíticos del género *Aspergillus* y *Trichoderma*, situación que también incrementa el valor nutritivo del producto fermentado debido a la mejora en la digestibilidad de la fibra y el contenido de proteína fúngica.

García *et al.*, (2002), reportan la disminución de la pared celular debido a la FES de bagazo de caña de azúcar con *Trichoderma viride* y Peñaloza *et al.*, (1985) reporta una disminución de constituyentes de la pared celular en sustratos expuestos a FES con *Aspergillus niger*.

La relación que puede haber entre el desarrollo de hongos y la disminución de componentes de la pared celular, ha quedado demostrada en sustratos con alto contenido de carbohidratos estructurales lignificados (Reid, 1983; Reid 1985).

CUADRO 41. COMPORTAMIENTO DE FDN Y FDA EN LOS DOS TIPOS DE SUSTRATO DURANTE SU FES

Variable ¹	Día de Fermentación			
	d0		d8	
	t1 ²	t2 ²	t1 ²	t2 ²
FDN	55.81±0.79 ^a	45.07±0.79 ^b	28.59±0.79 ^a	61.45±0.79 ^b
FDA	40.52±0.52 ^a	31.97±0.52 ^b	24.67±0.52 ^a	48.82±0.52 ^b

¹ Porcentaje de la MS

² t1: BM 100.0%; t2: BM 66.6%, MD 33.4%

^{a, b} Literales distintas como superíndice, indican diferencia ($P < 0.05$) entre tratamientos (sustratos) en el d0 y en el d8 de FES

Rolz *et al.*, (1986), reportaron que los complejos lignificados pueden ser químicamente modificados en el procesos de FES, al inocular con hongos de raiz blanca. Los sustratos evaluados por ellos fueron, bagazo de zacate limón (*Cymbopogon citratus*) y de citronella (*Cymbopogon winterianus*). Digestibilidad de la Materia Seca in vitro (DIVMS).

La DIVMS es un análisis muy importante para la evaluación de los alimentos. Sobre esta variable, se encontró un efecto ($P<0.05$) de tratamiento y un efecto ($P<0.05$) del día de FES pero no de su interacción (Cuadro 42). El sustrato de t1, tuvo en promedio una menor ($P<0.05$) digestibilidad que el sustrato de t2. Los sustratos en el d8, después del proceso de FES, tuvieron una menor ($P<0.05$) digestibilidad que antes de ser fermentados (d0). En el d0, las concentraciones de FDN y de FDA de t1 fueron mayores que las de t2; el contenido de fibra afecta la digestibilidad (Elías *et al.*, 2001) y produce una menor degradabilidad efectiva (Anrique y Viveros, 2002).

En el d8, la proporción de NNP en t1, fue menor que la de t2 según lo observado en la relación PV/PC, indicando que t2 tuvo una mayor cantidad de residuos de urea y sulfato de amonio, provenientes de las cantidades que fueron agregadas al inicio del proceso de FES.

Es conocido que el NNP proveniente de la urea y del sulfato de amonio, es altamente soluble (NRC, 2001), por consecuencia, en las pruebas de digestibilidad se deben haber detectado como 100% digestibles. Un mayor contenido de carbohidratos estructurales en el d0 y una menor proporción de NNP en el d8 de t1 con respecto a t2, podrían explicar la menor digestibilidad en t1. El BM y la MD, pueden tener una proporción alta de carbohidratos no estructurales como se puede deducir de la composición química publicada en trabajos como el de Joshi y Sandhu (1996) y el de USDA (2007), este tipo de carbohidratos pueden ser altamente digestibles (NRC, 2001) y su concentración disminuye en los procesos de fermentación anaerobios (NRC, 2001) y en FES (Joshi y Sandhu, 1996; Rodríguez *et al.*, 2001b).

CUADRO 42. DIGESTIBILIDAD DE LA MATERIA SECA *in vitro* EN LOS DOS TIPOS DE SUSTRATO DURANTE SU FES

Tratamiento	Día de Fermentación		Promedio
	d0	d8	
t1 (BM 100.0%)	87.95±0.40	81.21±0.40	84.58±0.29 ^a
t2 (BM 66.6%, MD 33.4%)	90.37±0.40	84.82±0.40	87.59±0.29 ^b
Promedio	89.16±0.28 ^c	83.02±0.28 ^d	---

^{a, b} Literales distintas como superíndice, indican diferencia (P<0.05) entre tratamientos (t1 vs. t2)

^{c, d} Literales distintas como superíndice, indican diferencia (P<0.05) entre días (d0 vs. d8 de FES)

De manera similar a como se observó en el t1 vs. el t2 en el d8 de FES, el promedio de la proporción de PV/PC de los sustratos, en el d0, fue menor que el promedio de esta proporción en el d8, indicando que los sustratos fermentados en el d0 tuvieron una cantidad mucho mayor de NNP que los sustratos fermentados en el d8, puesto que ese NNP es proveniente de la urea y sulfato de amonio agregados y debido a que son altamente solubles (NRC, 2001), se puede sugerir que la mayor digestibilidad en el d0 con respecto a la digestibilidad del d8, se debió al contenido de urea y sulfato de amonio.

Producción de Gas (PG) *in vitro*

La técnica de PG *in vitro* permite evaluar los alimentos de manera rápida, económica y simula lo que puede suceder con un alimento en el rumen. Se encontró diferencia ($P < 0.05$) en el perfil de PG *in vitro* debido al efecto de tratamiento y al efecto de la FES. El perfil de PG de las muestras de sustrato no fermentado (d0) comparadas con el perfil de PG de las muestras de sustrato fermentado (d8) fue diferente ($P < 0.05$). No hubo efecto ($P > 0.05$) de la interacción de tratamiento por día de FES.

Los contrastes realizados en el análisis indican que la evolución de la PG *in vitro* de los sustratos (t1 vs. t2), se presentó de manera paralela ($P > 0.05$), esto indica que su diferencia ($P < 0.05$) radica en la cantidad producida de gas; pero no en la forma del perfil de PG. En cambio, la evolución de la PG *in vitro* de los sustratos antes de ser expuestos a FES (d0) vs. la evolución de la PG *in vitro* de los sustratos después del proceso de FES (d8), no es paralela ($P < 0.05$), esto indica que la velocidad de fermentación y la cantidad de gas producida fue diferente ($P < 0.05$) debido las características físico químicas de las muestras, las cuales influyen en la fermentación ruminal (Fondevila y Barrios, 2001).

A las 48 h de fermentación ruminal *in vitro* (Menke y Steingass, 1988), la PG de las muestras de sustrato de BM (t1) del d0 de FES, fue $49.13 \pm 2.22 \text{ ml} \cdot 0.2 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$; la PG de las muestras de sustrato de BM (t1) del d8 fue, $42.09 \pm 2.03 \text{ ml} \cdot 0.2 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$; la PG de las muestras de sustrato de BM más MD (t2) del d0, fue $48.81 \pm 2.03 \text{ ml} \cdot 0.2 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$ y la PG de las muestras de sustrato de BM más MD (t2) del d8, fue $39.48 \pm 2.03 \text{ ml} \cdot 0.2 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$.

La PG de las muestras fermentadas fue menor ($P < 0.05$) que el de las muestras no fermentadas, además del contenido de PC en las muestras fermentadas, la PG debe haber sido influenciada por la disponibilidad de carbohidratos estructurales, no estructurales y la alta cantidad de urea y sulfato de amonio (NNP) en las muestras del d0, ya que el NNP estimula la degradación de carbohidratos estructurales (NRC, 2001), esto aunado a la disponibilidad de carbohidratos no estructurales, los cuales son de rápidamente fermentados en el rumen.

Parámetros de Fermentación Ruminal *in vitro* (Parámetros A, B, C)

Los parámetros de fermentación ruminal permiten realizar inferencias sobre como los microorganismos ruminales utilizan los carbohidratos estructurales de los alimentos. La evolución de la PG *in vitro* de las muestras analizadas, mostró un ajuste ($P < 0.01$) adecuado al modelo matemático de Groot *et al.*, (1996). Los parámetros A, B y C y sus definiciones se muestran en el (Cuadro 43).

De acuerdo a los parámetros B (tiempo en horas en los que se presenta la mitad de la PG asintótica *in vitro*) y C (forma de la curva formada por la evolución de la PG), la velocidad de fermentación ruminal de las muestras de manzarina (muestras de sustrato fermentado, d8) es más lento que la fermentación ruminal de las muestras de BM (t1) y BM más MD (t2) no fermentadas (d0). Esto fue resultado de la diferencia en la composición química de las muestras fermentadas en comparación con las muestras no fermentadas, ya que, como se explicó anteriormente esto influye en como un alimento se puede fermentar en el rumen.

CUADRO 43. PARÁMETROS DE FERMENTACIÓN RUMINAL *in vitro* DE LAS MUESTRAS EVALUADAS

Parámetros ¹	Día de Fermentación			
	d0		d8	
	t1 ²	t2 ²	t1 ²	t2 ²
A ³ (ml*0.2 g ⁻¹ MS)	56.06±3.58	59.63±7.39	87.23±41.99	53.65±4.67
B ⁴ (h)	15.60±1.59	17.74±3.71	49.74±39.65	25.99±3.15
C ⁵	1.71±0.18	1.50±0.24	1.14±0.23	1.71±0.14

¹ Calculados con el modelo matemático de Groot *et al.*, (1996) y los datos de la PG obtenidos de la aplicación de la técnica de Menke y Steingass, (1988)

² t1: BM 100.0%; t2: BM 66.6%, MD 33.4%

³ Indica la asíntota de PG, en otras palabras la cantidad máxima de PG

⁴ Indica el tiempo en el que se presenta la mitad de la PG asíntótica

⁵ Indica cual es la forma del perfil de PG; Si C es < 1, el perfil tiene forma de parábola y Si C es ≥ 1, el perfil tiene forma sigmoidea

La PG *in vitro* de las muestras de manzarina de t1, puede tener una variabilidad alta en la velocidad de fermentación (parámetro B) y la cantidad de PG (parámetro A), para evaluar estos parámetros, posiblemente se necesite un mayor número de observaciones, sin embargo en general se puede apreciar que la PG fue más lenta en la manzarina (muestras del d8) que en las muestras de sustrato no fermentado y el perfil de PG de las muestras de manzarina de t1, puede ser paralelo al perfil de PG que se genera en las muestras de manzarina de t2.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En la manzanarina obtenida a partir de BM como sustrato, hay más levaduras viables totales que en la manzanarina obtenida de combinaciones de BM más MD. En la FES del BM hay disminución en la concentración de FDN y FDA.

La FES del BM o de la combinación de BM más MD para producción de manzanarina, debe detenerse entre las 96 y 192 h. En este punto el producto posee concentraciones altas de PV y de levaduras.

La adición de MD en sustitución parcial del BM como sustrato para preparar manzanarina, implica mayor costo en tiempo, manejo y dinero y no favorece la obtención de una mayor concentración de PV. Se encontró que la digestibilidad y la fermentación ruminal in vitro de la manzanarina fueron menores que los valores observados en los sustratos no fermentados, esto no es un resultado negativo, puesto que la manzanarina tiene un mayor contenido de PV.

A las 96 h de FES la pérdida de MS debida al consumo de carbohidratos como fuente de energía para el desarrollo de los microorganismos durante el proceso de obtención de manzanarina, fue de un 21.2% y de un 42.0% a las 192 h, usando BM como principal componente del sustrato, esta pérdida no es afectada por la adición de MD al sustrato.

Se recomienda evaluar cuales son las principales especies de bacterias, hongos y levaduras que intervienen el proceso de FES del BM. Se recomienda evaluar las condiciones de este producto fermentado como aditivo en la alimentación animal.

CAPITULO 11. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN PLASMA, PARÁMETROS
SANGUÍNEOS Y DESARROLLO DEL EPITELIO RUMINAL DE OVINOS
ENGORDADOS CON UNA DIETA CON MANZARINA

Héctor Esteban Rodríguez Ramírez

RESUMEN

Existe la posibilidad de que la manzanina (Mzn) conserve las propiedades benéficas que tiene la manzana como alimento, además de aportar una cantidad alta de levaduras. Este trabajo se realizó con el objetivo de conocer si la adición de Mzn a la dieta tiene influencia sobre la actividad antioxidante (AA) del plasma, los componentes sanguíneos o sobre el desarrollo del epitelio ruminal de borregos en engorda, para esto, se utilizaron 12 machos (promedios de peso y edad, 25.5 kg y 148 d) y 12 hembras (promedios de peso y edad, 25.3 kg y 146 d). Los animales permanecieron en jaulas individuales. 6 hembras (H) y 6 machos (M) se alimentaron con una dieta con ~10% de Mzn (t1), 6 H y 6 M recibieron una dieta sin Mzn (t2), todos los animales recibieron agua y alimento ad libitum. Se tomaron muestras sanguíneas de cada animal el 31 de Julio (1), el 30 de Agosto (2) y el 26 de Septiembre (3) de 2007; una de las muestras se usó para medir AA (técnica FRAP), una segunda muestra se utilizó para obtener una biometría hemática (BH). Los animales se sacrificaron el 4 y 5 de Octubre de 2007, en ese momento se tomaron muestras de tejido ruminal para medir el largo (LP) y ancho (AP) de las papilas. Los valores logarítmicos de la AA y de los datos de la BH se analizaron con un modelo mixto (MIXED del SAS 9.0, instrucción REPEATED), usando como efectos fijos, tratamiento (tr), sexo y su interacción, el muestreo (1,2 o 3) se usó como covariable para evaluar la tendencia cuadrática. El LP y AP se analizaron con un modelo jerárquico, con los efectos de tr, sexo, su interacción y área ruminal de muestreo anidada en la interacción de tr por sexo. La AA en H de t1 (56.8 ± 1.8 mM Fe₂, muestreo 3) y M de t2 (63.6 ± 1.6 mM Fe₂) fue mayor ($P < 0.025$) que en H de t2 (44.3 ± 1.6 mM Fe₂) y M de t1 (31.9 ± 1.2 mM Fe₂). En el muestreo 2, la proporción de linfocitos en H de t2 ($97.0 \pm 1.4\%$) fue la mayor ($P < 0.05$), los M de t1 tuvieron $75.0 \pm 1.4\%$, las H de t1 $66.0 \pm 1.0\%$ y los M de t2 $68.1 \pm 1.6\%$. La proporción de eosinófilos en animales de t2 se incrementó ($P < 0.05$) del muestreo 1 ($1.2 \pm 2.6\%$) al 2 ($15.9 \pm 2.8\%$; en muestreo 3 tuvieron $15.2 \pm 2.8\%$) y fue mayor ($P < 0.05$) que en los animales de t1 en los muestreos 2 (t1,

2.2±1.1%) y 3 (t1, 2.1±1.0%). El volumen corpuscular medio (VCM) en t1 fue mayor (P<0.025) que en t2 (VCM=32.5±1.0, 33.0±1.0 y 33.1±1.0 fL en t1; 30.7±1.0, 31.2±1.0 y 31.3±1.0 fL en t2; muestreos 1, 2 y 3). El LP fue mayor (P<0.01) en M de t1 (3.04±0.07 mm), los M de t2 tuvieron 2.43±0.05 mm. El AP en t1 fue mayor (P<0.01) que en t2 (1.99±0.02 vs. 1.90±0.02 mm). La dieta con Mzn favorece la AA en ovejas, el desarrollo del epitelio ruminal y tiene influencia sobre la concentración proporcional de leucocitos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción de los Animales y Tratamientos

Se utilizaron dos tratamientos (t) para evaluar el efecto de la adición de manzarina como parte de la dieta, las variables medidas fueron la actividad antioxidante en plasma sanguíneo, algunos parámetros sanguíneos obtenidos por una biometría hemática y el largo y ancho de las papilas ruminales para observar el desarrollo del epitelio ruminal de borregos en engorda.

