

**ESTIMACION DE BIOMASA PRODUCIDA A PARTIR DE HARINA DE YUCA  
POR BACTERIAS AMILOLITICAS AISLADAS DE INTESTINO TENUE DE  
POLLO TIPO BROILER**

**ANDRES MAURICIO BETANCOURT JURADO**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO  
FACULTAD DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL  
PROGRAMA DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL  
SAN JUAN DE PASTO**

**2006**

**ESTIMACION DE BIOMASA PRODUCIDA A PARTIR DE HARINA DE YUCA  
POR BACTERIAS AMILOLITICAS AISLADAS DE INTESTINO TENUE DE  
POLLO TIPO BROILER**

Por:

**ANDRES MAURICIO BETANCOURT JURADO**

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar el titulo Ingeniero  
Agroindustrial

Asesor:

**ALVARO PAZOS MONCAYO**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO  
FACULTAD DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL  
PROGRAMA DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL  
SAN JUAN DE PASTO**

**2006**

**Nota de aceptación.**

---

---

---

---

---

---

---

**JACQUELINE MENA**

**Jurado.**

---

**OSCAR ARANGO**

**Jurado**

---

**ALVARO PAZOS MONCAYO**

**Asesor**

**San Juan de Pasto, Febrero de 2006**

“Las ideas y conclusiones aportadas en el presente trabajo de grado son  
responsabilidad exclusiva de sus autores”

Artículo 1°. Del acuerdo No. 324 del 11 de octubre de 1996, emanado del  
honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño

## **AGRADECIMIENTOS**

El autor expresa su agradecimiento a:

Álvaro Pazos, M.Sc. Microbiología, Profesor Departamento de Biología de la Universidad de Nariño.

Andrés Hurtado, Ph. D., Profesor Programa de Ingeniería Agroindustrial.

Pablo Fernández, Candidato, Ph.D, Profesor Departamento de Biología Universidad de Nariño.

Elia Janeth Burbano, Ingeniera Agroindustrial, Fundación EMSSANAR.

Guido Villota, Biólogo con énfasis en Microbiología industrial, asistente del laboratorio de microbiología Universidad de Nariño.

Angel Zamora, Licenciado en Química, asistente de laboratorio de Química, Universidad de Nariño.

Jairo España, Zootecnista, asistente de laboratorio, Microbiología, Facultad de ciencias Pecuarias, Universidad de Nariño.

Neida Chavez, Coordinadora Programa de Sanidad Avícola FENAVI – FONAV - ICA

María Elena Solarte. M. Sc. Profesor del Departamento de Biología de la Universidad de Nariño.

Sección de Laboratorios de la Universidad de Nariño.

Sistema de Investigaciones, Universidad de Nariño

**AVÍCOLA RUANO**

A todas las personas que de una u otra forma ayudaron al desarrollo de esta investigación.

## CONTENIDO

|                                       | Pág. |
|---------------------------------------|------|
| INTRODUCCIÓN                          | 1    |
| 1. OBJETIVOS                          | 5    |
| 1.1 Objetivo general                  | 5    |
| 1.2. Objetivos específicos            | 5    |
| 2. MARCO TEÓRICO                      | 6    |
| 2.1 LA YUCA                           | 6    |
| 2.1.1 Generalidades.                  | 6    |
| 2.1.2 Valor Nutritivo de la Yuca      | 7    |
| 2.1.3 Utilización                     | 8    |
| 2.1.4 La harina de yuca               | 10   |
| 2.2 SUERO LACTEO                      | 16   |
| 2.3 MELAZA                            | 18   |
| 2.4. UREA                             | 20   |
| 2.5 LA FERMENTACIÓN                   | 21   |
| 2.5.1. Bioquímica de la fermentación. | 23   |
| 2.5.2. Fermentación de yuca           | 23   |
| 2.6. PROTEÍNA UNICELULAR – SCP        | 25   |
| 2.6.1 Operaciones Auxiliares          | 26   |
| 2.6.2 Producción de SCP               | 27   |

|                                                                                              |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.6.3 El canal digestivo como habitat de microorganismos                                     | 28 |
| 2.7. NUTRICIÓN AVIAR                                                                         | 31 |
| 2.7.1 Aparato digestivo                                                                      | 31 |
| 2.7.2 Digestión                                                                              | 32 |
| 2.7.3 Absorción y metabolismo                                                                | 33 |
| 2.7.4 Energía                                                                                | 34 |
| 2.7.5 Raciones alimenticias                                                                  | 38 |
| 3. METODOLOGÍA                                                                               | 43 |
| 3.1 FASE I. AISLAMIENTO DE BACTERIAS AMIOLÍTICAS DE INTESTINO<br>TENUE DE POLLO TIPO BROILER | 43 |
| 3.1.1 Propagación                                                                            | 43 |
| 3.1.2. Aislamiento                                                                           | 45 |
| 3.1.3. Purificación                                                                          | 46 |
| 3.1.4. Identificación del Género                                                             | 46 |
| 3.1.5. Conservación                                                                          | 46 |
| 3.1.6 Activación                                                                             | 47 |
| 3.2. FASE II. DETERMINACIÓN DEL AISLADO CON MAYOR CAPACIDAD<br>AMIOLÍTICA                    | 47 |
| 3.3. FASE III. DISEÑO DEL MEDIO DE CULTIVO                                                   | 48 |
| 3.3.1 Obtención de materias primas                                                           | 48 |
| 3.3.2 Relación Carbono – Nitrógeno                                                           | 50 |
| 3.3.3. Condiciones de cultivo.                                                               | 51 |
| 3.3.4. Parámetros de fermentación.                                                           | 52 |

|                                                                                              |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.3.5. Evaluación de los parámetros de fermentación                                          | 54 |
| 3.3.6. Determinación del procedimiento para recuperación de proteína unicelular              | 54 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN                                                                    | 55 |
| 4.1 FASE I. AISLAMIENTO DE BACTERIAS AMIOLÍTICAS DE INTESTINO<br>TENUE DE POLLO TIPO BROILER | 55 |
| 4.1.1 Propagación, Aislamiento y Purificación                                                | 55 |
| 4.1.2. Identificación del Género                                                             | 59 |
| 4.1.3 Conservación                                                                           | 60 |
| 4.2. FASE II. DETERMINACIÓN DEL AISLADO CON MAYOR CAPACIDAD<br>AMIOLÍTICA                    | 61 |
| 4.3 FASE III. DISEÑO DEL MEDIO DE CULTIVO                                                    | 63 |
| 4.3.1. Obtención de Materias Primas                                                          | 63 |
| 4.3.2. Condiciones de cultivo                                                                | 72 |
| 4.3.3. Fermentación en matraz.                                                               | 74 |
| 4.3.4. Evaluación de Parámetros de Fermentación                                              | 75 |
| 4.3.5. Condiciones Óptimas de Fermentación                                                   | 85 |
| 4.3.6. Evaluación de la Fermentación Optima                                                  | 86 |
| 4.3.7. Determinación del procedimiento para recuperación de proteína unicelular              | 88 |
| 5. CONCLUSIONES                                                                              | 90 |
| 6. RECOMENDACIONES                                                                           | 92 |
| BIBLIOGRAFÍA                                                                                 | 93 |
| ANEXOS                                                                                       | 98 |

## LISTA DE TABLAS

|                                                                                                                                                                                             | pág. |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Tabla 1. Composición química de raíz de yuca ( <i>Manihot esculenta</i> crantz) y Follaje                                                                                                   | 8    |
| Tabla 2. Composición de la harina de yuca                                                                                                                                                   | 11   |
| Tabla 3. Propiedades de las fracciones de almidón                                                                                                                                           | 12   |
| Tabla 4. Composición suero lácteo                                                                                                                                                           | 16   |
| Tabla 5. Composición química melaza                                                                                                                                                         | 19   |
| Tabla 6. Microbiota normal de gallinas y pollos                                                                                                                                             | 29   |
| Tabla 7. Análisis bromatológico de alguna fuentes de energía.                                                                                                                               | 36   |
| Tabla 8. Composición proteica y aminoácidos de algunos alimentos                                                                                                                            | 36   |
| Tabla 9. Composición de los raciones para aves tipo Broiler según su fase fisiológica de desarrollo                                                                                         | 40   |
| Tabla 10. Patrón dietario de pollos tipo Broiler                                                                                                                                            | 41   |
| Tabla 11. Necesidades de proteínas y aminoácidos esenciales para aves de engorde tipo Broiler (como porcentaje en la ración)                                                                | 42   |
| Tabla 12. Frecuencia de características morfológicas en la propagación y aislamiento para los microorganismos Gram positivos sobre agar MRS modificado con azul de anilina y agar nutritivo | 58   |
| Tabla 13. Bacterias que presentaron crecimiento sobre medios que contienen almidón                                                                                                          | 59   |

|           |                                                                                                         |    |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabla 14. | Pruebas bioquímicas para los aislados con actividad amilolítica                                         | 60 |
| Tabla 15. | Capacidad amilolítica de los aislados                                                                   | 62 |
| Tabla 16. | Condiciones de operación de la unidad de secado                                                         | 64 |
| Tabla 17. | Flujograma de proceso obtención suero de leche                                                          | 69 |
| Tabla 18. | Parámetros para control de calidad organoléptico, fisicoquímico y microbiológico de leche entera cruda  | 71 |
| Tabla 19. | Parámetros de control de calidad organoléptico, fisicoquímico y microbiológico de suero desproteinizado | 71 |
| Tabla 20. | Matriz composicional para la optimización del sustrato por 100 ml                                       | 75 |
| Tabla 21. | Producción de biomasa para P2-2 en los 18 fermentos en $T = 8$                                          | 76 |
| Tabla 22. | Resultados Estimados para la Variable de Respuesta (Biomasa)                                            | 77 |
| Tabla 23. | Análisis de Varianza para la Variable de Respuesta (Biomasa)                                            | 79 |
| Tabla 24. | Coeficiente de Regresión para Biomasa                                                                   | 79 |
| Tabla 25. | Coeficiente de Regresión para Biomasa                                                                   | 80 |
| Tabla 26. | Predicción de Biomasa                                                                                   | 81 |
| Tabla 27. | Optimización del modelo                                                                                 | 82 |
| Tabla 28. | Condiciones óptimas de Fermentación                                                                     | 85 |

## LISTA DE GRÁFICAS

|                                                                                                           | pág. |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Gráfica 1. Promedios de halos de hidrólisis de almidón para las bacterias amilolíticas y prueba de Tukey  | 63   |
| Gráfica 2. Curva de Secado: Peso del Producto (g) Vs Tiempo (min)                                         | 68   |
| Gráfica 3. Curva de Secado: Humedad (%) Vs Tiempo (min)                                                   | 68   |
| Gráfica 4. Curva de Absorbancia Espectral para Caldo Almidón Estéril                                      | 72   |
| Gráfica 5. Cinética de crecimiento para el aislado P2-2 en caldo almidón                                  | 73   |
| Gráfica 6. Evaluación de pH en la cinética de crecimiento de P2-2 sobre caldo almidón                     | 74   |
| Gráfica 7. Diagrama de Pareto                                                                             | 77   |
| Gráfica 8. Efectos medios para Biomasa                                                                    | 78   |
| Gráfica 9. Interacciones para la producción de biomasa                                                    | 80   |
| Gráfica 10. Superficie de respuesta                                                                       | 81   |
| Gráfica 11. Contornos estimados de superficie de respuesta                                                | 82   |
| Gráfica 12. Producción de biomasa y proteínas, y consumo de azúcares del aislado P2-2 en los 18 fermentos | 83   |
| Gráfica 13. Rendimiento Biomasa/Sustrato                                                                  | 83   |
| Gráfica 14. Rendimiento Proteína/Sustrato                                                                 | 84   |
| Gráfica 15. Rendimientos Biomasa/Sustrato y Proteína/Sustrato                                             | 85   |
| Gráfica 16. Cinética de Crecimiento para el Aislado P2-2 sobre el Medio Optimizado                        | 86   |

|                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Gráfica 17. Producción de Proteínas y Formación de Biomasa del Aislado P2-2 sobre medio optimizado   | 87 |
| Gráfica 18. Consumo de Azúcares y Producción de Proteínas del Aislado P2-2 sobre el medio optimizado | 88 |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                 | pág. |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Figura 1. Utilización de las raíces de yuca                                                                                                     | 9    |
| Figura 2. Diagrama de flujo elaboración harina de yuca                                                                                          | 15   |
| Figura 3. Esquema general de las fermentaciones                                                                                                 | 22   |
| Figura 4. Formación a partir de ácido pirúvico de algunos de los principales<br>productos finales de la fermentación bacteriana de los azúcares | 23   |
| Figura 5. Energía suministrada por los alimentos a las aves de engorde.                                                                         | 35   |
| Figura 6. Diagrama de flujo para el Proceso de Recuperación de SCP                                                                              | 89   |

## LISTA DE FOTOGRAFÍAS

|                                                                                                                     | pág. |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Fotografía 1. Proceso de Disección                                                                                  | 44   |
| Fotografía 2. Proceso de extracción de intestino tenue                                                              | 44   |
| Fotografía 3. Morfología macroscópica para microorganismos viables sobre Agar<br>MRS modificado con azul de anilina | 55   |
| Fotografía 4. Morfología macroscópica para microorganismos viables sobre agar<br>nutritivo                          | 56   |
| Fotografía 5. Tinción de Gram de cultivo contaminado con bacterias Gram negativas                                   | 56   |
| Fotografía 6. Tinción de Gram para cultivo axénico del género <i>Bacillus</i>                                       | 57   |
| Fotografía 7. Cultivos stock de los diferentes aislados                                                             | 61   |
| Fotografía 8. Cultivos madre de los diferentes aislados                                                             | 61   |
| Fotografía 9. Capacidad amilolítica de los aislados                                                                 | 62   |

## ANEXOS

|                                                                                                                                                                     | pág. |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Anexo A. Medios de cultivo                                                                                                                                          | 99   |
| Anexo B. Técnicas de tinción                                                                                                                                        | 102  |
| Anexo C. Control de calidad microbiológico                                                                                                                          | 103  |
| Anexo D. Control de calidad fisicoquímico                                                                                                                           | 107  |
| Anexo E. Determinacion de proteina - metodo de lowry                                                                                                                | 108  |
| Anexo F. Determinación de azúcares totales - metodo de antrona                                                                                                      | 109  |
| Anexo G. Datos proceso de secado                                                                                                                                    | 110  |
| Anexo H. Lectura espectral para el caldo almidón estéril                                                                                                            | 111  |
| Anexo I. Producción de proteína y consumo de azúcares de <i>Bacillus cereus</i> en sustratos con diferentes concentraciones de harina de yuca, melaza y urea en T=8 | 112  |
| Anexo J. Rendimiento biomasa/sustrato en las 18 fermentaciones                                                                                                      | 113  |
| Anexo K. Rendimiento proteína sustrato en las 18 fermentaciones                                                                                                     | 114  |

## **GLOSARIO**

**ACTIVIDAD ACUOSA** : expresa la disponibilidad relativa del agua en una sustancia. El agua pura tiene una actividad acuosa de 1,0

**AEROBIO** : microorganismo capaz de usar oxígeno en la respiración.

**AGENTE PROBIÓTICO** : monocultivo o mezcla de microorganismos vivos que al ser ingeridos por el hombre o los animales actúa benéficamente, mejorando el balance microbiano y las propiedades de la microflora del intestino.

**ALMIDÓN** polisacárido que se desdobra en moléculas más sencillas hasta llegar a glucosa

**AMILASA** : enzimas que transforman el almidón en maltosa.

**ANAEROBIO** : organismo que no puede usar oxígeno en la respiración y cuyo crecimiento puede ser inhibido por el oxígeno.

**BACILO** : bacteria de forma cilíndrica.

**BACTERIA** : grupo de procariotas filogenéticamente relacionados y distinto del grupo Archaea.

**BIOCONVERSION** : utilización de los microorganismos para realizar una reacción química que es más costosa de otro modo, o que solo se puede hacer microbiológicamente.

**BIOMASA** : o masa celular, se puede estudiar mediante diversos métodos dependiendo del microorganismo que se trate.

**BIOTECNOLOGIA** : uso de organismos vivos para llevar a cabo procesos químicos definidos, de aplicación industrial.

**CEPA** : población de microorganismos que descende de un único microorganismo o de un cultivo puro

**CRECIMIENTO** : incremento en el número de células.

**CRECIMIENTO EXPONENCIAL** : crecimiento de un microorganismo en que el número de células se duplica en un periodo fijado de tiempo.

**COLONIA** : grupo o conjunto de microorganismos que se multiplican sobre una superficie sólida, como la de un medio de cultivo con agar. La colonia se observa a menudo directamente, pero también puede verse solamente con microscopio

**CULTIVO AXENICO (PURO)** : cultivo conteniendo una única clase de microorganismos.

**CULTIVO DISCONTINUO** : cultivo de microorganismos producido al inocular un medio de cultivo en un sistema cerrado, es decir, sin una renovación de nutrientes, ni eliminación de los residuos durante la incubación.

**DNA** : ácido desoxiribonucleico, el material hereditario de las células y algunos virus.

**DESNATURALIZACION** : destrucción de las propiedades conformacionales de una proteína ocasionando, en general, la pérdida de actividad biológica.

**ENDOSPORA BACTERIANA** : forma de resistencia al calor y otras condiciones ambientales, que esta rodeada por una gruesa pared y se origina por la diferenciación de determinadas bacterias Grampositivas.

**ENTEROTOXINA** : toxina que afecta específicamente a las células de la mucosa intestinal, causando vómito y diarrea.

**ENZIMAS** : catalizadores proteicos que funcionan acelerando las reacciones químicas.

**ESTERIL** : ausencia de todos los organismos vivos y los virus.

**FASE DE LATENCIA** : fase que precede a la exponencial de crecimiento, cuando las células pueden estar metabolizando pero no están creciendo.

**FASE ESTACIONARIA** : periodo inmediatamente posterior a la fase exponencial, cuando la velocidad de crecimiento se hace cero.

**FERMENTACION** : catabolismo anaeróbico en el que un compuesto orgánico sirve al mismo tiempo como donador y aceptor de electrones y en el que el ATP se produce por fosforilación de sustrato.

**GENERO** : colección de diferentes especies, que comparte una o más (generalmente varias) propiedades principales.

**GENETICA** : herencia y variación de los organismos vivos.

**GRAM NEGATIVA** : tipo de célula procariótica cuya pared contiene relativamente poca cantidad de peptidoglicano, pero que contiene una membrana externa compuesta por liposacáridos, lipoproteínas y otras macromoléculas complejas.

**GRAM POSITIVA** : tipo de célula procariótica cuya pared está compuesta básicamente por peptidoglicano y carece de la membrana externa.

**HIDROLISIS** : descomposición de un polímero en unidades más pequeñas, generalmente monómeros, por adición de agua; digestión.

**INÓCULO** : crecimiento optimizado de células microbianas que van a dar origen a un proceso fermentativo, reconocido como el “material iniciador”.

**LIPIDO** : glicerol unido a ácidos grasos y otros grupos tales como fosfato por unión éster o éter.

**MACROMOLECULA** : polímero de unidades monoméricas covalentemente unidas.

**MESOFILO** : organismo que crece a temperaturas entre 20 y 45° C.

**METABOLISMO** : todas las reacciones bioquímicas de una célula.

**MICROORGANISMO** : organismo microscópico constituido por una sola célula o agrupación de células, incluyendo los virus.

**PATOGENO** : organismo capaz de causar daño a su hospedador, al cual infecta.

**POLISACARIDO** : polímero de unidades de azúcar unidas por enlaces glicosídicos.

**PROTEINA** : polipéptido o grupo de polipéptidos que forman una molécula con función biológica específica.

**PSICROFILO** : organismo con temperatura óptima de crecimiento de 15°C o inferior y una máxima inferior a 20°C.

**TEMPERATURA OPTIMA** : temperatura a la cual el crecimiento es el más rápido posible.

**TERMOFILO** : organismo cuya temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre 45 y 80° C.

**TIEMPO DE DUPLICACIÓN** : tiempo necesario para que una población microbiana duplique su número

**TURBIDIMETRÍA** : método aplicado para realizar el seguimiento del crecimiento microbiano en medios totalmente solubles, la absorbancia de suspensiones celulares se determina en espectrofotómetro a una longitud de onda determinada.

**VIABLE** : capaz de reproducirse.

## RESUMEN

La nutrición de las especies pecuarias es un factor que determina su evolución y desarrollo, se expresa en factores como la ganancia de peso, el incremento de talla y la formación de músculo; es decir que entre mejor y más balanceada la alimentación de un individuo éste tendrá mayor capacidad de expresarla en su desarrollo fisiológico.

Hoy en día la industria y las disciplinas ligadas al desarrollo y la producción de alimentos, destinados a especies pecuarias, como ganado vacuno, cerdos y aves de corral, tienen el reto de proporcionar a ellas materiales alimenticios altamente nutritivos, ricos en proteínas, aminoácidos, carbohidratos y vitaminas, y sobre todo económicos y rentables para sus productores. Es así como las industrias dedicadas a éste campo, se encuentran en la búsqueda de materias primas ricas en nutrientes, pero a la vez económicas, capaces de proporcionar a los individuos nutrientes de fácil absorción, que les permita a éstos un mejor aprovechamiento. De esta manera surge una nueva alternativa de trabajo en el campo nutricional, con la aplicación de la biotecnología y la microbiología industrial, tendientes a obtener productos ricos en proteínas y aminoácidos de fácil absorción, como es la proteína de origen microbiano o proteína unicelular (SCP).

En el presente trabajo las bacterias destinadas a la producción de proteína unicelular se aislaron de intestino tenue de pollos tipo Broiler, para ello se diseccionaron 6 individuos de cuatro semanas de edad y en óptimas condiciones sanitarias; a los cuales se les extrajo el intestino tenue asépticamente, obteniendo 62 aislados viables, de los cuales 55 correspondieron a bacterias Gram positivas y 7 bacterias Gram negativas, estas últimas se descartaron por considerarse potencialmente patógenos. De los 55 aislados, doce crecieron sobre medios que contienen almidón en su composición, destacándose el aislado codificado como P2-2, ya que ante la prueba de significancia de Tukey presentó la mayor capacidad amilolítica. El aislado P2-2 se identificó como *Bacillus cereus*, mediante pruebas bioquímicas que en su conjunto presentaron un perfil compatible con el descrito en Bergey's Manual of Determinative Bacteriology

Mediante un diseño estadístico, que incluyó la metodología de la superficie de respuesta que utiliza un diseño factorial compuesto por puntos centrales y puntos estrella, se

estableció una matriz composicional compuesta por 18 fermentaciones, en la cual se fijaron como variables la composición del medio de cultivo: harina de yuca, urea y melaza, y se determinó como variable de respuesta la producción de biomasa. El análisis estadístico determinó que las condiciones óptimas de concentración de materias primas para la producción de biomasa son: 4.79 g de harina de yuca, 1.00 g de melaza y 1.50 g de urea en 100 ml de diluyente (50 ml de agua estéril y 50 ml de suero desproteinizado fresco). Con esta composición se logró la obtención de 8.195 g de biomasa/100 ml sustrato, 4.4256 g de proteína/100 ml sustrato, con un rendimiento Biomasa/Sustrato de 35.2% y Proteína/Sustrato de 30.39%.

## ABSTRACT

The nutrition of the cattle species is a factor that determines its evolution and development, it is expressed in factors like the gain of weight, the size increment and the muscle formation; that is to say that he/she enters better and more balanced the feeding of an individual this will have bigger capacity to express it in their physiologic development.

Today the industry and disciplines bound to the development and the production of foods, dedicated to cattle species, as bovine livestock, pigs and corral birds, they have the challenge of providing them highly nutrient materials, rich in proteins, amino acids, carbohydrates and vitamins, mainly economic and profitable for their producers. This is the reason why the industries dedicated to this field, are in the search of matters rich in nutrients, at the same time economic, able to provide to the individuals with nutrients of easy absorption that allows them a better use. This way a new work alternative arises in the nutritional field, with the application of the biotechnology and the industrial microbiology, with tendencies to obtain products rich in proteins and amino acids of easy absorption, like the protein of microbial origin or single cell protein (SCP).

In the present work the bacterias dedicated to the production of single cell protein were isolated of delicate intestine of chickens type Broiler, for it they dissected 6 individuals of four weeks of age and under good sanitary conditions; to which were extracted the delicate intestine aseptically, obtaining 62 isolated viable, of which 55 corresponded to bacterias positive Gram and 7 to bacterias negative Gram, these last ones were discarded to be considered pathogens potentially. Of the 55 isolated, twelve grew on means that contain starch in their composition, standing out the isolated one coded as P2-2, that in the test of significancy of Tukey it presented the biggest amylolytic capacity. The isolated one P2-2 was identified *Bacillus cereus*, by means of biochemical tests that presented a compatible profile with the described Bergey's in their group Manual of Determinative Bacteriology.

By means of a statistical design that include the methodology of the answer surface that uses a factorial design composed by central points and start points, a main compositional

composed by 18 fermentations settled down, in which you/they noticed as variables the composition of the means of cultivation: yucca flour, urea and molasses, and it was determined as answer variable the production of biomass. The statistical analysis determined that the good conditions of concentration of raw materials for the production of biomass are: 4.79 g of yucca flour, 1.00 g of molasses and 1.50 g of urea in 100 diluter ml (50 ml of sterile water and 50 ml of serum fresh without proteins. With this composition the obtaining of 8.195 g of biomasa/100 ml sustrato, 4.4256 g of proteína/100 ml sustrato, was achieved with a yield Biomasa/Sustrato of 35.2% and Proteína/Sustrato of 30.39%.

## INTRODUCCIÓN

La yuca (*Manihot esculenta* crantz) constituye una de las más importantes fuentes de carbohidratos en la alimentación humana y animal. Su cultivo se ha difundido ampliamente debido a las características agronómicas y se ha convertido en un elemento clave contra los problemas de nutrición que afectan a varios países en desarrollo. Sin embargo la existencia de ciertas toxinas en algunas variedades debido a la presencia de glúsidos cianogénicos y su carácter altamente perecedero limitan su utilización y aceptación. Las altas temperaturas y humedad relativa de los países tropicales obligan a la implementación de métodos de conservación y aprovechamiento que implican altos costos<sup>1</sup>.

La yuca en nuestro país se consume principalmente cocida, y a partir de este producto reblandecido se elabora una gran cantidad de productos, también es consumida en gran parte como almidón, que mediante procesos de fermentación se transforma en almidón agrio; producto ampliamente empleado en la industria cárnica, de panadería y de extrusados (snaks)<sup>2</sup>.