Se utilizaron 24 ovinos (12 machos y 12 hembras); al inicio de la evaluación (27 de Julio de 2012), los machos (M) tuvieron un peso de 25.5 ± 3.3 kg y una edad de 148.0 ± 9.5 d; las hembras (H) tuvieron un peso de 25.3 ± 2.9 kg y una edad de 146.0 ± 6.2 d. Los animales utilizados eran híbridos provenientes de cruza Charolais*(Katahdin*Dorper) como raza paterna y materna respectivamente; los borregos, se agruparon por sexo y posteriormente asignaron al azar en dos tratamientos, quedando dos grupos de machos (M) y dos grupos de hembras (H) de seis animales cada uno. Durante el periodo de evaluación, los animales permanecieron en jaulas individuales.

El tratamiento uno (t1) consistió en la engorda de 6 M y 6 H con una dieta preparada que incluyó manzarina; el tratamiento dos (t2) consistió en la engorda de 6 machos y 6 hembras con una dieta preparada con ingredientes comúnmente utilizados sin manzarina. Las dietas se describen en el (Cuadro 44). El criterio utilizado para la introducción de la manzarina fue la sustitución de alfalfa y soya en la dieta como proteicos sin disminuir la proporción de grano en la dieta para procurar tener un nivel energético alto y el reto de mantener un pH relativamente bajo en el rumen.

CUADRO 44. COMPOSICIÓN DE LAS DIETAS UTILIZADAS

Composición	Tratamiento	
	t1 (con manzarina)	t2 (sin manzarina)
<i>Ingredientes</i>		
Alfalfa	28.72	38.43
Soya	9.41	12.44
Maíz rolado	43.34	42.54
Manzarina	10.91	0.00
Grasa animal	2.29	1.98
Melaza	3.61	3.12
Sal	0.76	0.66
Premezcla mineral	0.95	0.82
Total	100.00	100.00
<i>Parámetros químicos*</i>		
MS	91.32	90.59
PC	11.43	11.44
EE	6.43	5.76
FDN	23.84	21.45
FDA	13.17	10.81
FC	20.0	15.0
Cen	7.31	7.23

* Porcentajes calculados de MS: PC.- proteína cruda; EE.- extracto etéreo; FDN.- fibra detergente neutro; FDA.- fibra detergente ácido; FC.- fibra cruda; Cen.- cenizas

Preparación de la Manzarina

Antes de obtener los animales para el experimento, la manzarina se preparó siguiendo las indicaciones previamente descritas por Becerra (2006); para esto, se obtuvo bagazo de manzana de la planta CONFRUTTA en Álvaro Obregón, localidad ubicada a aproximadamente 150 km de la ciudad de Chihuahua. El bagazo de manzana fue trasladado a las instalaciones de la Facultad de Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua.

La FES se llevó a cabo sobre una superficie de concreto expuesto a las condiciones ambientales; al momento de iniciar el proceso, se agregaron como ingredientes nutritivos, un 1.5% de urea, 0.4% de sulfato de amonio y un 0.5% de una mezcla comercial de minerales en el bagazo de manzana en función a su peso en base húmeda, para potencializar el crecimiento de microorganismos, el procedimiento se ha hecho en base a lo descrito por Becerra (2006) y Díaz (2006), el proceso es similar al que se realiza para la obtención de Saccharina descrito por Elías *et al.*, (1990).

El bagazo más los ingredientes, se extendió sobre la superficie de concreto, buscando tener una cama de fermentación con alrededor de 25 cm de profundidad y 1.5 m de ancho, las dimensiones de la superficie de concreto permitieron tener camas de fermentación con aproximadamente 15 m de largo. Durante el proceso, del d0 al d6 de FES, el sustrato se mezcló tres veces diarias para incorporar oxígeno en la cama de fermentación. En el d6 del proceso, la cama se extendió sobre la superficie de concreto para deshidratarlo al sol y posteriormente almacenarlo, el producto obtenido se trituró en un molino para forraje antes de utilizarse para la preparación de las dietas.

Manejo de los Animales

Los animales recibieron el siguiente manejo: después del destete, permanecieron en dos grupos en los corrales de las unidades de producción de la Facultad de Zootecnia y Ecología, UACH, donde diariamente recibieron una alimentación de ~300 g a-1 de alfalfa más 300 g a-1 de concentrado por un periodo de 30 d.

Al iniciar la evaluación, (27 de Julio de 2012), los animales se trasladaron a jaulas individuales, donde permanecieron hasta el momento de su sacrificio (4 y 5 de Octubre de 2012). Los animales recibieron un periodo de 5 d de adaptación a las dietas, el experimento se consideró iniciado a partir de la primera toma de muestras (31 de Julio de 2012). Las dietas se formularon con base en los datos de la NRC (1985) de ovinos, para obtener una ganancia de peso de 300 g d-1. Las dietas se balancearon isoproteica e isoenergéticamente. Los animales recibieron alimento y agua a libre acceso durante el periodo de evaluación.

Toma de Muestras

Los días 31 de Julio, 30 de Agosto y 26 de Septiembre de 2012, se colectaron dos muestras sanguíneas de cada borrego (vena yugular) antes de servir el alimento. Dichas muestras se extrajeron con tubos de vacío estériles (tubos Vacutainer® con 7.2 mg EDTA como anticoagulante, 4 ml de capacidad). Una de las muestras, se utilizó para determinar la actividad antioxidante en plasma (AA), con la otra se realizó una biometría hemática (BH). Las muestras de tejido ruminal, se tomaron el día del sacrificio de los animales (4 y 5 de Octubre de 2012).

Manejo de las Muestras

Muestras sanguíneas. Inmediatamente después de la toma de las muestras sanguíneas, los tubos con sangre y anticoagulante, se identificaron y se colocaron en un contenedor con hielo.

Determinación de la actividad antioxidante en plasma (AA). Las muestras, se trasladaron al laboratorio de nutrición animal de la Facultad de Zootecnia y Ecología, donde se centrifugaron a 2,700 g por 15 minutos, posterior a esto, el suero se decantó y el tubo con plasma se selló para conservar la muestra en congelación (-6 °C) hasta el momento del análisis. La AA se determinó en el plasma sanguíneo por el procedimiento desarrollado por Benzie y Strain (1996), el cual consiste en medir la habilidad del plasma para reducir el hierro o FRAP por sus siglas en inglés (Ferric Reductive Ability of Plasma). La técnica FRAP, se realiza por colorimetría, para este procedimiento, las muestras de plasma, se diluyeron en agua destilada y metanol (73.75% de agua, 25.00% de metanol y 1.25% de plasma).

El estándar utilizado para determinar la AA, se preparó con 0.0417 g de sulfato férrico (FeSO_4) diluido en 50 ml de metanol (CH_3OH), con este se prepararon soluciones de 0 (blanco), 0.04, 0.08, 0.12, 0.16 y 0.20 mM de Fe_2 . Las soluciones se diluyeron en agua (1:3, v/v) antes de ser analizadas. El procedimiento consiste en lo siguiente: se preparan cuatro soluciones, la solución (a) amortiguador acetato (3.1 g de acetato de sodio trihidratado más 16 ml de ácido acético glacial en 1 L de solución), esta solución debe permanecer almacenada a 4 °C; la solución (b) de ácido clorhídrico (HCl) 40 mM (1.46 ml de HCl concentrado en 1 L de solución), esta solución se puede almacenar a temperatura ambiente; la solución (c) TPTZ (0.031 g de reactivo 2, 4, 6 - Tris (2 - piridil) - 1, 3, 5 - triazine en 10 ml de solución HCl 40 mM), esta solución debe prepararse en el momento en el que se va a utilizar y la solución (d) de cloruro férrico 20 mM (0.054 g de $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 10 ml de solución), esta solución debe prepararse como máximo, un día antes de utilizarse si se puede almacenar en refrigeración, si no es así debe prepararse en el momento en el que se va a utilizar.

La solución FRAP o solución de trabajo, es una mezcla de las soluciones a, c y d en una relación 10:1:1 (v/v/v), esta se debe preparar en el momento en que se va a llevar a cabo el procedimiento y no se puede almacenar. Para el análisis, se mezclan 100 µl del estándar o de la muestra diluida en agua y metanol, más 2 ml de solución FRAP.

La absorbancia se mide 10 minutos después de mezclar la muestra con la solución de trabajo a una longitud de onda de 593 nm, en este trabajo, se utilizó un espectrofotómetro Coleman Junior® II modelo 6J20. Como blanco se utilizó una mezcla de metanol más agua en una relación 1:3 (v/v). Con los resultados de la absorbancia de las soluciones estándar con diferentes concentraciones de sulfato de hierro, se preparó la ecuación de predicción de la actividad reductiva del hierro (Fe_2), con esta ecuación y el porcentaje de dilución de las muestras en metanol, se calculó la actividad antioxidante por mililitro de plasma sanguíneo, los resultados se expresaron en milimolares equivalentes a Fe_2 (mM Fe_2).

Biometría hemática (BHem). Aiello y Mays (2000) indican que los análisis hematológicos arrojan resultados sobre la cantidad de componentes celulares sanguíneos (glóbulos rojos y blancos). La BHem muestra la cantidad de Leucocitos (Leu), la cantidad y porcentaje de Neutrófilos (Neu), Linfocitos (Lin), Monocitos (Mon), Eosinófilos (Eos), Basófilos (Bas) y Eritrocitos (Er); así también muestra la cantidad de Hemoglobina (Hem), el Volúmen Corpuscular Medio (VCM), la cantidad y concentración de Hemoglobina Corpuscular Media (HCM y CHCM), la cantidad de Plaquetas (Pl), el Volumen Plaquetario Medio (VPM) y el Hematocrito (Gallegos, 2007).

Las muestras sanguíneas utilizadas para la BHem, se trasladaron al laboratorio del centro de diagnóstico de la Clínica Universidad S. A. de C. V., la determinación de los componentes sanguíneos se realizó en un aparato Beckman Coulter® Ac•T 5diff AL.

Muestras de tejido ruminal. De cada animal, se tomaron cuatro muestras de tejido ruminal como se indica a continuación. Del lado derecho del rumen, después del sacrificio se realizó una disección de tejido de ~4 cm de las siguientes partes: de la parte dorsal caudal, muestra 2, de la parte ventral caudal, muestra 3, de la parte dorsal craneal y la muestra 4 se obtuvo de la parte ventral craneal del rumen.

Los residuos de contenido ruminal de las muestras se eliminaron con agua, después de limpiarlas, se colocaron en una solución de formol al 18% para su conservación; las muestras en formol permanecieron dentro de recipientes de polietileno de ~100 ml con tapadera e identificados hasta el momento de medir el largo y ancho de las papilas del tejido ruminal.

Al momento de medir las dimensiones de las papilas, las muestras se cortaron en tres partes, los cortes se realizaron horizontalmente tomando como referencia para la disección del tejido, el crecimiento horizontal de las papilas.

De cada corte, se eligieron tres papilas al azar para medir sus dimensiones (largo y ancho), en total se obtuvieron nueve observaciones por muestra, dando un total de 36 observaciones por animal. El largo y ancho de las papilas del epitelio estratificado del rumen (LP y AP), se midió con un calibrador mecánico de carátula tipo Vernier (SURTEK®), las medidas se registraron en milímetros; la resolución mínima de este tipo de herramientas es de 0.01 mm.

Las decisiones tomadas para esta parte de la evaluación, se llevaron a cabo con base en el procedimiento desarrollado por Lesmeister *et al.*, (2004), ellos dan indicaciones de los lugares, la cantidad de muestras y la cantidad de observaciones que se deben realizar para llevar a cabo este tipo de análisis.

Análisis Estadístico

Las variables de respuesta AA, Leu, Neu (%), Lin (%), Mon (%), Eos (%), Bas (%), Er (cantidad), Hto (%), VCM, HCM, CHCM y PI, se analizaron con un modelo mixto. Como efectos fijos se usaron el tratamiento (dieta), el sexo (Hembra o Macho) del animal y su interacción, el muestreo (primer, segundo y tercer muestreo), se utilizó como un efecto de covariable para evaluar la tendencia cuadrática o lineal de las variables a través del transcurso del tiempo, así como su interacción con los efectos fijos. Para el análisis de los datos, los valores observados de cada una de las variables anteriores, se convirtieron a su logaritmo natural para disminuir la magnitud de la varianza de los datos (SAS, 2002) a excepción del porcentaje de basófilos.