La yuca, deshidratada y molida se ha empleado como fuente de carbohidratos en la alimentación aviar y porcina, y esta práctica se ha incrementado a escala comercial en América Latina imitando el desarrollo de estos sectores al del Sudeste Asiático, donde tiene lugar la mayor producción de aves de engorde y de cerdos.

El desarrollo de nuevos productos, por su parte, ha recibido mas atención últimamente, debido a la creciente dependencia de los países en desarrollo de la importación de granos y cereales para la fabricación de concentrados<sup>3</sup>.

---

<sup>1</sup> COCK, James H. Programa de Sistemas de Producción de Yuca. Colombia : Centro Internacional de Agricultura Tropical. CIAT, 1984; p. 2 -17

<sup>2</sup> CARDENAS, O. Sour cassava starch production: a preliminary study. En: Food Science. Vol. 45; p. 1509 – 1512

<sup>3</sup> SANTOS, E. La harina de yuca y la soya cocida en la alimentación de aves de postura. Colombia : Instituto Colombiano Agropecuario, ICA, 1996; p. 17 - 53

Por otra parte la articulación de las Cadenas Productivas del país, tienden a fomentar la producción de raíces de yuca, principalmente para ser utilizadas en la industria avícola nacional como respuesta a los altos costos de importación que tienen algunas materias primas que son utilizadas en la formulación de raciones para este sector.<sup>42</sup>

Si bien es cierto el contenido proteico de la yuca es escaso, es rico en carbohidratos y mediante la utilización de técnicas como la fermentación se incrementa el valor nutritivo del almidón y de la harina de yuca al aumentar el porcentaje de proteína de origen microbiano<sup>5</sup>. Lo cual es importante si se considera la deficiencia proteica de los productos elaborados a base de yuca, y aun mas importante si se considera la posibilidad de elaboración de raciones alimenticias con base en este producto.

La fermentación favorece la eliminación de compuestos cianogenicos, los cuales están presentes en la raíz en forma de glucósidos que se descomponen en cianuro con la acción de una enzima endogena, la linamarasa. La desintegración de la raíz, la extrusión del jugo y la posterior eliminación del agua sobrenadante permite la hidrólisis de los cianoglucósidos por volatilización y solubilización<sup>6</sup>.

La fermentación bacteriana es un método económico utilizado para la conservación en la industria de alimentos destinados a consumo humano y la producción de proteína unicelular en la alimentación animal; además trae consigo múltiples beneficios como son el aumento del valor nutricional, mayor digestibilidad del alimento y estabilidad del producto final<sup>7</sup>.

Por esta razón el objetivo del presente estudio fue estimar la cantidad de biomasa producida por uno o varios microorganismos que hicieran parte de la flora intestinal normal de aves tipo Broiler, de gran capacidad amilolitica, empleando como sustrato materias primas del sector agroindustrial colombiano como lo son la harina de yuca, la melaza de caña y el suero de leche, con el fin de obtener una fuente nutricional rica en

---

<sup>4</sup> CARDENAS, Op. cit., p. 1511

<sup>5</sup> CEREDA, M. Estudos fisico-quimicos e microbianos da esterlização e da fermentação da fécula de mandioca. Brasil : UNESP, 1981.

<sup>6</sup> IKEDIOBI, C. Linamarase activity and detoxification of cassava during fermentation for gari production. En: Agric. Biol. Chem. Vol. 46 (1982); p. 1667-1678

<sup>7</sup> SEMINARIO AVÍCOLA REGIONAL. Memorias del Seminario Avícola Regional. San Juan de Pasto : Facultad de Ciencias Pecuarias. Programa de Zootecnia. Universidad de Nariño, 1999.

proteína de fácil asimilación y probablemente económica frente a los alimentos concentrados tradicionalmente empleados en el proceso de levante de pollo de engorde.

La estimación de la producción de biomasa se realizó partiendo de la microbiota normal presente en el intestino tenue de pollos de engorde tipo Brioler de 25 – 27 días de edad. Empleando un medio comercial, agar almidón, sobre el cual se observa un normal crecimiento de microorganismos amilolíticos, se escogió el de mayor capacidad amilolítica, dicho microorganismo se empleó en las subsiguientes fases del proyecto. Seguidamente se realizó la cinética de crecimiento sobre caldo almidón, los resultados obtenidos se emplearon en el diseño del medio de cultivo, compuesto por harina de yuca, urea, melaza, suero de leche y sales minerales, en una proporción óptima para la producción de biomasa.

La proteína unicelular obtenida a partir de las bacterias amilolíticas aisladas de intestino tenue de pollo tipo Broiler, sobre un sustrato compuesto por harina de yuca, urea, melaza, suero de leche y sales minerales, podría servir como fuente proteica, en la formulación de raciones para este mismo tipo de aves, cuya producción está ampliamente difundida tanto en nuestra región como a nivel nacional, dadas sus ventajas en cuanto a los bajos costos de adquisición de pie de cría, su fácil adaptación a climas fríos como templados, su gran capacidad de asimilación de nutrientes y su rápido desarrollo fisiológico; siendo éste último el factor más importante, ya que las aves alcanzan su madurez a las 7 semanas de vida, y se encuentran listas para sacrificio.<sup>8</sup>

El diseño del medio de cultivo con las materias primas propuestas, se realizó empleando el paquete informático stat graphic, mediante la metodología de la superficie de respuesta, con la cual se estableció las proporciones óptimas de las variables independientes (harina de yuca, melaza y urea), con relación a una variable de respuesta, en este caso la producción de Biomasa.

Estas proporciones se podrían emplear como materia prima en la elaboración de un pienso en la alimentación aviar, especialmente para aves tipo Broiler. Generando valor agregado a una materia prima (yuca) pobre proteicamente hablando, pero rica en carbohidratos, y que ha sido empleada tradicionalmente en el levante de este tipo de pollos, sin ningún desarrollo tecnológico. Adicionalmente la implementación de tecnologías apropiadas para el sector avícola, permitirá hacer uso de las políticas de fomento y articulación de la cadena aviar en la búsqueda de la competitividad del sector.

---

<sup>8</sup> Ibid., p. 49

Por otra parte, los resultados obtenidos se podrán emplear en fases posteriores a este estudio, por ejemplo, en la implementación de un modelo aviar, que permita demostrar *in vivo* la eficacia de la alimentación de estas aves con una ración que contenga la proteína unicelular producida con este aislado, analizando parámetros como la ganancia en peso y talla, eficiencia en la absorción de nutrientes y calidad de músculo.

## **1. OBJETIVOS**

### **1.1 OBJETIVO GENERAL**

Estimar la biomasa producida por bacterias amilolíticas aisladas de intestino tenue de pollo tipo broiler a partir de harina de yuca, urea, melaza y suero de leche.

### **1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Aislar bacterias de intestino tenue de pollo tipo Broiler
- Determinar el aislado con mayor capacidad amilolítica procedente de intestino tenue de pollo tipo Broiler
- Diseñar un medio de cultivo con las materias primas propuestas

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 LA YUCA

**2.1.1 Generalidades.** La yuca (*Manihot esculenta* Crantz) planta de la familia de las *Euforbiáceas*, originaria de América del Sur fue domesticada en Brasil, donde existe la mayor diversidad dentro de las diferentes especies. Es un arbusto leñoso con ramificaciones diversas que a veces alcanza alturas superiores a los cuatro metros. Presenta una amplia distribución en los países tropicales, donde se ha convertido en elemento básico de la alimentación, debido a las ventajas agronómicas como: resistencia a sequía, enfermedades o habilidad de producir en suelos pobres o con mínimos requerimientos<sup>9</sup>.

La yuca es una especie perenne que se encuentra generalmente cultivada y que tiene numerosos “parientes” silvestres. Aunque se considera originaria de América del Sur, actualmente se encuentra distribuida entre los 30° de latitud Norte y 30° de latitud Sur, a alturas que varían desde el nivel del mar hasta más de los 2000 m.; se adapta muy bien a suelos lateríticos con pH de 6.0 a 7.5 y con alto contenido de aluminio, los cuales son ácidos por naturaleza debido a su baja capacidad de intercambio cationico, saturación de bases y su alta capacidad de fijación de fósforo<sup>10</sup>.

Las raíces de la yuca generalmente engrosan después de dos o cuatro meses de la siembra, debido a la acumulación de almidones. La cosecha se hace pasados los siete meses y algunas veces, hasta después de dos años o mas. Las raíces se comen cocidas o fritas, o como harina después de molerlas y secarlas; esta harina es generalmente usada para la elaboración de pan. Las raíces frescas, secas o parcialmente fermentadas, se usan como alimento para animales como cerdos y aves de corral. Comercialmente, el almidón se usa como adhesivo, aderezador o como base para diversos procesos<sup>11</sup>.

Debido a que la descomposición y fermentación de las raíces comienza casi inmediatamente después de la cosecha, la yuca solo puede almacenarse por unos cuantos días; sin embargo, es posible procesarla y convertirla en formas mas durables mediante

---

<sup>9</sup> COCK, Op. cit., p. 12.

<sup>10</sup> COCK, Op. cit., p. 13

<sup>11</sup> COCK, Op. cit., p. 12

técnicas diversas. Al cortar las raíces en trozos, que luego pueden deshidratarse, se logra almacenar el producto hasta por un año sin aparente deterioro. Estos trozos pueden incorporarse en dietas completas para animales como sustitutos de cereales<sup>12</sup>.

La yuca fresca presenta cantidades variables de compuestos cianogénicos (linamarina y latoaustralina), según la variedad y partes de la planta; una toxicidad alta puede acarrear graves consecuencias sobre la salud de los consumidores. Es necesario eliminar estos compuestos tóxicos para la obtención de alimentos sanos; estos glucosidos pueden ser degradados enzimáticamente por la acción de una linamarasa, lo cual contribuye eficazmente a la detoxificación natural<sup>13</sup>; y según el contenido de ácido cianhídrico las variedades se clasifican como dulces o amargas<sup>14</sup>.

Según reportes de la FAO, en 1990 la producción mundial de yuca se estimó en 158'000.000 de toneladas, distribuidas en 15,6 millones de hectáreas, siendo África el primer continente productor de yuca, seguido de Asia y América del Sur<sup>15</sup>.

**2.1.2 Valor Nutritivo de la Yuca.** La yuca es una importante fuente de calorías, las raíces contienen aproximadamente del 30 al 40 % de materia seca que constituye principalmente en carbohidratos, cantidades relativamente pequeñas de proteínas del orden de 0.5 al 4.5 % y aun menor de grasas, vitaminas y minerales, mientras que los niveles de lisina se encuentran desde 5.6 a 8.0 % y los niveles de metionina son similares a los que puede aportar el maíz. La Tabla 1, reúne la composición de la raíz yuca así como de su follaje<sup>16</sup>.

Debido al bajo contenido de proteico de las raíces de yuca, existen evidencias de serias deficiencias nutricionales cuando se consume de manera prolongada alimentos a base de esta raíz sin un apropiado complemento con proteínas.

---

<sup>12</sup> COCK, Op. cit., p. 5.

<sup>13</sup> GIBRAD, C. La yuca en raciones para aves tipo Broiler. Colombia : CIAT, 1995

<sup>14</sup> COCK, Op. cit., p. 6

<sup>15</sup> Food and Agricultural Organization, Production year book, p. 135 – 170; Vol.48 (2000)

<sup>16</sup> ZAPATA, L., QUIROS, C. Aspectos tecnológicos en el procesamiento de Yuca (*Manihot esculenta* Crantz). Colombia : CIAT, 1998

Una opción para mejorar las cualidades nutricionales de la yuca es el uso de microorganismos, hongos o bacterias, que al desarrollarse a partir de los hidratos de carbono de la raíz enriquecen con proteína celular este sustrato<sup>17, 18, 19</sup>.

Tabla 1. Composición química de raíz de yuca (*Manihot esculenta* crantz) y follaje

| <b>COMPOSICIÓN DE LA RAIZ DE YUCA Y FOLLAJE POR<br/>100 g DE PRODUCTO</b> |               |             |                |
|---------------------------------------------------------------------------|---------------|-------------|----------------|
| <b>COMPONENTE</b>                                                         | <b>UNIDAD</b> | <b>RAIZ</b> | <b>FOLLAJE</b> |
| Materia seca                                                              | %             | 35.00       | 28.00          |
| Proteína cruda                                                            | %             | 1.10        | 6.80           |
| ELN                                                                       | %             | 31.70       | 10.60          |
| Extracto etéreo                                                           | %             | 0.47        | 1.80           |
| Fibra cruda                                                               | %             | 1.10        | 5.80           |
| Ceniza                                                                    | %             | 0.70        | 1.70           |
| Calcio                                                                    | %             | 0.10        | 0.43           |
| Fósforo                                                                   | %             | 0.15        | 0.08           |
| Potasio                                                                   | %             | 0.2         | 0.35           |
| Magnesio                                                                  | %             | 0.03        | 0.12           |
| Hierro                                                                    | ppm           | 17.00       | 246.00         |
| Cobre                                                                     | ppm           | 2.00        | 3.00           |
| Zinc                                                                      | ppm           | 14.00       | 71.00          |
| Sodio                                                                     | ppm           | 76.00       | 51.00          |
| Lisina                                                                    | %             | 6.2         | 3.9            |
| Vitamina A                                                                | μL            | 19.50       | 20.00          |
| Tiamina (B-1)                                                             | mg            | 0.05        | 0.13           |
| Riboflavina (B-2)                                                         | mg            | 0.03        | 0.26           |

Zapata, 1998

**2.1.3 Utilización.** En las regiones donde se cultiva esta raíz se utiliza principalmente para la alimentación humana y animal, y actualmente se usa cada vez más en la producción de almidón, glucosa, alcohol y varios productos fermentados. Las formas de consumo varían con la región de producción, siendo la cocción de la raíz, la práctica más común, y extendida. Además se practican procesos de fermentación con el fin de mejorar

<sup>17</sup> SEMINARIO AVÍCOLA REGIONAL, Op. cit., p. 50

<sup>18</sup> La alimentación en países subdesarrollados. Roma : Food and Agricultural Organization, FAO, 2001

<sup>19</sup> SOCCOL, T. Y RAIMBAULT, K. Evaluación de harina de yuca en raciones de pollo de engorde. En: Agricultura Tropical, 1993

su sabor, hacerla menos perecedera y detoxificar cuando se trata de variedades amargas<sup>20</sup>,  
<sup>21</sup>.

En Colombia, la yuca se consume, generalmente en forma directa, aunque existen numerosos productos alimenticios, en los que el almidón de yuca cumple una función primordial en la obtención de las características finales, entre ellos el pan de yuca, pan de bono y extrusados, entre otros<sup>22</sup>.

La figura 1, muestra los algunos productos que se pueden obtener a partir del procesamiento de esta raíz, ya sea de manera artesanal o industrial.

Figura 1. Utilización de las raíces de yuca

|      |                                      |                      |                                                                   |
|------|--------------------------------------|----------------------|-------------------------------------------------------------------|
| YUCA | Utilización tradicional en alimentos | Productos secos      | Gari, Harina, futu, Casevve..                                     |
|      |                                      | Productos húmedos    | Sopas, cremas, Chiconcague                                        |
|      | Alimentación Animal                  | Trozos húmedos       |                                                                   |
|      |                                      | Trozos deshidratados |                                                                   |
|      | Producción de Almidón                | Alimentos            | Panificación, Jarabes, Sorbitol, Galletería, Espesantes, Glucosa, |
|      |                                      | Industriales         | Adhesivos, alcoholes, papel, textiles                             |
|      | Biotransformación                    |                      | Alcohol, biomasa,                                                 |
|      |                                      |                      |                                                                   |

Giraud, 1993<sup>23</sup>

<sup>20</sup> COCK, Op. cit., p. 15

<sup>21</sup> GIBRAD, Op. cit., p. 151

<sup>22</sup> RODRÍGUEZ, S. Producción de biomasa láctica a partir de harina de yuca. Santiago de Cali : Universidad del Valle, Departamento de Ingeniería, 1995

<sup>23</sup> GIRAUD, E. Contribution a l'étude physiologique et enzymologique d'une nouvelle souche de *Lactobacillus plantarum* amylolytique isolée du manioc fermenté. Francia : ORSTOM, 1993

**2.1.4 La harina de yuca.** Se obtiene de la deshidratación de las raíces dulces o amargas, después de ser detoxificadas bajo lavados sucesivos por inmersión en agua, la calidad nutricional depende, en gran medida, de la tecnología empleada para este propósito, ya que este decide el contenido final de glucósidos cianogénicos que según las normas internacionales, no debe presentar un valor mayor de 100 partes por millón<sup>24</sup>.

La harina de yuca se puede obtener de dos técnicas diferentes para así obtener un producto seco que se puede almacenar por largos periodos:

- En la primera, la harina de yuca que se obtiene es rica en hidratos de carbono, se obtiene después de lavar las raíces, detoxificarlas, trocearlas y deshidratarlas al sol; finalmente los trozos de yuca son molidos para obtener un producto farináceo rico en almidón. Esta harina de yuca, rica en hidratos de carbono, se emplea principalmente en la elaboración de panes, sopas, y frituras. Aunque también se emplea en raciones alimenticias de cerdos y aves de corral.
- En el segundo caso la harina de yuca que se obtiene, es pobre en hidratos de carbono, ya que se obtiene como un subproducto de la industria de las rayanderías, la pasta formada por celulosa, fibra y una pequeña cantidad de almidón, se deshidrata bajo el sol y finalmente se la muele. Esta harina únicamente puede emplearse para la elaboración de piensos o concentrados destinados para alimentación animal.

La harina de yuca contiene desde 0.5 al 2.5% de los lípidos. De estos únicamente el 50% es extraíble con solventes convencionales. Los lípidos extraíbles son principalmente polares en su naturaleza, siendo el principal grupo los diglicéridos galactosídicos. Los componentes de los ácidos grasos son relativamente saturados comparados con la estructura lipídica de la papa<sup>25</sup>.

La harina de yuca rica en hidratos de carbono se encuentra ampliamente difundida en cuanto a la alimentación animal se refiere, siendo la industria porcícola y aviar su destino final. Los países del sudeste asiático son los mayores consumidores de esta fuente de carbohidratos que se destina principalmente a la cría y levante cerdos y pollos de engorde Ross x ross. Mientras que países como Holanda y Brasil, la destinan principalmente a la

---

<sup>24</sup> LOZADA, E. La investigación sobre el cultivo de la yuca (*Manihot esculenta crantz*) en Colombia. En: Resúmenes analíticos sobre yuca, CIAT (1998)

<sup>25</sup> HUDSON, B. Lipids of cassava tubers (*Manihot esculenta crantz*). En: Food Agric. Estados Unidos. Vol 25; p. 1503 - 1512

cría y levante de pollos tipo Ross x ross y Broiler respectivamente, esta para su empleo en raciones aviares se trocea y se deja secar en grandes superficies bajo la luz solar, finalmente se muele y se incorporar otros elementos con el propósito de aumentar su valor nutricional<sup>26</sup>.

La tabla 2, reúne la composición de la harina de yuca. Mostrando al almidón como principal componente, y el pobre contenido de lípidos, vitaminas, sales minerales y sobre todo en proteína<sup>27</sup>.

Tabla 2. Composición de la harina de yuca

| <b>COMPONENTE</b>       | <b>%</b> |
|-------------------------|----------|
| Humedad                 | 12.16    |
| Ceniza                  | 0.41     |
| Proteína                | 3.9      |
| Grasa                   | 0.91     |
| Carbohidratos (Almidón) | 82.88    |
| Fibra                   | 1.2      |
| Fósforo                 | 0.33     |
| Calcio                  | 0.20     |
| Hierro                  | 0.01     |
| Azúcar reductor         | 0.86     |
| Azúcar total            | 3.14     |
| Balagopalan, 1988       |          |

En cuanto a la avicultura existen factores que afectan el consumo de alimento, como factores genético, la edad, tamaño, sexo, grado de estrés entre otros, por lo cual las raciones que se les suministre a las aves deben suplir sus necesidades nutricionales, pero con la yuca se hace necesario incorporar procesos que permitan aumentar su calidad nutricional y eliminar las sustancias toxicas que estas raíces puedan contener<sup>28, 29, 30,31</sup>.

---

<sup>26</sup> GIBRAD, Op. cit., p. 161.

<sup>27</sup> BALAGOPALAN, C. Y PADMAJA, G. Cassava in food, feed and industry. Estados Unidos : CRC Press INC, 1988

<sup>28</sup> COCK, Op. cit., p. 16

<sup>29</sup> SEMINARIO AVÍCOLA REGIONAL, Op. cit., p. 50

<sup>30</sup> ESCAMILLA ARCE, Leopoldo. Manual Práctico de avicultura Moderna. México : CECSA, 1979

<sup>31</sup> NORTH, Mack y BAL, Donald. Manual de producción Avícola. México : Manual Moderno S.A., 1990

- **Almidón de yuca.** El almidón es el principal componente de la harina de yuca. En el proceso de elaboración del almidón es separado de otros constituyentes como la fibra, proteínas, azúcares, y sales presentes en la harina de yuca, mediante el uso de técnicas que permiten alcanzar una pureza hasta del 99 %<sup>32</sup>.

El almidón esta constituido por dos polímeros, ambos constituidos por unidades de Ó-D-Glucopiranosas, el mayor componente – amilopectina- tiene una estructura ramificada, mientras que la amilosa, en menor cantidad tiene una estructura lineal. La amilopectina tiene además de los enlaces ó 1-4 encontrados en amilosa, enlaces ó 1-6, lo cual contribuye a diferenciar las propiedades de los dos componentes<sup>33</sup>. El contenido de amilosa en el almidón de yuca varia entre un 16 % a un 25 %, y puede llegar a tener una 10000 unidades de glucosa, mientras que la amilopectina presente en el almidón de yuca puede contener de 10000 a 100000 unidades de glucosa<sup>34</sup>.

La Tabla 3 resume algunas de las propiedades de la amilosa y la amilopectina. La tendencia de las moléculas de amilosa a asociarse y cristalizarse es alta en comparación con la amilopectina. Los geles de amilosa son duros debido al enrollamiento de las moléculas de la amilosa lineal en mas de un cristal; los geles de amilopectina son suaves debido a las pocas interacciones moleculares propias de la forma ramificada<sup>35</sup>.

Tabla 3. Propiedades de las fracciones de almidón

| Propiedad                | Amilosa              | Amilopectina        |
|--------------------------|----------------------|---------------------|
| Estructura molecular     | Lineal ó 1-4         | Ramificada, 1-4,1-6 |
| Dilución en solución     | Inestable            | Estable             |
| Geles                    | Firme e irreversible | Suave y reversible  |
| Película                 | Coherente            | --                  |
| Formación de complejos   | Favorable            | Desfavorable        |
| Coloración con Yodo      | Azul                 | Rojo púrpura        |
| Digestibilidad α-amilasa | 100 %                | 60 %                |
| Grado de polimerización  | 1500 – 6000          | 300000 - 3000000    |

Zobel, 1998

<sup>32</sup> DUPRAT, F. y GALLANT, D. L'amidon, les polymeres vegetaux. Francia : Mountes, 1990

<sup>33</sup> KHAJARERN, S. Use of cassava as a food supplement for Broiler Chickens. Colombia : CIAT, 1987

<sup>34</sup> GUILBOT, A. El almidón, un polímero vegetal. Francia : ORSTOM, 1980

<sup>35</sup> ZOBEL, M. Molecules to granules: a development, in starch. En: Chem and Technology. New York.

Las modificaciones que puede sufrir el granulo de almidón son de orden físico si actúan sobre la estructura del granulo y de orden químico, si alteran o degradan sus constituyentes amilosa o amilopectina. La organización granular es destruida por tratamientos hidrotérmicos o químicos, que en presencia de un cierto porcentaje de agua, a temperaturas elevadas y bajo presión, hacen estallar el granulo para liberar amilosa y amilopectina<sup>36</sup>.

El almidón de yuca también se puede degradar a sus unidades componentes por la acción de amilasas, que tiene la habilidad de degradar los gránulos de almidón. La cantidad de degradación sin embargo, es una función del almidón y la enzima<sup>37</sup>.

Las enzimas de degradación del almidón pueden clasificarse en dos grupos:

- Los Glucosidos hidrolasas EC. Que provocan por vía hidrolítica la degradación del almidón y sus constituyentes, amilosa y amilopectina. Este primer grupo se divide en dos subgrupos.
  - Las amilasas, hidrolizan los enlaces  $\alpha(1-4)$
  - Enzimas desramificantes, hidrolizan los enlaces  $\alpha(1-6)$
- Las trans glucosidasas o glucosil transferasas EC2.4., que atacan el sustrato:
  - En presencia de fosfato, llamadas fosforililazas
  - Sin presencia de fosfato, como es el caso de la D-enzima, de la amilomaltasa de la dextrinogenasa de shardger y de las trans  $\alpha$ -glucosidasas.

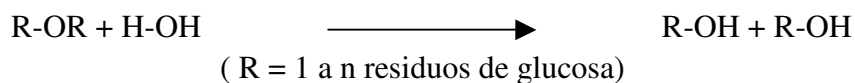
Los glucosidos hidrolasas, rompen la molécula con intervención de las moléculas de agua, desensamblando fragmentos glucosidicos de los constituyentes macromoleculares del almidón<sup>38</sup>. Su acción irreversible puede esquematizarse así:

---

<sup>36</sup> BRAHAM, E. Effect of defaulting on amylose content, viscosity characteristics and organoleptic quality of cassava. En: Food Tecnology, USA (1992). Vol. 17; p. 761

<sup>37</sup> KHAJARERN, Op. cit., p. 12

<sup>38</sup> DUPRAT, op. cit., p. 41



Las amilasas hidrolizan los enlaces  $\alpha$  (1-4), oligo o poliglucanos son transferidos como residuos glucosidicos al agua. Basados en la posición del enlace y la estequiometría de la reacción del producto, muchas clases de amilasas son distinguidas como:

Endoamilasas ( $\alpha$  amilasas), rompen los enlaces internos  $\alpha$  1-4, de glucosidos lineales o ramificados hacia productos que poseen un nuevo grupo reductor en la configuración  $\alpha$ .

Las exoamilasas ( $\beta$  amilasas) catalizan una hidrólisis sucesiva de enlaces alternados  $\alpha$  1-4 y dan paso a la liberación de maltosa cuyos grupos reducidos tienen configuración  $\beta$ .