Los resultados del análisis de varianza, los estimados de las medias y del error estándar, se obtuvieron con el procedimiento MIXED a través del método de máxima verosimilitud del SAS 9.0, utilizando la instrucción REPEATED. El tipo de estructura de covarianzas fue no estructurado (TYPE=UN). Cada animal se utilizó como sujeto de análisis (SUBJECT) y se agruparon (GROUP) de acuerdo al efecto de la interacción de tratamiento y sexo (SAS, 2002).

Las variables de respuesta LP y AP, se evaluaron con un modelo jerárquico, como efectos se usaron tratamiento, sexo del animal, su interacción y el área de toma de muestra anidada en la interacción de tratamiento por sexo, esto último debido a que se esperaban diferencias en el desarrollo del epitelio en los diferentes lugares del rumen (Lesmeister *et al.*, 2004). Como covariables, se utilizaron la edad y el peso de los animales, debido a que tienen influencia sobre el desarrollo de este tejido (Heinrichs, 2005). Los resultados del análisis de varianza, medias, error estándar y comparaciones entre medias, se obtuvieron con el procedimiento GLM del SAS 9.0 (SAS, 2002).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Actividad Antioxidante en Plasma (AA)

La actividad antioxidante en plasma, refleja la resistencia que puede tener un organismo a un estado de estrés oxidativo y se puede medir por diversas técnicas. Sobre esta variable, se observó un efecto ($P<0.025$) de la interacción de tratamiento, sexo y el efecto cuadrático del transcurso del tiempo (fecha de muestreo).

Según los datos estimados, la AA se incrementó ($P<0.025$) durante la evaluación y fue mayor ($P<0.025$) en los machos con la dieta sin manzarina (t2) y en las hembras con la dieta con manzarina. Según los datos estimados, al momento del tercer muestreo, los machos de t2 tuvieron una AA de 63.6 ± 1.6 mM Fe₂, las hembras de t1 56.8 ± 1.8 mM Fe₂, las hembras de t2 44.3 ± 1.6 mM Fe₂ y los machos de t1 31.9 ± 1.2 mM Fe₂.

Hay factores de estrés ambientales o del estado fisiológico del animal que pueden incrementar la producción de especies oxigénicas reactivas (EOR) en el cuerpo, causando daños en las membranas plasmáticas, en las proteínas y en el DNA celular (Hansen, 2008), una mayor AA en plasma implica una mayor resistencia contra ese daño.

En vacas lecheras en producción, alimentadas con dietas con y sin manzarina, la AA se incrementó por el solo hecho de ofrecer una dieta balanceada y en cantidad suficiente para cubrir sus requerimientos (Gallegos, 2007), en este trabajo se observó algo similar, sin embargo, la AA en el plasma de las hembras de t1 se favoreció con la dieta con manzarina y la dieta sin manzarina favoreció la AA en el plasma de los machos de t2.

Un organismo entra en estrés oxidativo los niveles de EOR son mayores que los niveles de antioxidantes (Bush *et al.*, 2007) en el organismo, esto se acentúa cuando existen condiciones de enfermedades y desórdenes fisiológicos (Weiss y Mahan, 2008). La respuesta antioxidante del cuerpo,

se incrementa por la presencia de vitaminas, selenio y enzimas antioxidantes (Karataş *et al.*, 2006), también puede ser influenciada por la presencia de algunos polifenoles en los alimentos (Ndhiala *et al.*, 2006) y refleja de manera general, el estado antioxidante total del cuerpo (Gallegos, 2007) independientemente del mecanismo (de las vitaminas, minerales o enzimas) que la influencie; esto es un área de investigación actual (Hansen, 2008)

En este trabajo, la dieta con manzarina (t1), permitió que las hembras tuvieran una mayor AA. En animales en producción, la AA se puede influenciar positivamente después de un plazo de al menos 30 d de alimentación con una dieta balanceada y a libre acceso. Este efecto es dependiente del sexo y del estado fisiológico del animal. Según los resultados estimados, la AA en los machos de t2 también se favoreció con la dieta sin manzarina.

Biometría Hemática (BHem)

Una BHem muestra la cantidad de Leucocitos, Eritrocitos y Plaquetas en sangre (Gallegos, 2007), con base en los resultados de su concentración, se pueden realizar diagnósticos de salud.

Leucocitos. Este grupo de células sanguíneas protegen a los organismos de agentes patógenos externos y se distribuyen a través del torrente sanguíneo, se les conoce de manera general como glóbulos blancos, estos a su vez, se subdividen en diferentes tipos de glóbulos blancos (Aiello y Mays, 2000).

La concentración de Leucocitos en sangre fue similar ($P > 0.05$) entre tratamientos y se comportó de manera cuadrática ($P < 0.05$) a través del tiempo. Del segundo al tercer muestreo la cantidad estimada de células de leucocitos en sangre muestra un incremento ($P < 0.05$). Las cantidades estimadas fueron: al inicio de la evaluación (31 de julio de 2012), $7.47 \pm 1.25 \cdot 10^3$ células por microlitro ($\text{cel} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) en t1 y $7.78 \pm 1.07 \cdot 10^3$ $\text{cel} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ en t2; en el segundo muestreo (30 de agosto de 2012),

$6.98 \pm 1.06 \cdot 10^3 \text{ cel} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ en t1 y $6.70 \pm 1.30 \cdot 10^3 \text{ cel} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ en t2. En el último muestreo (26 de septiembre de 2012), $8.59 \pm 1.05 \cdot 10^3 \text{ cel} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ en t1 y $8.25 \pm 1.27 \cdot 10^3 \text{ cel} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ en t2.

Según Aiello y Mays (2000), la cantidad normal de leucocitos en sangre debe ser de entre 4 y $12 \cdot 10^3 \text{ cel} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ en borregos, los valores observados en este trabajo, se encuentran dentro de ese rango indicando que los borregos se encontraron sin problemas de enfermedades o alergias durante todo el proceso.

Un conteo leucocitario diferencial, permite calcular las proporciones que hay de cada uno de los diferentes tipos de glóbulos blancos en el torrente sanguíneo (leucograma), dicho conteo puede ser diferente en un grupo de animales debido al sexo, la edad, la condición, el ejercicio físico, los ciclos diurnos y sexuales de los animales y de la alimentación.

El número de leucocitos aumenta en infecciones agudas bacterianas, leucemias, necrosis hística y en intoxicaciones, estas situaciones también pueden generar niveles bajos de leucocitos (Aiello y Mays, 2000), un estado nutricional adecuado y cierto tipo de aditivos e ingredientes en las dietas pueden afectar positivamente esos niveles. En este caso, no hubo diferencia por efecto de la adición de manzarina en la dieta.

Porcentaje de neutrófilos. En la etapa inicial de procesos inflamatorios, los neutrófilos son los leucocitos presentes en mayor número (Ferrandi *et al.*, 2012). En ganado lechero, son el primer grupo de células de defensa del organismo que actúa en la glándula mamaria cuando las vacas sufren de mastitis (Paape y Capuco, 1997).

La concentración en porcentaje de neutrófilos con base en la cantidad total de leucocitos, se incrementó de manera cuadrática ($P < 0.01$) a través del tiempo, pero no hubo diferencia ($P > 0.05$) entre tratamientos. La concentración en porcentaje de neutrófilos con base en la cantidad total de leucocitos en el primer muestreo (31 de julio de 2012) fue de $8.7 \pm 1.3\%$ en t1 y de $8.7 \pm 2.4\%$ en t2, en el segundo

muestreo (30 de agosto de 2012) fue de $29.7 \pm 1.0\%$ en t1 y de $29.5 \pm 2.9\%$ en t2 y en el tercer muestreo (26 de septiembre de 2012) fue de $42.2 \pm 1.1\%$ en t1 y de $41.8 \pm 3.0\%$ en t2. Según Aiello y Mays (2000), los ovinos deben tener una cantidad relativa de neutrófilos de entre 10 y 50% del conteo total de leucocitos.

Se ha reportado que la concentración de neutrófilos segmentados en ovinos puede ser de un $23 \pm 1\%$ a los tres meses de edad, a los cinco meses de edad, la concentración relativa puede estar cerca del $20 \pm 1\%$ y en borregos adultos la concentración puede llegar hasta el doble (Ullrey *et al.*, 1965). Los valores estimados se encontraron dentro de los rangos normales. Debe destacarse que a pesar de que no se encontró diferencia entre tratamientos, el valor del error estándar estimado de los resultados de t1 es más pequeño que en t2, indicando que existe la posibilidad de que la dieta con manzarina tenga un efecto de modulación en la producción de neutrófilos.

La concentración porcentual de neutrófilos, esta positivamente relacionada con la IGF-1 (Burton *et al.*, 1992). Un nivel alto de este tipo de leucocitos podría ser deseable, debido a que esto significa mayor resistencia a enfermedades, sin embargo, una cantidad alta de neutrófilos puede afectar los tejidos inflamados debido a que generan EOR, incrementando la oxidación de las moléculas en esos tejidos y además liberan enzimas granulares (Paape y Capuco, 1997). El incremento en la proporción de neutrófilos se debió al aumento de la edad de los animales y con la alimentación a libre acceso. En el último muestreo.

Porcentaje de linfocitos. Este tipo de células, se originan de una célula madre medular y maduran en los nódulos linfáticos, el bazo y los tejidos linfoides periféricos. Se subdividen en células B y T, las primeras son los precursores de las células plasmáticas y producen anticuerpos, las segundas participan en la inmunidad. La proporción de linfocitos fue afectada ($P < 0.05$) por la interacción triple del tratamiento, sexo del animal y fecha de muestreo (transcurso del tiempo; ($P < 0.05$)).

La proporción en sangre de este tipo de células sanguíneas, disminuyó de forma cuadrática ($P < 0.05$) del primer al tercer muestreo. La concentración fue mayor ($P < 0.05$) en las hembras de la dieta sin manzanina. En el primer muestreo, el porcentaje estimado de linfocitos en las hembras de t1 fue de $82.2 \pm 1.1\%$, en los machos de t1 $93.4 \pm 1.4\%$, en las hembras de t2 100.0% y en los machos de t2 $84.7 \pm 1.5\%$. Según Aiello y Mays (2000) de la cantidad total de leucocitos en sangre, la concentración de linfocitos, debe estar entre 40 y 75% (criterio de valoración), en el primer muestreo, los valores estimados se encontraron por sobre ese rango, de igual manera sucedió con las hembras de t2 en el segundo muestreo ($97.0 \pm 1.4\%$), en el tercer muestreo la concentración de linfocitos se encontró dentro del rango del criterio de valoración.

Ullrey *et al.*, (1965), encontraron que la concentración relativa de Lin en ovinos de 3 y 5 meses de edad puede ser de 76 ± 1 y $78 \pm 1\%$ respectivamente. El incremento de linfocitos, se relaciona con la estimulación inmune producida por inflamaciones crónicas o alguna enfermedad (Aiello y Mays, 2000).

Las variaciones de linfocitos en sangre pueden depender de la influencia de IGF-1 (Burton *et al.*, 1992). Este tipo de componentes sanguíneos, disminuye conforme el peso vivo del animal se incrementa (Bhannasiri *et al.*, 1961; Ullrey *et al.*, 1965). Los cambios en la concentración relativa de linfocitos en este trabajo, no se atribuyen a procesos infecciosos, ya que la cantidad total de leucocitos estuvo dentro los rangos normales.

Porcentaje de monocitos. Estas células se forman en la médula ósea y cuando llegan a los tejidos tisulares se convierten en macrófagos (Aiello y Mays, 2000), la función de estos es fagocitar y destruir partículas extrañas y tejidos muertos o desvitalizados, así también, preparan las sustancias ajenas para que puedan provocar una respuesta inmune (Tizard, 1984). Esta variable no mostró diferencia ($P > 0.05$) por efecto de tratamiento, sexo del animal o su interacción. La concentración de monocitos tuvo un comportamiento cuadrático ($P < 0.01$) a través del tiempo.

Según los datos estimados, la concentración relativa en el primer muestreo fue de $4.4 \pm 1.3\%$ en t1 y de $12.5 \pm 6.3\%$ en t2, en el segundo muestreo fue de $1.0 \pm 1.5\%$ en t1 y de $2.8 \pm 8.8\%$ en t2 y en el tercer muestreo fue de $1.9 \pm 1.3\%$ en t1 y de $5.4 \pm 6.5\%$ en t2.

Los monocitos pueden formar células gigantes multinucleadas como respuesta a cuerpos extraños y son fuente de factores estimuladores de las colonias y citoquinas (o citocinas) que regulan la respuesta inflamatoria y que producen antígenos. En ovinos, su concentración relativa puede estar entre 0 y 6% (Aiello y Mays, 2000).

En bovinos, la cantidad de monocitos disminuye conforme el peso del animal se incrementa (Bhannasiri *et al.*, 1961) y su concentración relativa es inversamente proporcional a la de los Neutrófilos (Ullrey *et al.*, 1965). En procesos inflamatorios, sustituyen la presencia inicialmente alta de neutrófilos, hasta que se convierten en el grupo más numeroso de leucocitos en los tejidos inflamados (Ferrandi *et al.*, 2007).

No hubo diferencia ($P > 0.05$) entre tratamientos para esta variable, sin embargo, se puede observar que el error estándar (variabilidad de los datos) de los valores estimados en t1 tiene un rango con menor amplitud que el error estándar de los valores estimados en t2, además de lo anterior, se pudo observar que en el primer muestreo, la concentración de monocitos en los animales de t2 se encontró por sobre los rangos normales descritos por Aiello y Mays (2000), su incremento es un reflejo de una respuesta del sistema inmunológico a la presencia de cuerpos extraños. De lo anterior se puede sugerir que existe un efecto de modulación en la producción de monocitos como resultado del uso de la dieta con manzarina.

Porcentaje de eosinófilos. Este tipo de células se incrementa cuando existe alguna reacción alérgica (Aiello y Mays, 2000). Esta variable tuvo un comportamiento cuadrático y fue mayor ($P < 0.05$) en t2. Según los valores estimados, en los borregos de t1 la concentración de eosinófilos se encontró en un rango normal (primer muestreo $0.2 \pm 1.2\%$, segundo muestreo $2.2 \pm 1.1\%$ y tercer muestreo $2.1 \pm 1.0\%$), pero en t2 (primer muestreo $1.2 \pm 2.6\%$), la concentración fue mayor ($P < 0.05$) en el segundo ($15.9 \pm 2.8\%$) y tercer muestreo ($15.2 \pm 2.8\%$) y fue superior al rango del criterio de valoración (entre 0 y 10% de los leucocitos) reportado por Aiello y Mays (2000).

Los eosinófilos liberan histaminasas que pueden modular la producción de histaminas de los basófilos y contienen proteínas que están involucradas con la eliminación de parásitos.

Porcentaje de basófilos. Este tipo de leucocitos son poco frecuentes en animales domésticos. Esta variable mostró un comportamiento cuadrático ($P < 0.01$) a través del tiempo. No se observó efecto ($P > 0.05$) de tratamientos, del sexo del animal o de su interacción sobre esta variable. El porcentaje de basófilos disminuyó ($P < 0.01$) del primer ($1.21 \pm 0.03\%$ en t1 y $1.13 \pm 0.18\%$ en t2) al segundo muestreo (0.0%), en el tercer muestreo los niveles de basófilos fueron de 0% en ambos tratamientos. En ovinos, es normal encontrar una concentración de basófilos de entre un 0 y 3% en el leucograma. Este tipo de leucocitos tienen histamina, heparina y mucopolisacáridos sulfatados (Aiello y Mays, 2000).

Cantidad de eritrocitos. Estas células tienen la función de llevar oxígeno a los tejidos a una presión suficiente para permitir su rápida difusión. No se observó ningún efecto ($P > 0.05$) sobre esta variable, lo que significa que la cantidad de eritrocitos fue estable durante toda la evaluación.

Los eritrocitos, contienen hemoglobina, un vehículo que transporta a la hemoglobina intacta a un nivel intracelular y un metabolismo preparado para proteger al vehículo y a la hemoglobina; en su deficiencia, se presenta un estado de anemia. La cantidad de eritrocitos en ovinos debe estar entre 9 y 15×10^6 glóbulos por microlitro μL^{-1} (Aiello y Mays, 2000).

Hematocrito. Esta variable, es un análisis práctico y exacto del estado eritrocitario sanguíneo que se expresa en porcentaje (Aiello y Mays, 2000). No hubo efecto ($P>0.05$) de tratamiento, del sexo del animal o de sus interacciones sobre esta variable. A través del tiempo de evaluación, mostró un incremento de forma cuadrática ($P<0.025$). En t1, los valores estimados fueron de $31.1\pm 1.0\%$, $33.7\pm 1.0\%$ y $35.0\pm 1.0\%$ en el primer, segundo y tercer muestreo. En t2, los valores estimados fueron de $31.0\pm 1.1\%$, $33.6\pm 1.1\%$ y 34.9 ± 1.1 en el primer, segundo y tercer muestreo.

El hematocrito, se utiliza para diagnosticar la pérdida de sangre, la destrucción excesiva de glóbulos rojos o la disminución en la producción de glóbulos rojos. Un hematocrito bajo es resultado de un estado anémico, su incremento por sobre los valores normales, se relaciona con la deshidratación. El hematocrito (%), debe encontrarse entre un 27 y 45% en ovinos (Aiello y Mays, 2000). Los valores en este trabajo se encontraron dentro de ese rango.

Volúmen corpuscular medio (VCM). Cuando este valor es bajo, indica que los eritrocitos tienen un tamaño menor a lo normal, esto se puede presentar cuando la cantidad de hierro es insuficiente (Aiello y Mays, 2000). Esta variable, mostró un efecto ($P<0.025$) de tratamiento con un comportamiento cuadrático a través del tiempo (efecto de la interacción de tratamiento por fecha de muestreo al cuadrado). En el primer, segundo y tercer muestreo, los valores estimados del VCM en t1 fueron, 32.5 ± 1.0 fL (fentolitros), 33.0 ± 1.0 fL y 33.1 ± 1.0 fL, mientras que en t2, los valores fueron de 30.7 ± 1.0 fL, 31.2 ± 1.0 fL y 31.3 ± 1.0 fL respectivamente, como se puede observar el VCM fue mayor ($P<0.025$) en los animales de t1. El VCM debe encontrarse entre 28 y 40% en ovinos (Aiello y Mays, 2000). Los valores estimados estuvieron dentro del rango mencionado.

Hemoglobina corpuscular media (HCM). Este valor, indica la concentración de hemoglobina en función a la cantidad de glóbulos rojos (Aiello y Mays, 2000). Sobre esta variable, se observó un efecto ($P<0.01$) de la interacción de sexo del animal por el efecto cuadrático de la fecha de muestreo

(comportamiento cuadrático en función al transcurso del tiempo), siendo la concentración en machos, mayor ($P < 0.01$) que en hembras.

En el primer muestreo, la cantidad estimada de HCM en t1 fue de 12.79 ± 1.01 picogramos (pg) en hembras y 14.64 ± 1.04 pg en machos, en t2 fue de 12.11 ± 1.04 pg en hembras y 13.86 ± 1.06 pg en machos. En el segundo muestreo, la cantidad estimada de HCM en t1 fue de 12.35 ± 1.01 pg en hembras y 14.14 ± 1.05 pg en machos, en t2 fue de 11.69 ± 1.04 pg en hembras y 13.38 ± 1.07 pg en machos. En el tercer muestreo, la cantidad estimada de HCM en t1 fue de 12.14 ± 1.01 pg en hembras y 13.89 ± 1.01 en machos y en t2 fue de 11.49 ± 1.04 pg en hembras y 13.15 ± 1.07 pg en machos.

La cantidad de HCM en ovinos debe encontrarse entre 8 y 12 pg (Aiello y Mays, 2000). Los resultados de este trabajo mostraron que la HCM de los animales fue ligeramente mayor que el rango del criterio de valoración, aún así se considera normal. La concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) es un parámetro de valoración más adecuado.

Concentración de la hemoglobina corpuscular media (CHCM). Este parámetro, indica la concentración de hemoglobina en función al volumen de glóbulos rojos. No se encontró efecto ($P > 0.05$) de tratamiento, sexo del animal, de su interacción o una interacción de estos con la fecha de muestreo.

Se observó un comportamiento cuadrático ($P < 0.05$) de la CHCM a través del tiempo (fecha de muestreo). Según los valores estimados la CHCM en gramos por decalitro ($g \text{ dL}^{-1}$) en el primer, segundo y tercer muestreo fue de 40.49 ± 1.01 , 37.47 ± 1.01 y 36.69 ± 1.01 en t1 y de 38.87 ± 1.06 , 35.97 ± 1.06 g y 35.22 ± 1.06 en t2.

La CHCM como parámetro de valoración es similar a la HCM pero es más adecuado como indicador y se debe encontrar entre 31 y 34 g dL^{-1} en ovinos como criterio de valoración. Una CHCM aumentada indica hemólisis. En el primer muestreo, la CHCM estuvo por sobre el valor superior del rango del criterio de valoración; un nivel hemolítico alto puede expresarse en un proceso de

recuperación (Aiello y Mays, 2000), es posible que debido a las condiciones de manejo (dieta a libre acceso) y a una alimentación que cubre los requerimientos nutritivos de los animales adecuadamente, estos hayan entrado en un proceso de ganancia compensatoria durante la evaluación, provocando que los valores de CHCM fueran altos en el primer muestreo.

Cantidad de plaquetas. Estos componentes sanguíneos pueden disminuir debido a fármacos, toxinas y en algunos casos a la actividad inmunológica. Esta variable, mostró un comportamiento cuadrático ($P < 0.01$) en función al tiempo, pero no se encontraron diferencias ($P > 0.05$) por efecto de tratamiento, sexo del animal, de su interacción o su interacción con la fecha de muestreo (efecto del transcurso del tiempo).

Esta variable se expresa en cantidad de plaquetas por microlitro de sangre. En borregos, dicha cantidad debe estar entre $250 \times 10^3 \text{ uL}^{-1}$ y $750 \times 10^3 \text{ uL}^{-1}$. La disminución en la producción de plaquetas puede deberse a actividad inmunológica, debido a que se producen anticuerpos que se pueden unir a la superficie de las plaquetas (Aiello y Mays, 2000).

Desarrollo del Tejido Epitelial Estratificado del Rumen

Largo de papilas (LP). El desarrollo del epitelio ruminal se refleja en el largo de las papilas de este tejido. Sobre esta variable, se observó un efecto ($P < 0.01$) de la interacción de tratamiento por sexo del animal. Hubo influencia de la edad ($P < 0.05$) y del peso ($P < 0.07$) del animal (covariables). Los resultados se muestran en el (Cuadro 45).

Los machos de t1 tuvieron el mayor ($P < 0.01$) LP y los machos de t2, tuvieron el menor ($P < 0.01$) LP. Las hembras de t1 y t2 no mostraron diferencia ($P > 0.05$) entre sí. Un mayor LP se puede atribuir a una mayor producción de AGV's, ya que su producción influye en el desarrollo de papilas (Flatt *et al.*, 1956; Heinrichs, 2005; Khan *et al.*, 2007), siempre y cuando no se observen problemas de acidez (Suárez *et al.*, 2007).

Ancho de papilas (AP). Esta variable, también refleja el desarrollo del epitelio ruminal, sin embargo el LP es más representativo. Sobre esta variable, se observó un efecto ($P<0.01$) de tratamiento. Hubo influencia de la edad ($P<0.05$) y del peso ($P<0.05$) del animal (covariables) sobre el AP en el desarrollo del epitelio (Cuadro 45).

En los animales de t1, el AP del epitelio ruminal (1.99 ± 0.02 mm), fue mayor ($P<0.01$) que el AP observado en el epitelio ruminal de los borregos de t2 (1.90 ± 0.02 mm). Como sucede con el LP, un mayor AP se puede atribuir a una mayor producción de AGV's (Flatt *et al.*, 1958; Heinrichs, 2005; Khan *et al.*, 2007), siempre y cuando no haya problemas por acidez (Suárez *et al.*, 2007).

CUADRO 45. DIMENSIONES DE PAPILAS RUMINALES (EN MILÍMETROS)

Variable	t1 (con manzanarina)	t2 (sin manzanarina)
Largo de Papilas en Machos	3.04±0.07 ^a	2.43±0.05 ^b
Largo de Papilas en Hembras	2.64±0.06 ^c	2.67±0.06 ^c
Ancho de Papilas	1.99±0.02 ^a	1.90±0.02 ^b

^{a, b, c, d} Literales distintas indican diferencia (P<0.001)

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El uso de la manzanarina en la dieta de borregos en engorda, favorece la actividad antioxidante en plasma de las hembras, mientras que la dieta sin manzanarina favorece la actividad antioxidante de los machos. La cantidad de leucocitos en el torrente sanguíneo no se incrementó debido al uso de manzanarina en la dieta, sin embargo se observó que la proporción de linfocitos fue alta en las hembras alimentadas con la dieta sin manzanarina.

La concentración de monocitos no fue diferente entre tratamientos, sin embargo su concentración fue menos variable en los animales alimentados con la dieta con manzanarina según lo indica el error estándar, mostrando un efecto de modulación en la producción de este tipo de leucocitos.

La concentración de eosinófilos fue elevada en los animales alimentados con la dieta sin manzanarina, en los animales alimentados con la dieta con manzanarina la concentración de este tipo de leucocitos fue normal. El tamaño de los eritrocitos en sangre de los animales alimentados con la dieta sin manzanarina fue menor, comparando con los resultados estimados en los animales alimentados con la dieta con manzanarina.

La alimentación a libre acceso permitió que la actividad antioxidante en plasma y la respuesta del sistema inmunológico se incrementaran, independientemente del tratamiento. La adición de manzanarina a la dieta estimuló el desarrollo del epitelio estratificado del rumen. Se recomienda que se realicen análisis que permitan caracterizar la cantidad de vitaminas del complejo B en la manzanarina y del tipo de polifenoles que contiene, ya que hubo efectos de la dieta con manzanarina sobre la concentración de leucocitos.

PRODUCCIÓN DE MANZARINA





LITERATURA CITADA

- Aiello, S. E. y A. Mays (Editores). 2000. El Manual Merck de Veterinaria. Quinta Edición. Océano Grupo Editorial, S. A. España.
- Alberto, M. R., M. A. Rindsdahl C., M. C. Manca de Nadra. 2006. Antimicrobial Effect of Polyphenols from Apple Skins on Human Bacterial Pathogens. *Electronic Journal of Biotechnology*. 9(3):205-209. Disponible en <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol9/issue3/full/1/>. Accesado el 13/May/2007.
- Alibes, X., F. Muños, S. Rodríguez. 1984. Feeding value of apple pomace silage for sheep. *Animal Feed Science and Technology*. 11 189-197.
- Altaf, M., B. Navena., M. Venkateswar, E. Vijay, G. Reddy. 2005. Single fermentation of starch to L(+) lactic acid by *Lactobacillus amylophilus* GV6 in SSF using inexpensive nitrogen sources to replace peptone and yeastextract-optimization by RSM. Disponible: www.sciencedirect.com.
- Alvarez, A. R. J. J. Tillan C. J. 1988. Razón de eficiencia proteica de tres fuentes de proteínas Cubanas. *Rev. Cubana Prod. Anim.* 4:179.
- ANKOM. 2005a. Acid Detergent Fiber in Feeds Filter Bag Technique (ANKOM200). ANKOM Technology. Disponible en http://www.ankom.com/00_products/product_a200.shtml. Accesado el 30/Ene/2008.
- ANKOM. 2005b. In vitro True Digestibility Using the DAISYII Incubator. ANKOM Technology. Disponible en http://www.ankom.com/00_products/product_daisy.shtml. Accesado el 02/Feb/2008.
- ANKOM. 2005c. Neutral Detergent Fiber in Feeds Filter Bag Technique (ANKOM200). ANKOM Technology. Disponible en http://www.ankom.com/00_products/product_a200.shtml. Accesado el 30/Ene/2008.
- Anrique, G. R. y C. Dossow. 2003b. Efectos de la pulpa de manzana ensilada en la ración de vacas lecheras sobre el consumo, tasa de sustitución y producción de leche. *Arch. Med. Vet.* 35 n1.
- Anrique, G. R. y M. Paz. 2002a. Efecto del ensilado sobre la composición química y degradabilidad ruminal de la pomasa de manzana. *Arch. Med. Vet.* Vol. 34.
- AOAC. 2000. Official method of analysis (17th Ed). Association of official analytical chemists, Arlington.
- AOAC.1984. Official Methods of Analysis (14th Ed.) Association of Analytical Chemist, Washington, D.C.
- Arce, M. J., E. Ávila., C. López, A. García y F. García. 2005. Efecto de paredes celulares (*Saccharomyces cerevisiae*) en el alimento de pollo de engorda sobre los parámetros productivos. *Tec. Pecu. Méx.* 43 (2) 155-162.