La degradación por  $\beta$  amilasas comienza en los finales no reducidos de la cadena glucosidica; ella cesa antes de los puntos ramificados. Como un tercer grupo, las amiloglucosidasas (o glucoamilasas EC 3.2.1.3) rompen ambos tipos de enlaces  $\alpha$  1-4 y  $\alpha$  1-6 por lo tanto remueven una unidad de glucosa por paso de los finales no reducidos del glucósido. Un cuarto grupo de enzimas hidrolíticas designadas como  $\alpha$ -glucosidasas (o maltasas EC 3.2.1.20) hidroliza enlaces  $\alpha$ 1-4 y en un grado mas bajo, enlaces  $\alpha$ 1-6 en oligoglucanos y algunos otros oligosacaridos<sup>39</sup>.

Dentro del subgrupo de las fosforilasas, se diferencian aquellas de origen vegetal (enzimas P) y las de origen animal. Estas enzimas catalizan el cambio entre el enlace con uno del enlace fosfórico, formándose así el ácido  $\alpha$ -glucosil-fosforico. La ecuación se la puede describir así.



La ecuación comprende un donador y un aceptor de D- Glucosil. Estas enzimas son específicas, su acción es reversible, el equilibrio esta en función del pH y de la temperatura. Las otras glucosil-transferasas, convierten la maltosa en una mezcla de D-glucosa y de malto-holosido. Los extremos no residuos de la amilosa pueden servir de donadores de glucosil.

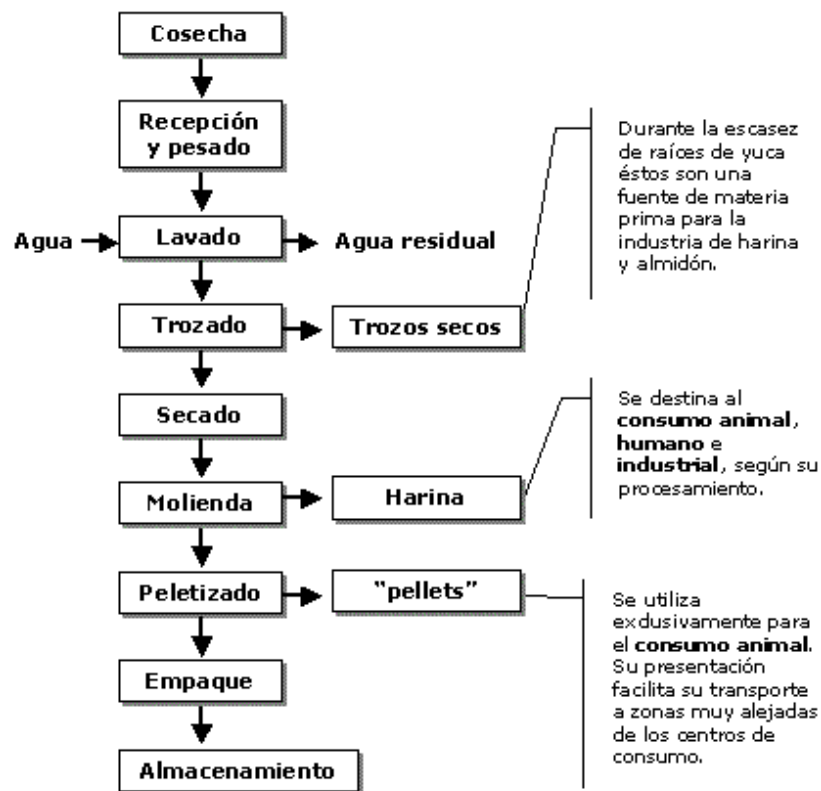
---

<sup>39</sup> STUMP, Perkins. The biochemistry of plants. U.K. : Jack Press, 1998

La enzima D, interviene en la síntesis del almidón, descompone también los maltoholosidos. La amilomaltasa descompone la maltosa en n-glucosa. La dextrinogenasa de Schardiger, convierte el almidón en polímeros cíclicos formados de 6 a 8 moléculas de glucosa unidos por enlaces  $\alpha 1-4$ <sup>40</sup>.

- **Diagrama de Flujo General de Producción de harina de yuca.** La figura 2, muestra las etapas básicas en cuento al acondicionamiento de las raíces de yuca se refiere, para la obtención de harina de yuca o pellets.

Figura 2. Diagrama de flujo elaboración harina de yuca



COCK, 1984<sup>41</sup>

<sup>40</sup> GUILBOT, Op. cit., p. 17.

<sup>41</sup> COCK, Op. cit., p. 17

## 2.2 SUERO LACTEO

Es el residuo de la manufactura del queso resultante de la coagulación de la leche, durante la cual casi toda la proteína y la grasa se han eliminado. Por consiguiente, el contenido de materia seca del suero es escaso, y consiste principalmente en lactosa y minerales. Dentro de la industria de la quesería existen dos tipos de suero<sup>42</sup>:

- Suero dulce. Obtenido en el proceso de elaboración de quesos en los cuales se han usado principalmente enzimas de tipo cuajo para obtener el coagulo, este puede llegar a tener entre 12 y 16° Dornick.
- Suero ácido. Proveniente de la fabricación de quesos en que el coagulo ha sido formado fundamentalmente por acidificación mediante la adición de ácidos orgánicos o inorgánicos diluidos, la acidez de este suero puede estar entre los 30 y 40° Dornick, inclusive hasta 45.

La composición química de los sueros dulce y ácido que se puede obtener como subproducto de las queserías se relaciona en la tabla 4, como se ve continuación.

Tabla 4. Composición suero lácteo

| Componente    | Suero dulce (%) | Suero ácido (%) |
|---------------|-----------------|-----------------|
| Extracto seco | 93-94           | 94-95           |
| Lactosa       | 6-7             | 5-6             |
| Ácido láctico | Vestigios       | Hasta 0.8       |
| Proteínas     | 0.8-1           | 0.8-1           |
| Ácido cítrico | 0.1             | 0.1             |
| Cenizas       | 0.5-0.7         | 0.7-0.8         |
| PH            | 6.45            | ≈5.0            |
| Acidez        | 10°Th           | 50-62.5°Th      |

Torres, 2002

Entre los ingredientes menores del suero se destacan:

---

<sup>42</sup> TORRES,B. Quesos: Cuadernillo técnico para agroempresas. Ecuador : IICA – ECUARUNARI, 2002

|             |               |
|-------------|---------------|
| Calcio      | 51mg/100g     |
| Fósforo     | 53mg/100g     |
| Hierro      | 1.0 mg/100g   |
| Vitamina A  | 10 U.I. /100g |
| Tiamina     | 0.03 mg/100g  |
| Riboflavina | 0.14 mg/100g  |
| Niacina     | 0.1 mg/100g   |

Torres, 2002.

El suero lácteo fresco por sus características es empleado como suplemento de raciones alimenticias como por ejemplo; se puede emplear 7 litros de suero dulce por 1 Kg de materia seca (concentrado), con un máximo de 25 litros al día<sup>43</sup>.

En cuanto a la alimentación aviar se refiere, el suero medianamente ácido puede servir como un excelente reemplazo del agua de suministro, con la ventaja que aporta algunos nutrientes, o puede utilizarse para preparar amasijos en húmedo<sup>44</sup>.

El suero por sus cualidades fisicoquímicas se lo puede emplear como fuente de lactosa y nitrógeno y como regulador de la actividad osmótica de los microorganismos implicados en procesos de fermentación. Además por su carácter dulce (tendencia a la neutralidad) o ácido se lo puede utilizar como regulador de pH en los procesos de bioconversión<sup>45</sup>.

---

<sup>43</sup> BREDON, R.M. Subproductos Lácteos. En: Ocasional Bulletin Department of veterinary services and animal industry. Roma, No. 124, 1997

<sup>44</sup> MOTHWRY, E. Metodologías para la utilización de suero de ganado vacuno en alimentación de aves de postura. En: Avicultura Tropical, Venezuela, p. 45 – 53, 2003

<sup>45</sup> JARAMILLO, E., BENITES H. y SAAVEDRA, J. Influencia del suero lácteo y otros nutrientes en procesos de bioconversión con *Bacillus plantarum* en reactor discontinuo. Medellín : Universidad de Antioquia y Universidad Nacional, 2002

## 2.3 MELAZA

La melaza es el subproducto constituido por el residuo de jarabe recogido durante la fabricación o el refinado del azúcar procedente de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* y especies afines *S. officinarum* x *S. spontaneum*)<sup>46</sup>.

Este es un líquido denso y negruzco constituido por el residuo que permanece en las cubas después de la extracción de la mayor parte de los azúcares de caña por cristalización y centrifugación. En las melazas los azúcares representan un 80% de su contenido en materia seca. Como consecuencia, son muy palatables y su contenido energético es apreciable en todas las especies<sup>47</sup>.

La melaza contiene un 32% de sacarosa y oligosacáridos (rafinosa) y ácidos orgánicos (málico, oxálico, láctico, acotínico y cítrico), fácilmente degradables en el rumen de los animales. Su contenido en proteína es cercano al 4%, la fracción nitrogenada es totalmente soluble, estando constituida en un 50% por aminoácidos (principalmente aspártico y glutámico) y en un 50% por nitrógeno no proteico<sup>48</sup>.

La melaza presenta altos contenidos en cenizas, es rica en minerales como: calcio, cloro, magnesio, sodio, potasio, fósforo y nitrógeno. La tendencia actual es la de utilizar melazas para la elaboración de piensos como fuente hidratos de carbono y de minerales. Además de servir como aglutinante de otros ingredientes y es requerida básicamente para procesos de bioconversión (producción de alcohol, ácidos, biomasa, entre otros)<sup>49,50</sup>.

La melaza sin diluir se sitúa, generalmente, entre 80-90°Brix, esta para ser utilizada en piensos se la diluye en agua hasta 79.5°Brix. La melaza sin clarificar, se prepara mediante la inversión parcial del jugo de caña de azúcar para evitar la cristalización de la sacarosa, concentrándolo hasta 80-85° Brix<sup>51</sup>.

---

<sup>46</sup> TOMMIE, G. Tecnología para la fabricación de alimentos balanceados. Colombia : AFIA, 1994, p. 78

<sup>47</sup> Ibid., p. 78.

<sup>48</sup> Ibid., p. 79.

<sup>49</sup> Ibid., p. 79

<sup>50</sup> FERNÁNDEZ, H. Elaboración de piensos. Santiago de Cali : CENICAÑA – CORPOICA, 1997

<sup>51</sup> LINDSEY, J. y SMITH, P. Cuadernillo agropecuarios para extensionistas. Chile : FAO, 1990

La tabla 5. muestra la composición de la melaza, en esta tabla se evidencia que es un producto rico en carbohidratos, y como una excelente fuente de minerales, vitaminas y aminoácidos, aunque su contenido proteico no es despreciable.

Tabla 5. Composición química melaza

| COMPONENTE  | UNIDAD | VALOR |
|-------------|--------|-------|
| Humedad     | %      | 26.3  |
| Cenizas     | %      | 10.1  |
| Azucares    | %      | 46.0  |
| Almidón     | %      | 0     |
| Grasa       | %      | 2.0   |
| Proteína    | %      | 4.0   |
| ELN         | %      | 63.0  |
| Ca          | %      | 0.74  |
| P           | %      | 0.07  |
| Na          | %      | 0.18  |
| Cl          | %      | 1.85  |
| Mg          | %      | 0.36  |
| K           | %      | 3.10  |
| S           | %      | 0.45  |
| Fe          | mg/kg  | 190   |
| Riboflavina | mg/kg  | 19    |
| Niacina     | mg/kg  | 16    |
| Biotina     | mg/kg  | 0.67  |
| Colina      | mg/kg  | 790   |

Tommie, 1994

En cuanto a la alimentación de animales se refiere existen tres formas principales de utilizar la melaza para la elaboración de raciones<sup>52</sup>:

1. *En los piensos secos.* Además de mejorar la palatabilidad, sedimentar el polvo y servir de aglutinante, la melaza puede sustituir en los piensos, a otros carbohidratos más costosos. Su efecto laxante es una ventaja más en muchos piensos. En los piensos mixtos comerciales, generalmente no se superan las siguientes proporciones: bovinos, 15%; terneros, 8%; ovinos, 8%; cerdos, 15%; y aves de corral, 5%.

---

<sup>52</sup> PEREZ, R. y PRESTON, T. Utilización de melaza en raciones para animales. En: Revista cubana de ciencias agrícolas. Cuba, Vol. 4, (1991); p. 111

2. *En la preparación de ensilaje.* La melaza fermenta rápidamente y algunas veces se añade en proporción de un 5%, durante el proceso de ensilado como preservador, con la ventaja de su valor nutritivo y palatabilidad. La melaza puede también utilizarse como obturador en los montones de ensilaje, para este fin, suelen bastar unos 50 kg de melaza por metro cuadrado. Cuando se mezcla melaza en un ensilaje de poco contenido proteico, conviene añadir urea a la melaza. También puede rociarse la melaza sobre el heno durante el curado para evitar la pérdida de hojas.
3. *El empleo de melaza para las aves de corral.* La melaza como elemento portador de energía en las aves suscita que las heces se vuelven acuosas y la eficacia del pienso disminuye. Sin embargo, en muchos países, sigue siendo justificable desde el punto de vista económico, incluir niveles elevados de melaza en las raciones para las aves de corral, a pesar de sus inconvenientes. La melaza se ha empleado para sustituir al maíz importado, y representa hasta el 35% de la ración total.

## 2.4 UREA

La urea es un compuesto nitrogenado no proteico cristalino, incoloro, identificado con la fórmula  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ . Se encuentra en la orina, es el principal producto terminal del metabolismo protídico en el hombre y en los mamíferos. Está presente en la sangre, en el hígado y también en los excrementos de los peces y muchos otros animales inferiores, además esta presente en hojas y semillas de numerosas legumbres y cereales<sup>53, 54</sup>.