- Bahr V. P. y L. Y. Basulto. 2004. The Ferric Reducing Power (FRP). An assay for the serum antioxidant capacity assessment. Facultad de Ciencias Médicas "Mariana Grajales Coello", Departamento de Ciencias Fisiológicas, Holguín. Disponible en: <http://www.cocmed.sld.cu/no84/n84ori4.htm>.
- Baldwin, VI, R. L., K. R. McLeod, J. L. Klotz y R. N. Heitmann. 2004. Rumen Development, Intestinal Growth and Hepatic Metabolism in the Pre- and Postweaning Ruminant. *Journal of Dairy Science*. 87: (E. Suppl.):E55-E65.
- Barth, S. W., C. Fährdrich, A. Bub, H. Dietrich, B. Watzl, F. Will, K. Briviba y G. Rechkemmer. 2005. Cloudy Apple Juice Decreases DNA Damage, Hyperproliferation and Aberrant Crypt Foci Development in the Distal Colon of DMH-Initiated Rats. *Carcinogenesis*. 26(8):1414-1421.
- Becerra B., A. 1998. Elaboración de bloques proteicos para suplementación de ganado en agostadero utilizando un subproducto de manzana con cuatro tipos de secante. Tesis de Maestría. Facultad de Zootecnia. Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua. México.
- Becerra B., A. 2006. Aprovechamiento de Subproductos de Manzana Mediante la Producción de Proteína Microbiana con Fermentación en Estado Sólido para la Alimentación Animal. Disertación Doctoral. Facultad de Zootecnia. Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua. México.
- Benzie, I. F. F. y J. J. Strain. 1996. Ferric Reductive Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of Antioxidant Power: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. 239:70.
- Bergey 1984. Manual of determinative Bacteriology. The Williams y Wil kings company baltimore.
- Bhannasiri, T., R. Bogart y H. Krueger. 1961. Hemoglobin and Blood Cells of Growing Beef Cattle. *Journal of Animal Science*. 20:18-21.
- Bitencourt, L. L., M. N. Pereira, B. M. L. de Oliveira, J. R. M. Silva, G. S. Dias Junior, F. Lopes, R. C. M. de Melo y S. Seicola-Junior. 2008. Response of Lactating Cows to the Supplementation with Live Yeast. *Journal of Animal Science*. 86(E-Suppl. 2). *Journal of Dairy Science*. 91(E-Suppl. 1). p. 264.
- Bocourt, R. E. Carrasco, I. Febles y Z. Riverí. 1998. Nota sobre la depuración biológica de Escherichia coli en la fermentación de la excreta vacuna fermentada con caña molida. *Rev. Cubana de Cienc. Agric.* 32:409.
- Bocourt, R. y L. Wo. 1975. Estudio bacteriológico del ensilado de excreta y miel final. Primera Jornada de Experimentación porcina. La Habana Cuba.
- Bocourt, R., J. Galindo, A. Elías y Z. Riverí. 1990. Una nota sobre el tiempo de almacenamiento en la microflora residual de levadura torula. *Rev. Cubana de Cienc. Agric.* 24: 303.

- Bocourt, R., J. Galindo, R. Elías y Z. Riverí. 1988. Efecto de tiempo en la variación del contenido de bacterias y levaduras de la crema torula. I seminario Internacional. Deriv. Caña de azúcar, La Habana.
- Boggs, D. L., R. A. Merkel, y M. E. Doumitt. 1998. Livestock and carcasses. An integrated approach to evaluation, grading, and selection. Fifth edition. Kendall Hunt/Publishing Company. U.S.A.
- Boyer, J. y R. H. Liu. 2004. Apple Phytochemicals and their Health Benefits. *Nutrition Journal*. 3:5.
- Brat, P., S. Georgé, A. Bellamy, L. Du Chaffaut, A. Scalbert, L. Mennen, N. Arnault y M. J. Amiot. 2006. Daily Polyphenol Intake in France from Fruit and Vegetables. *The Journal of Nutrition*. 136:2368-2373.
- Bravo, L. 1998. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*. 56(11): 317.
- Broderick, G. A. y J. H. Kang. 1980. Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and in vitro media. *J. Dairy Sci*. 63:64–75.
- Bryant, M. P. 1977. Microbiology of the Rumen in Duke's Physiology of Domestic Animals. Ed. J. Sovenson, London, Cornell University, Press, Ltd. Pág. 287-304.
- Bunting, L. D. 2004. Estrategias Nutricionales para Cambiar Componentes de la Leche. *Rev. Entorno Ganadero*. Año 1 No. 6.
- Burroughs, W. H. A. Trenkle and R. L. Vetter. 1975. Some new concepts concerning urea utilization in beef cattle. Iowa State university of Science and Techology. 103-121.
- Burton, J. L., B. W. McBride, B. W. Kennedy, J. H. Burton, T. H. Elsasser y B. Woodward. 1992. Hematological Profiles in Dairy Cows Treated with Recombinant Bovine Somatotropin. *Journal of Animal Science*. 70:1488-1495.
- Bush, S., K. Gyenai, X. Guan y T. Geng. 2007. Oxidative Stress and Immune Response in the Chicken. *Journal of Animal Science*. 85(Suppl. 1). *Journal of Dairy Science*. 90(Suppl. 1). *Poultry Science*. 86(Suppl. 1). p. 52.
- Calderón A., J. O., A. Elías I. y M. Valdivié N. 2005. Dinámica de la Fermentación en Estado Sólido de las Camas de Cascarilla de Café en Inicio de Ponedoras Inoculadas con Vitafer. *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET*. 6(5).
- Caldwell, O. R. Keeney, M. Barton, J. S. Kelly. 1973. Sodium and other inorganic growth requirements of *Bacteroides amylophilus*. *J. Bacteriol* 114:782.
- Camarero, S., G. C. Galletti y A. T. Martínez. 1994. Preferential Degradation of Phenolic Lignin Units by Two White Rot Fungi. *Applied and Environmental Microbiology*. 60(12):4509-4516.

- Carrasco, E., R. Bocourt, A. Elías e I. Febles. 1997. Grosor de la capa y volteo en la fermentación de la caña de azúcar con excreta vacuna. *Rev. Cubana de Cienc. Agric.* 31: 49.
- Castellanos, A. 1986. *Subproductos Industriales*. Editores, Shimada, A.S., R. Rodríguez, J.A. Cuaron. Engorda de Ganado Bovino en Corrales. Consultores en Producción Animal, S.C. México.
- Chacón R. A., J. Rodrigo, E. Alvarez y F. Plenge. 2006. Influencia de la BCiclodextrina y Ac. Cafeico en la Capacidad Antioxidante del Plasma de Ratas Sprague-Dawley. Universidad Autonoma de Ciudad Juárez.
- Chesson, A. y Forsberg, C. W. 1988. Polysaccharide degradation by rumen microorganisms. In the rumen microbial ecosystem. Ed. P. N. Hason p. 259. Elsevier Applied Science. London and New York.
- Church, D.C. 1974. *Fisiología Digestiva y Nutrición de los Rumiantes*. Volumen 1. Editorial Acribi. Zaragoza, España. 379 pp.
- Church, D.C. W.G. Pond. 1976. *Fundamentos de Nutrición y Alimentación de Animales*. Editorial Limusa. Tercera edición. México. 438 pp.
- Clínica Universidad 2007. Centro de Diagnóstico y Check up. Comunicación personal.
- Cone, J.W., y A. H. Van Gelder. 2000. Influence of protein fermentation on gas production. In: *Gas Production: Fermentation Kinetics for Feed Evaluation and to Assess Microbial Activity*. An EAAP Satellite Symposium, British Society of Animal Science and Wageningen University, Wageningen, The Netherlands, pp. 23–24.
- Cressman, S. G., D. G. Grieve, G. K. Macleod, E. E. Wheeler y L. G. Young. 1980. Influence of dietary protein concentration on milk production by dairy cattle in early lactation. *J. Dairy Sci.* 63: 1839 – 1847.
- Czerkawski, J.W. 1978. Reassessment of efficiency of synthesis of microbial matter in the rumen. *J. Dairy Sci.* 61: 1261-1273.
- Dawes, Sutherland. 1976. *Fisiología de los Microorganismos*. H. Blume. Madrid, España. P. 235.
- De Háro, D.J., M. M. Reboloso, F. García y J. L. Guil. 2001. Efecto de distintos tratamientos sobre los principios nutritivos, características fermentativas y digestibilidad *in vitro* de ensilados de subproductos de pimienta. *Arch. Zootec.* 50: 323-33.
- De la Cruz, C. L., G. Torres, R. Núñez, y C. M. Becerril. 2006. Evaluación de características productivas de corderos Hampshire, Dorset y Suffolk en pruebas de comportamiento, en Hidalgo, México. *Agrociencia*. Vol. 40, núm 001. Colegio de Postgraduados, Texcoco, México. Pp. 59-69.

- Depeters, E. y J. Cant. 1992. Nutritional factors influencing the nitrogen Composition of bovine milk: a review. *J. Dairy Sci.* 75: 2043 – 2070.
- Díaz, J., M. Castro y M. Iglesias. 1992. Nota acerca de la digestibilidad aparente de la materia seca y la energía en dietas con miel B y piensos con Saccharina en cerdas en crecimiento. *Rev. Cubana Cienc. Agric.* 26:167.
- Díaz, P., D. 2006. Producción de Proteína Microbial a Partir de Manzana de Desecho Adicionada con Urea y Pasta de Soya. Tesis de Maestría. Facultad de Zootecnia. Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua. México.
- Durand, H. Kawashima, R. 1979. Influence of Minerals in Rumen Microbial Digestión. *Digestive Physiology and Metabolism in Ruminants*. Ed. Ruckebusch. Thivend, MTP Press, 375.
- Elías A. Lezcano. 1994. Efecto de la inclusión de niveles de harina de maíz en la fermentación de la caña de azúcar. *Rev. Cubana Cienc. Agric.* 28:319.
- Elías A. Lezcano. 1993. Efecto de la fuente de N y algunos factores de crecimiento en la población de levaduras que se establece en la producción de Saccharina. *Rev. Cubana de Cienc. Agric.* 27:277.
- Elías, A. 2004. Procesos biotecnológicos para la producción y utilización de alimento animal. *Simposium Internacional: Tendencias actuales en la producción de carne en zonas áridas*. Chihuahua Chih. México.
- Elías, A., O. Lezcano y F. R. Herrera. 2001. Algunos Indicadores Bromatológicos y Productos Finales de la Fermentación para la Obtención de Cuatro Tipos de Saccharina Inoculados con Vitafert. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola.* 35(2):153-158.
- Elias, A., O. Lezcano, P. Lezcano, J. Cordero y L. J. Quintana. 1990. Reseña descriptiva sobre el desarrollo de una tecnología de enriquecimiento proteico en la caña de azúcar mediante fermentación en estado sólido (Saccharina). *Rev. Cubana Ciencias Agrícolas*. Vol. 24:1.
- Enomoto, T., Y. Nagasako-Akazome, T. Kanda, M. Ikeda y Y. Dake. 2006. Clinical Effects of Apple Polyphenols on Persistent Allergic Rhinitis: A Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Parallel Arm Study. *The Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology.* 16(5):283-289.
- Ergui, M. 1985. Replacement of Fishmeal by Bacterial Biorotein in Broiler Rations with high Cottonseed Meal and sun Flower Meal Content. *Poultry Astr.* 11: 223.
- FAO/LATINFOODS. 2002. Tabla de Composición de Alimentos de América Latina. Disponible en <http://www.rlc.fao.org/es/bases/alimentos>. Accesado el 29/Jul/2008.

- Farnsworth, R. J., L. Wyman y R. Hawkinson. 1980. Use of a teat sealer for prevention of intramammary infections in lactating cows. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 177(5): 441-444.
- Ferrandi, C., V. Ardissonne, P. Ferro, T. Rückle, P. Zaratín, E. Ammannati, E. Hauben, C. Rommel y R. Cirillo. 2007. Phosphoinositide 3-Kinase y Inhibition Plays a Crucial Role in Early Steps of Inflammation by Blocking Neutrophil Recruitment. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 322(3):923-930.
- Ferreiro, H. M., E. Sánchez y G. Ortiz. 1983. Efectos de Niveles de urea y acuamonia como aditivos al silo de bagazo de manzana y ganancia de peso en bovinos. *Resumen de investigación Pecuaría en México. Nov-Dic., D.F. México.* 47.
- Ferreiro, H. T. Preston. T. Sutherland. 1977 Limitaciones Dietéticas en Raciones Basadas en Caña de Azúcar. *Producción Animal Tropical*. 2:58-63.
- Flatt, W. P., R. G. Warner y J. K. Loosli. 1956. Influence of Purified Materials on the Development of the Ruminant Stomach. *Journal of Dairy Science*. 41:1593-1600.
- Fondevila, M. y A. Barrios. 2001. La Técnica de Producción de Gas y su Aplicación al Estudio del Valor Nutritivo de los Forrajes. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*. 35(3):197-206.
- Fontenot, J. P., K. P. Bovard, R. R. Oltjen, T. S. Rumsey y B. M. Priode. 1977. Supplementation of apple pomace with nonprotein nitrogen for gestating beef cows. I. Feed intake and performance. *J. Anim. Sci.* 45: 513-522.
- Forster, R. J., D. G. Grieve, J. G. Buchanan-Smith, y G. K. Macleod. 1983. Effect of dietary protein degradability on cows in early lactation. *J. Dairy Sci.* 66: 1653 – 1662.
- Fundora, O., P. Martín, A. Elías & R. Llerandi. 1996. Efecto de la suplementación proteica de raciones basadas en Saccharina rústica para bovinos en crecimiento-ceba. *Rev. Cubana de Cienc. Agric.* 30:163.
- Galindo, J., A. Elías, J. Alvarez, R. Piedra, R. Riverí, S. Gutiérrez, y O. Coto. 1996. Efecto del nivel de Saccharina en el pienso en la población microbiana ruminal y su actividad en vacas lecheras. *Rev. Cubana Cienc. Agric.* 30.
- Gallegos A., M. A. 2007. Conteo de Células Somáticas en Leche, Actividad Antioxidante del Plasma y Componentes Celulares Sanguíneos de Vacas Holstein en Producción Alimentadas con Manzanarina en la Dieta. Tesis de Maestría. Facultad de Zootecnia. Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua. México.
- Galyean, M. L. 1997. *Laboratory Procedures in Animal Nutrition Research*. 12a Edición. Texas Tech University. Lubbock, Texas. Estados Unidos de América.

- García, A. D. 2004. Células somáticas y alto recuento bacteriano ¿cómo controlarlos? South Dakota, South Dakota State University. Dairy Science. pp. 1-4.
- García, Y., A. Ibarra, E. C. Valiño, J. C. Dustet, A. Oramas y N. Albelo. 2002. Study on a Solid State Fermentation System Using Shaking for Sugarcane Bagasse Biotransformation by the *Trichoderma viride* M5-2 Strain. Cuban Journal of Agricultural Science. 36(3):255-260.
- Gasa, J., C. Castrillo y J. Guada. 1988. Valor nutritivo para los rumiantes de los principales subproductos de la industria conservera de hortalizas y frutas. III. Pulpa de manzana. Investigación Agrícola 3 (1):93:108.
- Giménez, R. 2006. Alteraciones No Patológicas en Hematología Veterinaria. Laboratorio IACA de Veterinaria. Disponible en: <http://www.iaca.com.ar/alteraciones%20no%20patologicas.htm>. Accesado en Junio 21, 2007.
- Gliszczynska-Swiglo, A. y B. Tyrakowska. 2003. Quality of Commercial Apple Juices Evaluated on the Basis of the Polyphenol Content and the TEAC Antioxidant Activity. Journal of Food Science. 68(5): 1844-1849.
- Godiaet, F. C. Casas y C. Sola. 1988. Batch alcoholic fermentation modeling by simultaneous integration of growth and fermentation equations. J. Chem. Tech. Biotechnol. 41 (2), 155-165.
- González-San José, M.L., P. Muñoz R. y V. Valls B. 2001. Actividad antioxidante de la cerveza: estudios *in vitro* e *in vivo*. Centro de información cerveza y salud. Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos. Universidad de Burgos. Departamento de Pediatría, Ginecología y Obstetricia. Universidad de Valencia. España.
- Gossé, F., S. Guyot, S. Roussi, A. Lobstein, B. Fischer, N. Seiler y F. Raul. 2005. Chemopreventive Properties of Apple Procyanidins on Human Colon Cancer-Derived Metastatic SW620 Cells and in a Rat Model of Colon Carcinogenesis. Carcinogenesis. 26(7):1291-1295.
- Graham, C. y N. L. Simmons. 2005. Functional Organization of the Bovine Rumen Epithelium. The American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology. 288:R173-R181.
- Graziani, G., D. Argenio, G. Tuccillo, C. Loguercio, C. Ritieni, A. Morisco, F. del Vecchie Blanco, C. Fogliano y V. Romano. Apple polyphenol extracts prevent damage to human gastric epithelial cells *in vitro* and to rat gastric mucosa *in vivo*. 2001. Dipartimento di Scienza degli Alimenti, Universidad di Napoli Federico II Parco Gusone, Ed 84 80055 Portici (NA).
- Greenwood, R. H., J. L. Morrill, E. C. Titgemeyer y G. A. Kennedy. 1997. A New Method of Measuring Diet Abrasion and its Effect on the Development of the Forestomach. Journal of Dairy Science. 80:2534-2541.

- Groot, J. C. J., B. A. Williams, A. J. Oostdam, H. Baer y S. Tamminga. 1998. The Use of Cumulative Gas and Volatile Fatty Acid Production to Predict *in vitro* Fermentation Kinetics of Italian Ryegrass Leaf Cell Walls and Contents at Various Time Intervals. *British Journal of Nutrition*. 79:519-525.
- Groot, J. C., J. W. Cone, B. A. Williams, F. M. Debersaques, y E. A. Lantinga. 1996. Multiphasic analysis of gas production kinetics for *in vitro* fermentation of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 64:77-89.
- Gupta, L. K. G. Pathak and R. P. Tiwari. 1990. Effect of nutrition variables on solid-state alcoholic fermentation on apple pomace by yeast. *J. Sci. Food Agric.* (50) 55-62.
- Hafley, J. L., B. E. Anderson and T.J Klopfenstein. 1993. Supplementation of Growing Cattle grazing warm-season grass with Protein of various Ruminal Degradabilities. *J. Anim. Sci.*71:522-529.
- Hang, Y. and R. H. Walter. 1989. Treatment and utilization of apple processing waste. In *Processed Apple Products*, ed. D. L. Downing. AVI Van Nostrand Reinhold, New York, pp. 365-376.
- Hang, Y., C. Lee and H. Cooley. 1981. Production of Alcohol from Apple Pomace. *Applied and Environmental Microbiology* Vol. 42, No. 6 p. 1128-1129.
- Hansen, P. J. 2008. Effectiveness of Supplemental Antioxidants for Enhancing Reproductive Function in Cattle. *Journal of Animal Science*. 86(E-Suppl. 2). *Journal of Dairy Science*. 91(E-Suppl. 1): p. 321.
- Hardy, G. 1992. Fermentación anaeróbica y resistencia a la descomposición aeróbica de pulpa de manzana, bagazo de tomate y colillas de remolacha. Tesis, Lic. Agr. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 70 p.
- Harlander, S. 1989. Food Biotechnology: yesterday, today, an tomorrow. *Food Technology*. September: 196.
- Harmon, R. J. 1994. Symposium: Mastitis and Genetic Evaluation for Somatic Cell Count. *Physiology of Mastitis and Factors Affecting Somatic Cell Counts*. Department of Animal Science University of Kentucky Lexington 40546. *J. Dairy Sci.* 77:2103-2112.
- Heinrichs, J. 2005. Rumen Development in the Dairy Calf. *Advances in Dairy Technology*. 17:179-187.
- Hesseltine, C. W. 1977. Solid state fermentation. I *Process Biochem.* 12 (1) 24-27.
- Hillerton, J. E. 1998. Control de la Mastitis. En Phillips, C. J. C. *Avances de la Ciencia de la Producción Lechera*. Editorial Acribia, S. A. pp. 175-192.

- Hogan, J. S., K. L. Smith, W. P. Weiss, D. A. Todhunter y W. L. Schockey. 1990. Relationships among vitamin E, selenium and bovine blood neutrophils. *J. Dairy Sci.* 73: 2372-2378.
- Hogan, J. S., W. P. Weiss y K. L. Smith. 1993. Role of Vitamin E and Selenium in Host Defense Against Mastitis. *J Dairy Sci* 76:2795-2803. Huerta, M. J., M. E. C. Ortega, M. C. Peralta, J. G. H. Herrera, A. Díaz-Cruz y R.
- Hours, R., C. Voget y R. Ertola. 1988. Some Factors Affecting Pectinase Production from Apple Pomace in Solid-State Cultures. *Biological Wastes* 24: 147-157.
- Huxley, J. N., M. J. Green, L. E. Green y A. J. Bradley. 2002. Evaluation of the efficacy of an internal teat sealer during the dry period. *Journal of Dairy Science* 85(3): 551-561.
- Ibarra, A., Y. García, E. Valiño, J. Dustet, N. Albelo y T. Carrasco. 2002. Influence of Aeration on the Bioconversion of Sugarcane Bagasse by *Trichoderma viride* M5-2 in a Static Bioreactor of Solid Fermentation. *Cuban Journal of Agricultural Science.* 36(2):152-158.
- INEGI. 2007. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. Disponible en: www.inegi.gob.mx/geo/default.asp?c=124&e=08 Accesado en Marzo 20, 2007.
- Jenkins, T. C., y M. A. McGuire. 2006 Major Advances in Nutrition: Impact on Milk Composition. *J. Dairy Sci.* 89: 1302 – 1310.
- Joshi, V. K., y D. K. Sandhu. 1996. Preparation and evaluation of an animal feed byproduct produced by solid-state fermentation of apple pomace. *Bioresource Technology.* Vol 56.
- Kalscheur, K. F., J. H. Vandersall, R. A. Erdman, R. A. Kohn, y E. Russek-Cohen. 1999. Effects of Dietary Crude Protein Concentration and Degradability on Milk Production Responses of Early, Mid and Late Lactation Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 82: 545 – 554.
- Karataş, F., I. Halifeoğlu, M. Karatepe, V. Konar, H. Canatan y R. Çolak. 2006. Evaluation of Changes in Levels of Serum Selenium, MDA and Antioxidant Vitamins (A, E, C) in Diabetic Patients. *Firat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi.* 20(6):391-395.
- Kaufmann K., M.J. Perlago, L.M. Sanchez-Siles, P. Serrano y G. Ros. 2005. Estabilidad y actividad antioxidante de catequinas en infusiones de te verde en función de la temperatura. Componentes no nutricionales bioactivos. I Congreso. 9-11 Marzo. Fesnad 2005. Nutrición Hospitalaria. Volúmen 20, Suplemento 1. Madrid, España. pp. 143.
- Kennedy, M. J. 1994. Apple pomace and kiwifruit: processing options. *Australasian Biotechnol.*, (4) 4319.
- Kertz, A. F. 2002. ¿Podemos aprender de las proporciones y niveles de Grasa y proteína?. *Rev. Hoard's Dairyman en español.* Vol. 3.

- Khan, M. A., H. J. Lee, W. S. Lee, H. S. Kim, K. S. Ki, T. Y. Hur, G. H. Suh, S. J. Kang y Y. J. Choi. 2007. Structural Growth, Rumen Development, and Metabolic and Immune Responses of Holstein Male Calves Fed Milk Through Step-Down and Conventional Methods. *Journal of Dairy Science*. 90:3376-3387.
- Khattree, R. y D. N. Naik. 1999. *Applied Multivariate Statistics with SAS® Software*. SAS Institute Inc. Second Edition. Estados Unidos de América.
- Kim, S. W., H. Brandherm, B. Newton, D. Cook e I. K. Yoon. 2008. Effects of Dietary Yeast Culture Supplementation to Gestation and Lactation Diets on Performance of Sows and Litters. *Journal of Animal Science*. 86(E-Suppl. 2). *Journal of Dairy Science*. 91(E-Suppl. 1). p. 347.
- Klei, L., J. Lynch, D. Barbano, P. Oltenacu, A. Lednor, y D. Bandler 1997. Influence of milking three times a day on milk quality. *J. Dairy Sci*. 80: 427 – 436.
- Klose, A. A. y H. L. Fevold. 1945. Nutritional Value of Yeast Protein to the Rat and the Chick. *The Journal of Nutrition*. 29:421-430.
- Latrille, L., G. Riquelme, H. Manterola y S. Palominos. 1976. Evaluación de dos tipos de levaduras (*Torula utilis* y *saccharomyces* sp) como fuente proteica para raciones de pollos en crecimiento. *Avances en Producción Animal*. 1:45-51.
- Lehninger, A. L. 1982. *Bioquímica*. 2a Edición. Worth Publishers Inc. New York. U. S. A., p. 448.
- Leighton, F. y I. Urquiaga. 1999. Los Componentes del Vino y sus Efectos Beneficiosos para la Salud Humana. VII Congreso Latinoamericano de Viticultura y Enología. Disponible en: <http://www.bio.puc.cl/vinsalud/publica/componentes.doc>. Accesado en Junio 21, 2007.
- Lesmeister, K. E., P. R. Tozer y A. J. Heinrichs. 2004. Development and Analysis of a Rumen Tissue Sampling Procedure. *Journal of Dairy Science*. 87:1336-1344.
- Lezcano, O., y A. Elías. 1992. Efecto de la temperatura y la urea en la fermentación de la caña de azúcar para producir Saccharina. *Rev. Cubana Cienc. Agric*. 26:291.
- Lin, C. C. y J. H. Liang. 2002. Effect of antioxidants on the oxidative stability of chicken breast meat in a dispersion system. *Journal of Food Science*. 67(2): 530-533.
- Litchfield, J.H. 1985. Bacterial biomasa. In: *Comprehensive Biotechnology*. Murray Moo-Young (Ed.) V-3. Canada. 463p.
- Liu, J. X, A. Susenbeth y K. H. Südekum. 2002. *In vitro* production measurements to evaluate interactions between untreated and chemically treated rice straws, grass hay, and mulberry leaves. *J. Anim. Sci*. 80: 517-524.