La urea además de suplemento proteico en los rumiantes y aves de corral, es utilizada en la elaboración de fertilizantes agrícolas, resinas artificiales, como estabilizante de explosivos y en la elaboración de plásticos. Actualmente se presenta en el mercado en formas granulada y perlada, siendo esta última la más recomendada para uso animal por su libertad y facilidad para mezclarla con otros ingredientes<sup>55</sup>.

La urea es higroscópica, facilitando la formación de terrones cuando es expuesta al medio ambiente. Debido a su costo, disponibilidad en el mercado y tradición de uso en la alimentación de rumiantes por muchos países alrededor del mundo, la urea es la más utilizada entre los compuestos nitrogenados no proteicos (birueta, fosfato diamónico,

---

<sup>53</sup> SOCCOL, Op. cit., p. 28

<sup>54</sup> TOMMIE, Op. cit., p. 82.

<sup>55</sup> AREQUE, C. Uso de la urea en la alimentación de aves de corral. Venezuela : Centro de Investigaciones Agropecuarias del Estado Táchira, 2001

acetato de amonio, sulfato de amonio y otros). La urea contiene aproximadamente 46% de nitrógeno, representando 28,75% de proteína equivalente total<sup>56</sup>.

La urea se emplea como fuente proteica para la preparación de raciones alimenticias de aves de corral y rumiantes multigástricos desde ya hace varios años Sin embargo, su uso depende de la habilidad de la flora microbiana presente en el rumen o en el intestino tenue para incorporarla en la formación de sus propios tejidos. La urea siempre aporta beneficios al animal, ya que habiendo disponibilidad de forraje o ensilaje (aunque de baja calidad) aumentará el consumo voluntario, así como las tasas de digestión de la fibra y de pasaje del alimento a través del tracto digestivo<sup>57</sup>.

Además hoy en día la urea se emplea como fuente de nitrógeno en procesos metabólicos y de bioconversión para suplir los requerimientos nutricionales y de conversión de diferentes microorganismos de uso industrial<sup>58,59</sup>.

## 2.5 LA FERMENTACIÓN

La fermentación es un proceso de degradación de compuestos orgánicos generalmente en ausencia de aire. La fermentación es un proceso menos eficaz que la respiración aerobia en lo que se refiere al suministro de energía, ya que parte de la energía presente en la sustancia descompuesta permanece todavía en los productos orgánicos finales como el alcohol o el ácido láctico, característicos de los procesos fermentativos<sup>60</sup>.

La fermentación puede definirse como un proceso metabólico productor de energía en el que los compuestos orgánicos actúan como donadores y como aceptores de electrones (Figura 3). La principal contribución de la fermentación es la provisión de ATP a través de la fosforilización a nivel del sustrato<sup>61</sup>.

Los procesos fermentativos mantienen siempre un estricto equilibrio redox en el sentido de que el nivel medio de oxidación de los productos finales de la fermentación es

---

<sup>56</sup> Ibid., p. 65

<sup>57</sup> LABBE, S., URDANETA, R. PEROZO, R. Utilización de la suplementación con melaza, urea y yuca en el crecimiento de pollos tipo Broiler. *En: agronomía Tropical*. Venezuela, Vol. 25, (1997), p. 201 - 205

<sup>58</sup> JOKLIK, W. y WILLET, Hilda. Microbiología Zinsser. Argentina : Médica Panamericana, 1994

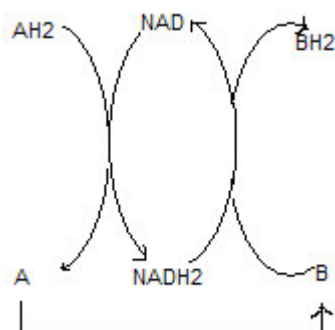
<sup>59</sup> BROWN, C., CAMBELL, I., PRIEST, F. Introducción a la biotecnología. España : Acribia S.A., 1993

<sup>60</sup> STAINER, R. y DOUDORFF, M. Microbiología. España : Ediciones Aguilar, 1987, p. 175

<sup>61</sup> Ibid., p. 175

idéntico al de los sustratos formados, es decir, que el número de equivalentes molares de carbono, hidrógeno y oxígeno es el mismo en los productos finales que en los sustratos<sup>62</sup>.

Figura 3. Esquema general de las fermentaciones



Scriban, 1985

Muchos de los organismos que obtienen energía por fermentación son anaerobios estrictos. Otros sin embargo, son anaerobios facultativos, capaces de crecer tanto en presencia como en ausencia de aire. En general, los organismos fermentativos que son anaerobios facultativos cambian su modo de metabolismo productor de energía al ser expuestos al aire; la presencia de oxígeno molecular induce el cambio metabólico de la fermentación a la respiración<sup>63</sup>.

No obstante existe, un grupo de bacteria facultativas anaerobias, el de las bacterias lácticas que sin duda son una excepción a la regla<sup>64</sup>; además de cierto número de enterobacterias y bacilos entre los que se encuentra *Bacillus cereus*. El oxígeno no modifica su modo de metabolismo productor de energía y la fermentación prosigue incluso cuando crecen en presencia de aire<sup>65</sup>.

---

<sup>62</sup> Ibid., p. 175

<sup>63</sup> SCRIBAN, R. Manual moderno de biotecnología. México : Panamericana Editores, 1985, p. 415.

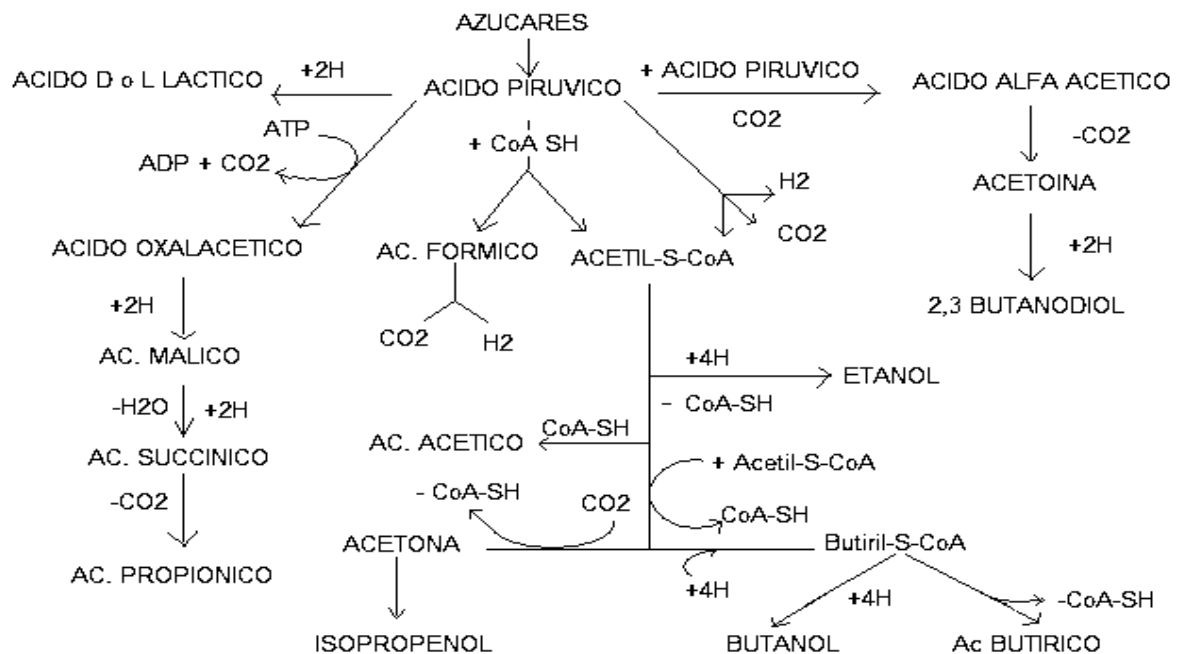
<sup>64</sup> Ibid., p. 415.

<sup>65</sup> LASARRETA, M. Estudio de la influencia de factores físicos, químicos y biológicos en la cinética de crecimiento, esporulación y producción de la bacteriocina cereína 7 por *Bacillus cereus* Bc7 en un fermentador. Chile : Universidad Católica, 2003

**2.5.1 Bioquímica de la fermentación.** Las rutas utilizadas para la degradación fermentativa de los hidratos de carbono, al igual que los productos finales, varían en los distintos grupos microbianos. Prácticamente cualquier carbohidrato o derivado puede servir como fuente fermentable de energía para cualesquier microorganismo.

En algunos grupos, la gama particular de carbohidratos susceptibles de fermentación es un importante carácter taxonómico, que se utiliza para la caracterización de géneros y especies<sup>66</sup>. La figura 4, resume los principales productos finales de las fermentaciones bacterianas a partir de los azúcares.

Figura 4. Formación a partir de ácido pirúvico de algunos de los principales productos finales de la fermentación bacteriana de los azúcares



Scriban, 1985

**2.5.2 Fermentación de yuca.** Los primeros estudios sobre fermentación de almidón y harina de yuca se efectuaron en Brasil, con el objeto de conocer sus condiciones de fermentación para obtener un proceso controlado y de mejor calidad. Se encontró gran variación de las características fisicoquímicas entre las muestras analizadas. Especialmente en la acidez titulable, y el pH. Las fermentaciones realizadas en el

<sup>66</sup> SCRIBAN, Op. cit., 416

laboratorio mostraron patrones variados y se determinaron los ácidos, butírico, acético, fórmico, succínico y láctico<sup>67</sup>.

En los microorganismos aislados no se observó predominio de un grupo determinado. Los más característicos fueron *Bacillus subtilis*, *Leuconostoc citrovorum*.. Las levaduras no tuvieron un papel importante en la fermentación. Los azúcares reductores fueron detectados en pequeñas cantidades y la acidez titulable aumentó, hasta cierto punto, luego mostraron un patrón irregular<sup>68</sup>.

Mientras que algunos estudios muestran que algunas propiedades fisicoquímicas del almidón fermentado, mejoran en cuanto al sabor y color se refieren. Además de demostrar que el almidón fermentado es más soluble y presenta mayor absorción de agua, y la pasta formada es menos viscosa que el almidón nativo<sup>69</sup>.

Entre tanto, algunos estudios estuvieron dirigidos hacia la manera más efectiva y provechosa de escoger el método que proporcionara mayor calidad en cuanto a la esterilización del almidón y/o harina de yuca se refiere y que mantuviera las cualidades fisicoquímicas de estos intactas, fue así como se escogieron varios métodos de esterilización como: esterilización por calor seco, calor húmedo, radiación gamma, microondas y bromuro de etilo<sup>70</sup>.

La harina y el almidón de yuca sufrieron modificaciones fisicoquímicas y reológicas con los tratamientos de calor seco y radiación a 8.0 Mrad. Mientras que los tratamientos con calor húmedo y con Bromuro de etilo arrojaron las siguientes conclusiones: con calor húmedo, el almidón se disuelve más fácilmente se forman geles débiles y se rompen enlaces  $\alpha$  1-4 y  $\alpha$  1-6, dando como resultado mayor actividad fermentativa. Con Bromuro de etilo, los cambios fisicoquímicos no fueron significativos, y las propiedades reológicas permanecen invariables<sup>71</sup>.

---

<sup>67</sup> CEREDA, M. Alguns aspectos da fermentação da fécula de mandioca- Características de polvilho azedo comercial. Brasil : UNESP, 1973, p. 235.

<sup>68</sup> Ibid., p. 235.

<sup>69</sup> NAKAMURA, I. Some physico – chemical properties of fermentes cassava starch. En: Campinas, Die Starke, Brasil , Vol. 27; (1975); p. 295-297

<sup>70</sup> CEREDA, M. Estudos fisico-quimicos e microbianos da esterlização e da fermentação da fécula de mandioca, Op. cit., p. 49.

<sup>71</sup> Ibid., p. 51.

No obstante se han efectuado diferentes estudios tendientes a aislar e identificar los microorganismos responsables de la fermentación de almidón y harina de yuca. Para ello se tomo como punto de referencia las rayanderías del norte del departamento del Cauca, donde los procesos de fermentación son realizados de manera artesanal, en la cual se utilizan como cultivos iniciadores masas o caldos de fermentaciones anteriores, las cuales son ricas en microbiotas salvajes<sup>72</sup>.

De estos estudio se lograron aislar e identificar dos bacterias, (*Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus casei*) y las levaduras del genero *Saccharomices* y *Geotrichu*, microorganismos responsables de las cualidades fisicoquímicas y palatables del almidón fermentado<sup>73</sup>. Mientras que el hallazgo de bacilos Gram positivos esporulados de elevada actividad enzimática amilolítica identificado como *Bacillus cereus*, lo catalogan como un contaminante del producto final<sup>74, 75</sup>.

## 2.6 PROTEÍNA UNICELULAR – SCP

Se denomina indistintamente proteína unicelular o de su sigla en ingles SCP (Single Cell Protein), al producto que se obtiene del crecimiento de microorganismos (y que son ellos mismos). La proteína unicelular, es un termino que se ha aceptado para designar el material celular microbiano preparado para uso como pienso o alimento<sup>76, 77</sup>.

Entre los microorganismos que se utilizan para la obtención de SCP se encuentran las algas, las bacterias, las levaduras y los hongos filamentosos, que utilizan para crecer diversos sustratos en un cultivo estrictamente aerobio con fines de alimentación<sup>78, 79, 80</sup>.