- Llamas, G. L. 1990. Mejoradores de forrajes. En anabólicos y aditivos en la producción pecuaria. Ed. Sistema de educación continúa en producción animal en México. A.C.
- Lugasi, A., J. Hóvári, K. V. Sági y L. Bíró. 2003. The Role of Antioxidant Phytonutrients in the Prevention of Diseases. *Acta Biologica Szegediensis*. 47(1-4):119-125.
- Madrid, J., A. Martínez-Teruel, F. Hernández y M. D. Megías. 1999. A Comparative Study on the Determination of Lactic Acid in Silage Juice by Colorimetric, High-Performance Liquid Chromatography and Enzymatic Methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 79:1722-1726.
- Maeng, W.J. R.L. Baldwin. 1975. Factors in influencing rumen microbial growth rates and yields: effect of amino acid additions to a purified diet wit nitrogen from urea. *J. Dairy Sci.* 59: 648-655.
- Mamont P.A., R.J. Pruitt P.S Johnson. 1993. Effect of methionine addition to a urea grain supplement on intake and digestibility of mature dormant grasses and performance of cows grazing Winter Range. *J.Anim. Sci.* 71:515-521.
- Manterola, B. H., A. D. Cerda y J. J. MIRA. 1999. Los residuos agrícolas y su uso en la alimentación de Rumiantes. Pomasa de manzana (*Malus pumila*) Uso en bovinos de leche. pp 97.
- Manterola, H., D. Cerda, J. Mira, E. Porte, L. Sirhan y G. Casanova. 1999. Efecto de incluir altos niveles de pomasa de manzana ensilada *Avances en Producción Animal*. 24 (1-2):31-39.
- Manterola, H., E. Porte, D. Cerda, L. Shiran & G. Casanova. 1998. Comportamiento productivo de toritos Hereford alimentados con altos niveles de pomasa de manzana. *Avances en Producción animal* 23 (1-2) 73-79.
- Manterola, H., E. Porte, J. Mira., D. Cerda. L. Sirvan. 1993. Comportamiento productivo de novillos hereford, sometidos a niveles crecientes de pomasa de manzana. *Avan. En Prod. Anim.* No. 18: p. 63.
- Manzanilla, P. C. I. V. 2005. Evaluación de la raza Charollais como raza terminal para la producción de cordero en el norte de México. Tesis de maestría. Facultad de Zootecnia. Universidad Autónoma de Chihuahua, Chihuahua, Chih. Méx. 41.
- McClure, K. E., R. W. Van Keurent, y P. G. Althouse. 1994. Performance and carcass characteristics of weaned lambs either grazed on Orchardgrass, Ryegrass, or Alfalfa or fed all-concentrate diets in drylot. *J. Anim. Sci.* 72:3230-3237.
- McDonald, P., R. Edwards, J. Greenhalgh, y C. Morgan, 1999. *Nutrición Animal*. Quinta edición. Acribia. Zaragoza, España.

- McGuffey, R. K., H. B. Green, y R. P. Basson. 1990. Lactation response of Dairy cows receiving bovine somatotropin and fed rations varying in Crude protein and indegradable intake protein. *J. Dairy Sci.* 73: 2437-2443.
- Meir, H. 1986. *Laborpraktikure Tierernahrung und Futtermittelkunde fur Tierproduzenten*. Verlag, Germany.
- Menke, K. H. y H. Steingas. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. *Anim. Res. Dev.* 28:7-56.
- Mignone, C.F., A. P. Balatti, L. Mazza. 1982. Obtención de un preparado proteico por fermentación, Valoración biológica y estudios de alimentación con aves. *Rev. Lat-Amer Microbiol.* 24:25.
- Miller M.W. 1977 McGraw-Hill *Enciclopedia of Food, Agriculture and Nutrition*. 4th Edition. McGraw-Hill, Inc. New York USA p 679.
- Molina, O.E., D.A. Calliery, N. P de Galvez. 1980. Producción de proteína microbiana a partir de medula de bagazo de caña de azúcar, II. Efecto de la fuente nitrogenada. *Rev. Lat-Amer. Microbiol.* 22:123.
- Molina, O.E., L.A. Pailhe., N.L. Peroti and E. Poplizio. 1983. Evaluation of efficiency of bacterial protein (*Cellulomonas* sp, and *Bacillus Subtilis*) in pre-starting rations for broiler chickens. *Rev. Lat-Amer. Microbiol.* 25:253.
- Muños, E., R. González, F. Alfonso y A. V. Enríquez. 1991. Comparación del pienso con caña deshidratada al sol (Solicaña) y el concentrado comercial para vacas lecheras. *Rev. Cubana de Cienc. Agric.* 24:267.
- NAS. National Academy of Science. 1983. *Atlas of nutritional update on United State Canadians Feeds*. Washington D. C.
- Ngadi, M. O. and L. R. Correia. 1992. Kinetics of Solid-State Fermentation from Apple Pomace. *Journal of Food Engineering.* (17) 97-116.
- NRC. 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. National Academy Press. Seventh Revised Edition. Estados Unidos de América. pp. 283.
- NRC. 1984. *Nutrient requirements of beef cattle*. Nacional academy of Siences. Estados Unidos.
- NRC. 1985. *National Research Council. Nutrient Requirements of Sheep*. Sixth Revised Edition. National Academic Press, Washington, D. C.
- O'mara, F. P., J. J. Murphy y M. Rath. 1998. Effect of Amount of Dietary Supplement and Source of Protein on Milk Production, Ruminal Fermentation and Nutrient Flows. *J. Dairy Sci.* 81: 2430 – 2439.

- Ojeda, F., M. Esperance y L. Luis. 1987. Ensilajes de Pastos Tropicales. *Pastos y Forrajes*. 10(3):189-198.
- Oyawoye O., A. A. Gadir, A. Garner, N. Constantinovici, C. Perrett y P. Hardiman. 2003. Antioxidants and reactive oxygen species in follicular fluid of women undergoing IVF: relationship to outcome. *Human Reproduction*. 18, No.11 pp. 2270.
- Paape, M. J. y A. V. Capuco. 1997. Cellular Defense Mechanisms in the Udder and Lactation of Goats. *Journal of Animal Science*. 75:556-565.
- Pandey, A., C. R. Soccol, J. A. Rodríguez-León y P. Nigam. 2001. *Solid-State Fermentation in Biotechnology*. Asiatech Publishers, Inc. New Delhi.
- Park, C. S. y N. L. Jacobson. 1999. Glándula Mamaria y Lactación. *Compiladores*. Swenson, M. J. y W.O. Reece. *Fisiología de los animales Domésticos de Dukes*. Quinta edición. Noriega Editores, México.
- Peñaloza, W., M. R. Molina, R. Gómez-Brenes y R. Bressani. 1985. Solid-State Fermentation: an Alternative to Improve the Nutritive Value of Coffee Pulp. *Applied and Environmental Microbiology*. 49(2):388-393.
- Pérez-de-Alejo, J. L., G. Rodríguez R. y R. Miranda F. 1998. Actividad anticonvulsinante de las fracciones butanólica y acetato de etilo de la *Indigofera suffruticosa* Mill (añil cimarrón). *Rev. Cubana Plant. Med.* 3(3):7-11.
- Piatkowski, B. 1982. *El aprovechamiento de los nutrientes en el rumiante*. Ed. Hemisferio sur. S.A. Buenos Aires, Argentina.
- Pietta, P. G., P. Simonetti, C. Gardana, A. Brusamolino, P. Morazzoni y E. Bombardelli. 1998. Catechin metabolites after intake of green tea infusions. *Biofactors* 8:111-8.
- Pinto, J., H. H. Cardoso, H., C. Leao Y. N. Van Uden. 1989. High enthalpy and low enthalpy death in *saccharomyces cerevisiae* induced by acetic acid. *Biotechnol. Biveng* 33:1350.
- Plavnik, I., S. Borntein and S. Hurwitz. 1981. Evaluation of metanol-grow bacteria and hidrocarbon-grow yeast as sources of protein for poultry: *Studies with Young- Poultry Sci.* 22:123.
- Podsedek, A., J. Markowski, J. Wilska-Jeszka y B. Anders. 2000. Compositional characterization of some apple varieties. *European Food Research and Technology*. 210(4): 268-273.
- Pond, W. G. J.H. Maner. 1974. *Swine production temperatura and tropical enviroments*. W.H, Freeman Co. U.S.A.
- Pond, W.G. J.H Maner. 1984. *Swine production and nutrition*. AUI Ed. U.S.A. p 508.

- Preston, T. R. 1986. Better utilization of crop residues and by-products in animal feeding. Research guidelines. FAO. Roma. 154.
- Puig, E. R., C. F. J. Pérez, M. A. Franch, B. C. Castellote, F. J. Permanyer, P. M. Izquierdo y E. M. Castell. 2001. Efecto de los Flavonoides de Cacao Sobre la Expresión Génica de Citocinas Inflamatorias y la Secreción de Óxido Nítrico.
- Puig, E. R., M. A. Franch, B. C. Castellote, A. C. Lacueva, P. M. Izquierdo y E. M. Castell. 2000. Influencia de la Epicatequina y de Extracto de Cacao Sobre el Inicio de la Respuesta Inmune Específica. *J Nutr* 2000; 130:2115-9.
- Putnam, D. E., C. G. Schwab, M. T. Socha, N. L. Whitehouse, N. A. Kierstead y B. D. Garthwaite. 1997. Effect of Yeast Culture in the Diets of Early Lactation Dairy Cows on Ruminal Fermentation and Passage of Nitrogen Fractions and Amino Acids to the Small Intestine. *Journal of Dairy Science*. 80:374-384.
- Qi, K., C. D. Lu, y F. N. Owens. 1993. Sulfate supplementation of growing goats: Effects on performance, acid-base balance, and nutrient digestibility. *J. Anim. Sci.* 71:1579-1587.
- Quezada, N., M. Asencio, J. M. del Valle, J. M. Aguilera y B. Gómez. 2004. Antioxidant activity of crude extract, alkaloid fraction, and flavonoid fraction from Boldo (*Peumus boldus* Molina) leaves. *Journal of Food Science*. 69(5):c371-376.
- Ramiro-Puig E., F.J. Pérez-Cano, A. Franch-Masferrer, C. Castellote-Bargallo, J. Permanyer-Fábregas, M. Izquierdo-Pulido y M. Castell-Escuer. 2005. Efecto de los flavonoides de cacao sobre la expresión genética de citocinas inflamatorias y la secreción de óxido nítrico. Componentes no nutricionales bioactivos. I Congreso. 9-11 Marzo. Fesnad 2005. Nutrición Hospitalaria. Volúmen 20, Suplemento 1. Madrid, España. pp. 141.
- Ramos, J., A. Elías & F. Herrera. 2005. Efecto de cuatro fuentes energéticas en la fermentación en estado sólido (FES) de la caña de azúcar. I Congreso Internacional de Producción Animal. La Habana, Cuba. P 298-302.
- Reddy, P. G., J. L. Morrill, H. C. Minocha and J. S. Stevenson. 1987. Vitamin E is immunoestimulatory in calves. *J. Dairy Sci.* 70: 993-999.
- Reddy, R. R. and D. A. Prasad. 1982. Studies on improving nutritive values of sugarcane tops with urea or dried poultry waste by ensiling techniques. *Ind. J. Anim. Sci.* 52:524.
- Reid, I. D. 1983. Effects of Nitrogen Supplements on Degradation of Aspen Wood Lignin and Carbohydrate Components by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*. 45(3):830-837.
- Reid, I. D. 1985. Biological Delignification of Aspen Wood by Solid-State Fermentation with the White-Rot Fungus *Merulius Tremellosus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 50(1):133-139.

- Reyes, J., R. García, J. Capdevila, P. Ponce, A. Elías y D. Mora. 1993. Utilización de pienso a base de Saccharina en vacas en pastoreo. *Rev. cubana Cienc. Agric.* 27:261.
- Rihani, N., W.N. Garret and R.A. Zinn. 1993. Influence of level of urea and method of supplementation on characteristics of digestion of high-fiber diets by sheep. *J. Anim. Sci.* 71: 1657-1665.
- Rivera M., M. T. 2005. La Zeolita en la Alimentación de Ovinos: Parámetros Ruminales y Producción de Gas in vitro. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Chihuahua. México.
- Rodríguez M., C., A. Becerra B., C. Arzola A., O. Ruíz B. y J. Jiménez C. 2005. Producción de Proteína Microbial Mediante la Fermentación con Levaduras a Partir de Subproductos de Manzana. XIX Reunión de la Asociación Latinoamericana de Producción Animal. pp. 527-528.
- Rodríguez M., C., A. Meléndez N., J. F. Lucero A., H. E. Rodríguez R., C. Hernández G. y C. Arzola A. 2006a. Elaboración de Bloques Multinutricionales Fraguados con o sin Manzarina. Memorias, XXXIV Reunión Anual de la Asociación Mexicana de Producción Animal y X Reunión Bienal del Grupo Norte Mexicano de Nutrición Animal. pp. 170-173.
- Rodríguez M., C., D. Díaz P., F. Salvador T., A. D. Alarcón R. y J. A. Jiménez C. 2006b. Efecto del Nivel de Urea y Pasta de Soya en la Fermentación en Estado Sólido de Subproductos de Manzana. Memorias, XXXIV Reunión Anual de la Asociación Mexicana de Producción Animal y X Reunión Bienal del Grupo Norte Mexicano de Nutrición Animal. pp. 316-318.
- Rodríguez M., C., J. F. Lucero A., A. Meléndez N., H. E. Rodríguez R., C. Hernández G. y O. Ruíz B. 2006c. Consumo de Forraje y Ganancia de Peso de Becerros Comerciales para Exportación, Suplementados con Bloques Multinutricionales Elaborados con Manzarina. Memorias, XXXIV Reunión Anual de la Asociación Mexicana de Producción Animal y X Reunión Bienal del Grupo Norte Mexicano de Nutrición Animal. pp. 195-198.
- Rodríguez, E. J., V. G. Carande y V. A. Rodríguez. 1985. Efectos de la restricción y la realimentación sobre la concentración de metabolitos sanguíneos. *Prod Anim* 5: 12-13.
- Rodríguez, M. C. 2007. Programa UACH-FPRMULACION, Comunicación personal.
- Rodríguez, Z., A. Elías, R. Bocourt y O. Núñez. 2001a. Efectos de los Niveles de Nitrógeno Ureico en la Síntesis Proteica Durante la Fermentación de Mezclas de Caña (*Saccharum officinarum*) y Boniato (*Ipomea batata* Lam.). *Revista Cubana de Ciencia Agrícola.* 35(1):29-36.
- Rodríguez, Z., R. Bocourt, A. Elías y M. Madera. 2001b. Dinámica de Fermentación de Mezclas de Caña (*Saccharum officinarum*) y Boniato (*Ipomea batata*). *Revista Cubana de Ciencia Agrícola.* 35(2):147-151.
- Rolz, C., R. de León, M. C. de Arriola y S. de Cabrera. 1986. Bidelignification of Lemon Grass and Citronella Bagasse by White-Rot Fungi. *Applied and Environmental Microbiology.* 52(4):607-611.

- Ruano J., J. López-Miranda, C. Marín, P. Gómez, J.A. Moreno, F. Fuentes, B. Cortés, A. Lozano, P. Pérez-Martínez y F. Pérez-Jiménez. 2005. La ingesta aguda de un desayuno basado en aceite de oliva con alto contenido de polifenoles mejora la función endotelial en el periodo postprandial. Componentes no nutricionales bioactivos. I Congreso. 9-11 Marzo. Fesnad 2005. Nutrición Hospitalaria. Volúmen 20, Suplemento 1. Madrid, España. pp. 140.
- Ruiz De H., C. Cañaque, E. Anega, y S. Velasco. 2000. Morfología de la canal ovina. En: Metodología para el estudio de la calidad de la canal y de la carne en rumiantes. V, Cañaque y C. Sañudo. Instituto Nacional de Investigaciones y Tecnología Agraria y Alimentaria. Madrid, España.
- Ruiz, C. J., M. Ruiz, G. Ruiz y V. Torres. 2002. Effect of Inclusion of Ammonium Sulfate on the Elaboration of Rustic Saccharina. Cuban Journal of Agricultural Science. 36(2):147-152.
- Rumsey, T. S. 1978. Ruminant fermentation products and plasma ammonia of fistulated steers fed apple pomace-urea diets. J. Anim. Sci. 47:967.
- SAGARPA, 2007. Sistema integral de información agroalimentaria y pesca del Estado de Chihuahua.
- SAS. Institute. 2002. SAS. User's Guide. SAS Institute Inc. Cary, NC.
- Satter, L. D. y L. Slyter. 1974. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production in vitro. Br. J. Nutr. 32, 194-208.
- Scocco, P., P. Ceccarelli, R. Gatti y A. Catorci. 2007. Use of a Geographic Information System to Evaluate Morphometric Variations of Rumen Papillae Related to Diet and Pasture Vegetative Cycle. Veterinaria Italiana. 43(3):425-429.
- Setter, L.D. and R.E. Roffler. 1981. Influence of nitrogen and carbohydrate inputs on rumen fermentation. En: recent developments in ruminant nutrition. Butterworths. Wisconsin USA.
- Shay, L. K. and G. H. Wagner. 1985. Improved fermentation process for producing *Torula*. Food Technol. (29) 61-66.
- Shen, Z., H. M. Seyfert, B. Löhrke, F. Schneider, R. Zitnan, A. Chudy, S. Kuhla, H. M. Hammon, J. W. Blum, H. Martens, H. Hagemeyer y J. Voigt. 2004. An Energy-Rich Diet Causes Rumen Papillae Proliferation Associated with More IGF Type 1 Receptors and Increased Plasma IGF-1 Concentrations in Young Goats. The Journal of Nutrition. 134:11-17.
- Shirley, R.L. 1986. Nitrogen and energy nutrition of ruminants. Animal feeding and nutrition a series of monographs. Academic Press, Inc.
- Silva, A. N. J. 2006. Ganancia de peso y evaluación de la canal en ovinos de pelo. Tesis de maestría. Facultad de Zootecnia. Universidad Autónoma de Chihuahua, Chihuahua, Chih. Méx.

- Silveira-Rodríguez, M. B., S. Monereo-Megías y B. Molina-Baena. 2003. Alimentos Funcionales y Nutrición Óptima. ¿Cerca o Lejos? *Revista Española de Salud Pública*. 77(3): 317-331.
- Smith, R.H. 1982. The ARC System for assessing the nitrogen value of feeds for ruminants forage protein in ruminant of animal production.
- Soccol, C. and L. Vandenberghe. 2003. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. *Biochemical Engineering Journal*. 13: 205-218.
- Stopar, M., U. Bolcina, A. Vanzo y U. Vihousek. 2002. Lower Crop Load for Cv. Jonagold Apples (*Malus x domestica* Borkh) Increases Polyphenol Content and Fruit Quality. *J. Agric. Food Chem.* 50(6): 1643-1646.
- Stringer, D.A. 1985. Acceptance of a single cell protein for animal feeds in comprehensive Biotechnology. Murray Mo-Young (Ed). Toronto Canadá.
- Sturza, R. C. M., C. R. Soccol, B. Marin, R. J. S. Freitas, Dkubiski and V. Flores. 1997. Protein enrichment of apple pomace by solid state fermentation-up-gradation of agro-industrial products-wastes, Kluwer Academic Publishers, London. Pp. 257-271.
- Suárez, B. J., C. G. Van Reenen, N. Stockhofe, J. Dijkstra y W. J. J. Gerrits. 2007. Effect of Roughage Source and Roughage to Concentrate Ratio on Animal Performance and Rumen Development in Veal Calves. *Journal of Dairy Science*. 90:2390-2403.
- Surh, Y. J., J. K. Kundu, H. K. Na y J. S. Lee. 2005. Redox-sensitive transcription factors as prime targets for chemoprevention with anti-inflammatory and antioxidative Phytochemicals. *J. Nutr.* 135: 2993S- 3001S.
- Sutton, J. D. 1989. Altering Milk Composition by Feeding. *J. Dairy Sci.* 72:2801-2814.
- Szöllösi R. y I. S. Varga. 2002. Total antioxidant power in some species of Labiatae (Adaptation of FRAP method). *Proceedings of the 7th Hungarian Congress on Plant Physiology, 2002* S2-P24. 46(3-4):125-127, 2002.
- Takagi, H. y K. Nakano. 1983. The effect of vitamin A depletion on antigenstimulated trapping of peripheral lymphocytes in local lymph nodes of rats. *Immunology* 48:123.
- Taylor, K. A. C. C. 1996. A Simple Colorimetric Assay for Muramic Acid and Lactic Acid. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 56:49-58.
- Tepper, R. 2002. Efectos de la Nutrición Sobre la Calidad de Leche. Alltech Venezuela. Disponible en: www.avpa.ula.ve/docuPDFs/jornada_leche_III/efectos_de_la_nutricion_calidad_leche.pdf. Accesado en Mayo 24, 2006.

- Theodorou M K, Williams B. A., Dhanoa M. S., McAllan A. B. y France J 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. Anim. Feed. Sci. Techno. 48: 185-197.
- Tilley, J. and R. A. Terry. 1963. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. J. Brit. Grassld. 18:104.
- Tizard, I. 1984. Inmunología Veterinaria. Segunda Edición. Editorial Interamericana. México.
- Traeder, W. 2004. A comparison of the protection against new infections of udders during the dry period with the antibiotic free teat sealer Oberseal and Benestermycin. Tierärztliche Umschau 59(5):286-293.
- Tschopp, J. C., V. G. Müller, S. Gervasio, G. Malinskas y R. L. Althaus. 1998. Mejora en el perfil hemático del vacuno lechero mediante la utilización de alimento balanceado en la dieta. Prod Anim 18: 334-335.
- Ullrey, D. E., E. R. Miller, C. H. Long y B. H. Vincent. 1965. Sheep hematology from Birth to Maturity II. Leukocyte Concentration and Differential Distribution. Journal of Animal Science. 24:141-144.
- UNIFRUT, Unión Agrícola Regional de Fruticultores del Estado de Chihuahua. 2007.
- USDA. 2007. National Nutrient Database for Standard Reference, Release 20. Estados Unidos de Norteamérica. Disponible en <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>. Accesado el 29/Jul/2008.
- Valdivié, M., A. Castro, L. González y A. Elías. 1996. Alimentación de pollos de engorde con sacchasoyamaíz rústica sin inocular. Rev. Cubana Sci. Agric. 30:189.
- Valdivié, M., L. A. González y A. Elías. 1997. Nuevos tipos de saccharina para aves. Rev. Cubana Cienc. Agric. 31:231.
- Valiño E, Elías A, E. Alvarez, E. Regalado. J. Cordero. 1992. Dinámica de crecimiento de la microbiota de la caña de azúcar durante la obtención de Saccharina. Rev. Cubana de Cienc. Agric. 26:297.
- Valiño, E. A. Elías, E. Álvarez, M. Quintana M. Montes de Oca. 1989. Identificación de especies de bacterias aisladas del proceso de obtención de la Saccharina. Taller Nacional de Saccharina. Informe Central Instituto de Ciencia Animal, La Habana.
- Valiño, E., A. Elías, E. Álvarez, y N. Albelo. 1996. Caracterización del funcionamiento de la cámara de fermentación para la producción de Saccharina. Rev. Cubana Cienc. Agric. 30:67.

- Valiño, E., A. Elías, V. Torres y N. Albelo. 2002. Study of the Microbial Content on Fresh Sugar Cane Bagasse as Substrate for Animal Feeding by Solid State Fermentation. *Cuban Journal of Agricultural Science*. 36(4):359-364.
- Valiño, E., A. Elías, E. Álvarez., M. Quintana y N. Montes de Oca. 1994. Composición de especies de bacterias aisladas del proceso de obtención de la Saccharina. 1. Bacterias gram negativas. *Rev. Cubana*.
- Van Soest, P. J. 1982. *Nutritional Ecology of the Ruminant*. O. & B. Books, Inc. Estados Unidos de América.
- Van Soest, P. J. 1967. Development of a comprehensive system of feed analyses and its application to forages. *J. Anim. Sci.* 28:119-128.
- Van Soest, P. J., J. B. Robertson, B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides (NSP) in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74, 3583–3597.
- Villegas, de G. A. 2004. *Tecnología Quesera*. Primer Edición. Trillas. México.
- Vivas, N. J. y J. Carvajal. 2004. Saccharina Rústica una Aplicación Biotecnológica para la Alimentación Animal. *Revista de Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad del Cauca*. 2(1):43-48. Disponible en <http://www.unicauca.edu.co/biotecnologia/ediciones/vol2/Art25.pdf>. Accedido el 24/Jul/2008.
- Walker, N., M. Cintora, H. Durand e Y. LeTreur. 2008. Influence of a Live Yeast on the Faecal Microflora of Gestation and Lactating Sows. *Journal of Animal Science*. 86(E-Suppl. 2). *Journal of Dairy Science*. 91(E-Suppl. 1). p. 293.
- Wang, D., Y. Xu, J. Ju and G. Shao. 2004. Fermentation kinetics of different sugars by apple wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Inst. Brew.* 110(4), 340-346.
- Wang, Z., M. L. Eastridge y X. Qiu. 2001. Effects of Forage Neutral Detergent Fiber and Yeast Culture on Performance of Cows During Early Lactation. 84:204-212.
- Wattiaux, M. A. 2005. Mastitis: prevención y detección. Madison, Instituto Babcock. Disponible en: <http://babcock.cals.wisc.edu/downloads/de/24.es.pdf>. Accesado Octubre 24, 2005.
- Weber, G. G. 1995. Micronutrientes e Inmunidad. II. Vitaminas. Department of Vitamin and Nutrition Research. XI Curso de Especialización FEDNA. Barcelona, España. Disponible en: http://www.etsia.upm.es/fedna/capitulos/95CAP_IX_2.pdf. Accesado en Mayo 24, 2006.
- Weedman, S., M. Rostagno, J. Patterson, A. Kiess y S. Eicher. 2008. Intestinal Microbial Effects of Yeast Products on Weaned and Transport Stressed Pigs. *Journal of Animal Science*. 86(E-Suppl. 2). *Journal of Dairy Science*. 91(E-Suppl. 1). p. 25.

- Weimberg, E. D. 1977. *Microorganisms and minerals*. Ed. Marcell Dekker. New York. Pág. 101.
- Weiss, W. P. y D. C. Mahan. 2008. Oxidative Stress During the Lifecycle of Animals. *Journal of Animal Science*. 86(E-Suppl. 2). *Journal of Dairy Science*. 91(E-Suppl. 1). p. 383.
- Weiss, W. P., J. S. Hogan, K. L. Smith, y K. H. Hoblet. 1990. Relationships Among Selenium, Vitamin E, and Mammary Gland Health in Commercial Dairy Herds. *J Dairy Sci* 1990 73: 381-390.
- Weiss, W. P., J. S. Hogan, K. L. Smith, y S. N. Williams. 1994. Effect of Dietary Fat and Vitamin E on - Tocopherol and β -Carotene in Blood of Peripartum Cows. *J Dairy Sci* 1994 77: 1422-1429.
- Whanger, P. D, P. H. Weswig, J.E. Olfield. 1978. Selenium sulfur and nitrogen levels on ovine rumen microorganisms. *J. Nim. Sci.* 46:515-519.
- Wohlt, J. E., T. T. Corcione y P. K. Zajac. 1998. Effect of Yeast on Feed Intake and Performance of Cows Fed Diets Based on Corn Silage During Early Lactation. *Journal of Dairy Science*. 81:1345-1352.
- Woolford, M. W., J. H. Williamson, A. M. Day y P. S. A. Copeman. 1998. The prophylactic effect of a teat sealer on bovine mastitis during the dry period and the following lactation. *Vet. J.* 46(1):12-19.
- Wright, T., S. Moscardini, P. Luimes, P. Susmel y B. McBride. 1998. Effects of Rumen-Undegradable Protein and Feed Intake on Nitrogen Balance and Milk Protein Production in Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 81: 784 – 793.
- Yacoub, S. E., U. Y. Kashmula y R. H. Nasser. 1990. Effect of using singlecell proteins on growth and carcass characteristics of Karadi lambs. *Mesopotamia J. Agric.* (22) 153-169.
- Yurttas, H. C., H. W. Schafer y J. J. Warthesen. 2000. Antioxidant activity of nontocopherol hazelnut (*Corylus spp.*) phenolics. *Journal of Food Science*. 65(2):276-280.
- Zimmerman, C. A., A. H. Rakes, R. D. Jaquette, B. A. Hopkins y J. Croom Jr. 1991. Effects of Protein Level and Forage Source on Milk Production and Composition in Early Lactation Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 74: 980-990.

**More
Books!** 



yes
I want morebooks!

Buy your books fast and straightforward online - at one of the world's fastest growing online book stores! Environmentally sound due to Print-on-Demand technologies.

Buy your books online at
www.get-morebooks.com

¡Compre sus libros rápido y directo en internet, en una de las librerías en línea con mayor crecimiento en el mundo! Producción que protege el medio ambiente a través de las tecnologías de impresión bajo demanda.

Compre sus libros online en
www.morebooks.es

OmniScriptum Marketing DEU GmbH
Bahnhofstr. 28
D - 66111 Saarbrücken
Telefax: +49 681 93 81 567-9

info@omniscrptum.com
www.omniscrptum.com

OMNIScriptum