---

<sup>72</sup> MARTINEZ, Alfredo. Aislamiento y caracterización de la flora presente en la fermentación de yuca y estudios del proceso. Bogota : Universidad Nacional – ICTA – CIAT, 1981

<sup>73</sup> SANTOS, Op. cit., p. 32.

<sup>74</sup> FIGUEROA, Carlos. Fermentación de almidón de yuca. Santiago de Cali : CIAT – UNIVALLE, 1991.

<sup>75</sup> ZAPATA, L. Y PARADA, J. Almidón agrio de yuca: Aspectos tecnológicos y metodológicos. Santafe de Bogotá : ICTA – Ministerio de Agricultura, 1988

<sup>76</sup> SCRIBAN, Op. cit., p. 416.

<sup>77</sup> REED, G., REM, J., STADLER, P. Biotechnology 4, Measuring modeling and control. Alemania : VCH, 1981

<sup>78</sup> BROWN, Op. cit., p. 317.

<sup>79</sup> FIGUEROA, Op. cit., p. 23

<sup>80</sup> MADIGAN, M., MARTINKO, J., PARKER, J. Biología de los microorganismos. Reino Unido : PRENTICE HALL, 1999

Esta proteína está constituida básicamente por la masa celular o biomasa, como producto obtenido de procesos de fermentación, de diversas industrias que se dedican a esta actividad, además de los procesos de purificación de aguas residuales. La harina formada por proteína derivada de microorganismos unicelulares para ser comercializada de llevar al final de la oración el nombre del microorganismo de que procede.

Los microorganismos utilizados en la producción de SCP, deben cumplir algunas características<sup>81</sup>.

- Alta velocidad de multiplicación
- Alto contenido proteínico (30 a 80% de proteína en peso seco de biomasa)
- Hacer uso de diferentes fuentes de carbono.
- Utilización de cepas de alta producción
- Instalaciones pequeñas con producción elevada
- Producción independiente de condiciones ambientales y estacionarias.

Las etapas básicas para la producción de SCP son<sup>82</sup>:

- Provisión de una fuente de carbono
- Preparación de un medio adecuado que contenga fuentes de carbono, fósforo, nitrógeno y nutrientes esenciales para los microorganismos.
- Impedir contaminación de la planta y del medio de cultivo del microorganismo
- Separación de la biomasa una vez consumido el sustrato
- Tratamiento posterior de la biomasa, con o sin purificación.

**2.6.1 Operaciones Auxiliares.** En cuanto a las operaciones básicas concernientes a la producción de SCP están<sup>83</sup>:

- Cultivo: Se debe realizar en las siguientes condiciones:
  - ♣ Evitar contaminación del medio y equipos por medio de esterilización previa y durante la fermentación.
  - ♣ Debe ser un proceso altamente aeróbico

---

<sup>81</sup> CRUEGER, W. Y CRUEGER, A. Biotecnología: Manual de microbiología industrial. España : Acribia, 1993, p. 41

<sup>82</sup> Ibid., p. 41

<sup>83</sup> Ibid., p. 42

- ♣ El calor generado se debe eliminar mediante sistemas de refrigeración.
- Recuperación: La SCP, se separan normalmente por centrifugación o por filtros rotatorios. Para disminuir costos y contaminación se prefiere someter a secado el caldo antes de someterlo a algún proceso de recuperación.

**2.6.2 Producción de SCP.** La búsqueda de alimentos, ricos en proteína, vitaminas, minerales y aminoácidos y que además sean de bajo costo, ha facilitado la investigación y la utilización de microorganismos como fuentes de estos elementos, siendo las levaduras y las bacterias lácticas las mas difundidas para este tipo de propósitos<sup>84</sup>.

En los países desarrollados se ha originado una creciente demanda de proteína de alta calidad para piensos o alimentos compuestos, que son fundamentales en la producción de aves, bovinos y cerdos, y seres humanos respectivamente, debido a su contenido proteínico y su fácil obtención<sup>85</sup>.

Los estudios de producción de proteína unicelular se iniciaron hacia 1930, en Alemania donde se aislaron y cultivaron hongos del genero *Geotrichum* y levaduras del genero *Candidum* con el propósito de obtener fuetes proteicas baratas y fáciles de producir. Inglaterra hizo lo propio con el estudio y finalmente la producción de *Candida utilis*, una levadura rica en proteína, vitaminas y aminoácidos que utilizaba como sustrato melaza de remolacha<sup>86</sup>.

En la década de los setenta, petroleras como Shell, y British Petroleum Company, inician sus estudios con el propósito de eliminar el metano presente en la cadena petroquímica, para ello parten de los estudios realizados por científicos israelíes que han aislado una serie de bacterias presentes en la fase acuosa del crudo. Las cuales se denominaron *artrobacterias*, dichas bacterias se caracterizan por oxidar el metano, duplicarse rapidamente y por ser una exente fuente de proteína<sup>87</sup>.

En los 80, políticas tendientes a mejorar la calidad el medio ambiente en Europa, Japón y Estados Unidos, dan como resultado proyectos que mejoran la calidad de las aguas

---

<sup>84</sup> CALERO, Alvaro. Proteína unicelular. Santiago de Cali : Universidad del Valle, Facultad de Ingeniería, 1992, p. 28

<sup>85</sup> MADIGAN, Op. cit., p. 381

<sup>86</sup> CALERO, Op. cit., p. 27

<sup>87</sup> Ibid., p. P. 27

servidas, siendo las *Cianobacterias* y las algas verdes los organismos mas difundidos para este tipo de procesos<sup>88, 89, 90</sup>.

La búsqueda de microorganismos capaces de ser aprovechados industrialmente y como fuente de proteína unicelular, que cumplan con las exigentes normas que enmarca la microbiología industrial, da como resultado que los investigadores hayan llegado a los nacimientos de aguas termales, cráteres de volcanes, vetas de minerales, tuberías hospitalarias, lecho marino, tractos digestivos de diversos organismos, entre otros.

Hoy en día está muy ligado el concepto de proteína unicelular al de los pre y probióticos ya que estos tienen su origen en el organismo hospedador, que en consecuencia presentan una relación de mutualismo, lo que posibilita el estudio y la investigación de fuentes proteicas ligadas a la flora intestinal de los diferentes organismos<sup>91</sup>.

**2.6.3 El canal digestivo como habitat de microorganismos.** La flora microbiana que habita en el canal digestivo forma parte de un complejo ecosistema. La estabilidad de este ecosistema se debe a factores que en parte están relacionados con el hospedador y en parte con los microorganismos.

El resultado de las interacciones hospedador-microorganismo, es un ecosistema integrado por miles de microorganismos, cada uno de los cuales esta ocupado por la especie o cepa del microorganismo mejor adaptado a esta ubicación, con exclusión de los demás<sup>92</sup>.

Los microorganismos que han colonizado el intestino delgado son responsables de procesos metabólicos, enzimáticos y de absorción de nutrientes, que por sus cualidades y producción de metabolitos, son hoy en día aprovechados por la industria. Siendo los microorganismos del genero *Bacillus* los mas empleados en la elaboración de raciones para la alimentación aviar<sup>93,94</sup>.

---

<sup>88</sup> REED, Op. cit., p. 176

<sup>89</sup> MADIGAN, Op. cit., p. 384

<sup>90</sup> CALERO, Op. cit., p. 28.

<sup>91</sup> JAYNE, W. Y FULLER, R. Influencia de los microorganismos intestinales en la alimentación de las aves. En: Fisiología y bioquímica de las aves de corral, Academic Press Inc. Reino Unido (1991); p. 72 - 92

<sup>92</sup> Ibid., p. 85

<sup>93</sup> MORGAN, J. Y LEWIS, D. Nutrition of pigs and poultry. Reino Unido : Butterworths and Company Publisher, 1995, p. 176

La flora microbiana del pollo esta distribuida a lo largo de todo el tubo digestivo, siendo los ciegos el mayor reservorio, que se caracteriza por contener gran cantidad de bacterias Gram negativas, entre ella bacterias del genero *Clostridium*, entre tanto la molleja es el órgano con menor cantidad de microorganismos. El intestino delgado o intestino tenue es el habitat de un gran número de microorganismos entre los que sobresalen las bacterias anaerobias facultativas Gram positivas<sup>95</sup>.

Dichas bacterias presentan ventajas en cuanto al resto de microorganismos debido a que su velocidad de crecimiento es mayor, consumen una gran variedad de sustratos y alrededor de 80% de su masa es proteína, por lo tanto pueden ser empleadas en procesos biotecnológicos, como en la producción de proteína unicelular.

Cabe anotar que esta proteína es deficiente en aminoácidos azufrados, por lo tanto debe ser suplementada en este elemento<sup>96, 97</sup>. La tabla 6 muestra la microbiota normal de gallinas y pollos.

Tabla 6. Microbiota normal de gallinas y pollos

| MICROORGANISMO                         | No MICROORGANISMOS VIABLES/gr DE CONTENIDO <sup>A</sup> |         |                   |           |                     |
|----------------------------------------|---------------------------------------------------------|---------|-------------------|-----------|---------------------|
|                                        | ESTOMAGO                                                |         | INTESTINO DELGADO |           | CIEGOS <sup>C</sup> |
|                                        | BUCHE                                                   | MOLLEJA | ANTERIOR          | POSTERIOR |                     |
| <i>Anaerobios</i> <sup>D</sup>         | 3                                                       | 2-3     | <2                | <2        | 8-9                 |
| <i>Enterobacteriaceae</i> <sup>B</sup> | NR                                                      | NR      | 1-2               | 1-3       | <3                  |
| <i>Streptococos sp</i>                 | 2                                                       | <2      | 4                 | 3-5       | <4                  |
| <i>Lactobacillus spp</i> <sup>E</sup>  | 5-6                                                     | 2-3     | 8-9               | 8-9       | NR                  |
| <i>Clostridium perfringens</i>         | <2                                                      | <2      | <2                | <2        | 4-5                 |
| <i>Bacillus cereus</i> <sup>E</sup>    | NR                                                      | NR      | NR                | <4        | < 3                 |
| <i>Bacteroides amilophilus</i>         | < 2                                                     | NR      | 3-4               | 5-4       | < 2                 |
| <i>Clostridium sp</i>                  | < 2                                                     | NR      | < 2               | < 2       | 8-9                 |
| Esta Investigación                     |                                                         |         |                   |           |                     |

<sup>94</sup> TORTUERO, F., MARTÍN, L., REJAS, J. The efect of *Bacillus cereus* or verginiamycin in Broilers barley diets on the perforrmance, cecal flora and intestinal tract length. España : Instituto de Alimentación Animal C.S.I.C., 1999

<sup>95</sup> MORGAN, Op. cit., p. 177

<sup>96</sup> JAYNE, Op. cit., p. 80

<sup>97</sup> MORGAN, Op. cit., p. 177

A : Expresado como log10 del numero de microorganismos cultivados

B : Principalmente *E. Coli*

C: Reportado por Morgan, *et all.*, 1995

D: Entrevista personal Ph. D. Edmundo Apraez

E: Colonizadores del intestino delgado

NR: No Reportada

La bacterias que han logrado colonizar el intestino delgado son responsables de procesos metabólicos muy importantes que ayudan a la digestión y absorción de nutrientes es así como los microorganismos del genero *Bacillus*, son responsables en gran parte de la actividad enzimática que se efectúa en este sitio<sup>98</sup>.

Las bacteria lácticas o BAL, han sido capaces de colonizar el tracto gastroenterico de las aves demostrando ser eficaces como estimulantes del crecimiento y la eficacia nutritiva de pollos. Además, estos microorganismos producen enzimas extracelulares de carácter amilolítico, como la  $\beta$ -glucanasa y la  $\alpha$ -amilasa, las cuales desdoblan polisacáridos complejos y simples, para ser asimilados por el ave, igualmente producen otros metabolitos importantes para el desarrollo del ave, como son las vitaminas en especial la E, la B<sub>6</sub> y la B<sub>12</sub>, ayudan en la absorción de minerales, y sobre todo mantienen este microsistema en un completo y estable equilibrio con la producción de bacteriocinas, que ayudan a mantener la estabilidad del mismo<sup>99</sup>.

Dentro de los microorganismos que han colonizado el intestino delgado y hacen parte de la microbiota normal de las aves de engorde, esta el *Bacillus cereus*, una bacteria anaerobia facultativa, esporulada, cuyas cepas se desarrollan en diversos rangos de temperatura, desde los 4-8° C cepas psicrófilas de origen ambiental y entre los 35-55°C cepas mesófilas, éstas ultimas tienen una temperatura óptima de crecimiento a los 37°C y generalmente son las cepas que se han aislado de los tractos digestivos de aves de corral<sup>100, 101</sup>

Esta bacteria se haya ampliamente difundida en la naturaleza ya sea como bacteria o en su forma vegetativa de espora. Se encuentra principalmente en el suelo, polvo, en

---

<sup>98</sup> JAYNE, Op. cit., 81

<sup>99</sup> Ibid., p. 81

<sup>100</sup> Ibid, p. 82

<sup>101</sup> TORTUERO, Op. cit., p. 32

cereales, tubérculos, en pelo y plumas de animales e infinidad de productos hortofrutícolas frescos.

*Bacillus cereus* se caracteriza por ser patógena para el hombre por sus toxinas. En la naturaleza esta bacteria se encuentra en un orden menor de 10<sup>2</sup> UFC/g de alimento, cantidad de bacterias insuficientes para producir toxinas. En cuanto supera esta cifra, las toxinas que libera pueden desencadenar una toxiinfección alimentaria, produciendo diarrea y vómito al cabo de las 4-6 horas de la ingesta. La dosis necesaria para producir esta toxina es variable y oscila entre 10<sup>3</sup>- 10<sup>10</sup> UFC/g. Es estable a la exposición de pH extremos y a la acción de enzimas proteolíticas gástricas e intestinales, como la tripsina y la pepsina.<sup>102,51</sup>

No obstante la bacteria dentro del ave cumple una serie de funciones benéficas para esta, ya que *Bacillus cereus* es responsable de procesos enzimáticos que ayudan en la absorción y metabolismo de nutrientes, especialmente de carbohidratos, ya que produce glucosil hidrolasa,  $\alpha$  - amilasa y amilomaltasa. Además esta bacteria produce metabolitos extracelulares importantes en el desarrollo aviar, como vitaminas B1, B6 y B12, y la virginiamicina, un antibiótico que ayuda a controlar microorganismos patógenos de las aves, y que además contribuye a la elongación del intestino delgado, mejorando los procesos de absorción y metabolismo de nutrientes<sup>103,104</sup>

## 2.7 NUTRICIÓN AVIAR

**2.7.1 Aparato digestivo.** El tubo digestivo o canal alimentario es, en esencia, un tubo que va desde la boca hasta el ano, este consta básicamente de ocho partes y dos órganos accesorios que son el hígado y el páncreas. A continuación se hace una breve descripción de cada uno de ellos:<sup>105</sup>

- *Boca.* La boca de las aves no tiene labios ni dientes y posee pocas glándulas salivales, en cambio esta provista de una lengua que le ayuda a empujar el alimento hacia el esófago.
- *Esófago.* Esta situado debajo de la boca y conectado al buche.

---

<sup>102</sup> Ibid., p. 32

<sup>103</sup> JAYNE, Op. cit., p. 74

<sup>104</sup> TORTUERO, Op. cit., p. 32

<sup>105</sup> AVILA, GONZALES E. Alimentación de las aves. México : Editorial Trillas, 1992

- *Buche.* Este funciona como órgano de almacenamiento y da paso al alimento hacia el aparato digestivo, en este órgano, el alimento se remoja con agua y saliva de la boca; de modo que el buche permite a las aves consumir grandes cantidades de alimento, a pesar de su carencia de dientes del buche el alimento pasa al proventrículo.
- *Proventrículo.* También se lo conoce como estomago glandular, contiene glándulas que secretan jugo gástrico.
- *Molleja.* Gracias a sus músculos cubiertos internamente por epitelio cornificado las aves muelen el alimento que pasa de ahí al intestino delgado.
- *Intestino delgado.* Este tubo es corto y el alimento entra a él por el asa duodenal, donde continúan los procesos de absorción y digestión, los cuales terminan en las porciones más bajas del mismo intestino. Del intestino delgado el alimento pasa al intestino grueso.
- *Hígado.* En él se elabora la bilis, que contiene sales biliares, colesterol, lecitina, grasa, pigmentos y mucina. La bilis es importante para la emulsificación, digestión y absorción de las grasas; además, se secreta por los conductos biliares al duodeno.
- *Páncreas.* Vierte el jugo pancreático en los conductos pancreáticos, que se vacían en el duodeno y actúa sobre proteínas, carbohidratos y grasas.
- *Intestino grueso.* Este es corto y absorbe agua, en la unión de este con el intestino delgado, existen dos ciegos bien definidos, donde se realiza algo de digestión bacteriana de la fibra.
- *Cloaca.* Es un órgano excretor común para los sistemas digestivos y genitourinarios y termina exactamente en el ano.

**2.7.2 Digestión.** Es el proceso mediante el cual las macromoléculas de proteína, grasa y carbohidratos se desdoblan en compuestos más simples. La digestión se lleva a cabo por acción de los jugos digestivos que son excretados por las paredes del tracto digestivo o de órganos accesorios y contienen agua, enzimas, entre otros<sup>106</sup>.

Los jugos digestivos son:

---

<sup>106</sup> Ibid., p. 115

- *La saliva.* Esta es excretada en pequeñas cantidades y contiene ptialina (amilasa), que ayuda a desdoblar el almidón en glucosa, maltosa y dextrinas; la saliva también ayuda a reblandecer el alimento.
- *Jugo gástrico.* Contiene agua, HCl y pepsina, que desdoblan las proteínas en proteosas y peptonas.
- *Bilis.* Emulsifica y saponifica las grasas.
- *Jugo pancreático.* Contiene tripsina, quimotripsina y carboxipeptidasa que desdoblan las proteínas en peptonas y péptidos; amilasa que desdobla el almidón en glucosa, maltosa y dextrinas; además, lipasa que actúa en las grasas, convirtiéndolas en ácidos grasos y monoglicéridos.
- *Jugo gástrico.* Este es segregado por las paredes del intestino delgado contiene peptidasas, que desdoblan los péptidos en aminoácidos; maltasa, que rompe la maltosa en glucosa; sacarasa que convierte la sacarosa en glucosa y fructuosa, y la enzima oligo 1-6 glucosidasa, que desdobla dextrinas en maltosa y glucosa.

Los residuos no digeridos son excretados por las heces. Los productos nitrogenados de desecho no se almacenan, sino que la orina se vierte a la cloaca y se pone en contacto con las heces la orina se excreta como una solución de ácido úrico. La digestión es rápida en las aves ponedoras, lleva alrededor de dos horas y media mientras que en las aves de engorde es un poco mas lenta<sup>107</sup>.

**2.7.3 Absorción y metabolismo.** Los productos de la digestión pasan a través de la pared del intestino delgado hacia el torrente circulatorio. La absorción de los nutrientes se realiza mediante sistemas de transporte especializados y se ve favorecido por la presencia de vellosidades, que aseguran una rápida y completa absorción de los nutrientes digeridos. La sangre transporta los nutrientes absorbidos al hígado, de esta forma los nutrientes son utilizados en el metabolismo<sup>108</sup>.

Las aves utilizan la glucosa como fuente de energía y cuando se dispone de cantidades elevadas se almacena en forma de glucógeno en músculos e hígado, y/o se sintetiza en grasa y se almacena en el tejido adiposo, además sintetizan ácidos grasos esenciales a

---

<sup>107</sup> Ibid., p. 115

<sup>108</sup> Ibid., p. 116

partir de carbohidratos en el hígado, de donde son transportados al tejido adiposo o las gónadas. Los carbohidratos son los esqueletos de carbono necesarios para sintetizar muchos otros productos orgánicos<sup>109</sup>.

Las grasas pueden oxidarse rápidamente en agua, CO<sub>2</sub>, y energía, pero además pueden almacenarse directamente en el tejido adiposo en las aves de engorde, mientras que en las ponedoras la grasa se almacena en el tejido adiposo y transferirse al huevo. Además los ácidos grasos esenciales pasan a hacer parte de las membranas celulares<sup>110</sup>.

Los aminoácidos se utilizan para la síntesis de proteínas ya sea para construcción o reparación de tejidos, los aminoácidos que se encuentren en exceso, se deaminan en el hígado para sintetizar aminoácidos no esenciales o simplemente se desechan en la orina en forma de ácido úrico<sup>111</sup>.

Los minerales pasan a hacer parte de las estructuras óseas y cascarones de los huevos o se emplean en los tejidos blandos. Mientras que las vitaminas se almacenan en el hígado y en otros tejidos.

Los productos finales del metabolismo agua, CO<sub>2</sub>, y ácido úrico se eliminan junto con otros productos de desecho a través de la orina. Agua y CO<sub>2</sub>, se excretan a través de los pulmones, el resto de los desperdicios del cuerpo se eliminan vía las heces<sup>112</sup>.

**2.7.4 Energía.** Los alimentos, al ser desdoblados mediante la digestión, liberan energía, la cual se utiliza en todos los procesos fisiológicos del ave: movimiento, respiración, circulación, absorción, excreción, reproducción regulación de temperatura, es decir para realizar todos los procesos vitales. La figura 5. muestra la energía proporcionada por el alimento a las aves.

---

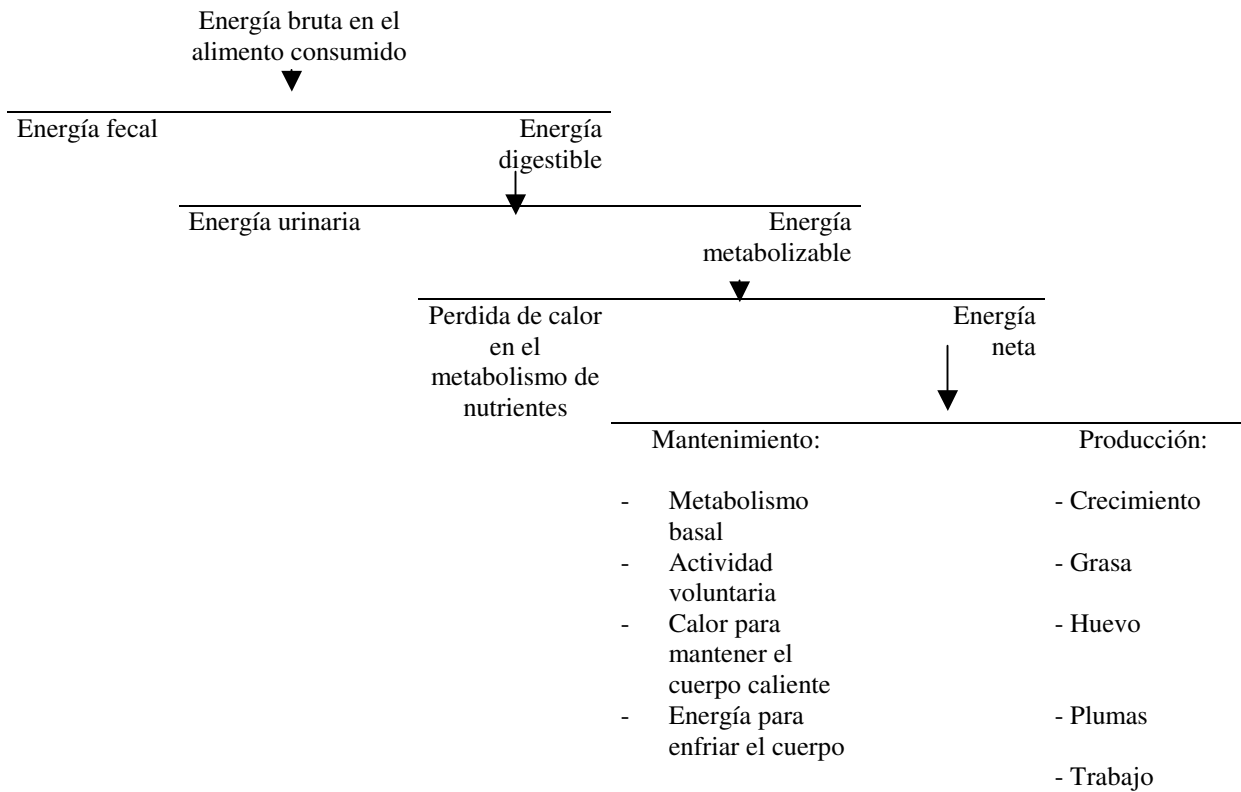
<sup>109</sup> Ibid., p. 117.

<sup>110</sup> Ibid., p. 117.

<sup>111</sup> MORGAN, Op. cit., p. 179.

<sup>112</sup> AVILA, Op. cit., 120

Figura 5. Energía suministrada por los alimentos a las aves de engorde



North, 1982<sup>113</sup>

- **Fuentes de energía.** Dentro de los alimentos que se emplean como fuente de energía se encuentran los cereales, se caracterizan por su alto contenido de almidón, baja cantidad de fibra y proteína y deficiencia en aminoácidos esenciales como la lisina y la metionina. Pero también hay otros productos que son ricos en carbohidratos como la melaza de caña y remolacha, el plátano y tubérculos como la papa y la yuca<sup>114</sup>.

La tabla 7. muestra la composición bromatológica de algunas materias primas ya sea de origen nacional o importadas que se emplean en la industria avícola colombiana con destino a la alimentación de aves de engorde tipo Broiler. A así mismo muestra energía metabolizable (E.M.) en Kcal/Kg, que brinda cada materia prima a las aves.

<sup>113</sup> North, Marck. Manual de producción avícola. México : Editorial el Manual Moderno, 1982

<sup>114</sup> MORGAN, Op. cit., p. 201

Tabla 7. Análisis bromatológico de alguna fuentes de energía

| <b>Materia prima</b> | <b>Proteína %</b> | <b>Grasa %</b> | <b>ELN</b> | <b>Fibra %</b> | <b>Cenizas %</b> | <b>E.M. Kcal/Kg</b> |
|----------------------|-------------------|----------------|------------|----------------|------------------|---------------------|
| Maíz                 | 8.0               | 4.0            | 71.5       | 2.6            | 1.2              | 3417                |
| Sorgo                | 8.8               | 2.3            | 71.7       | 2.7            | 1.3              | 3256                |
| Trigo                | 12.6              | 1.4            | 71.0       | 2.6            | 1.4              | 3071                |
| Cebada               | 7.5               | 1.4            | 70.2       | 6.8            | 3.0              | 2646                |
| Avena                | 11.8              | 4.5            | 58.5       | 11.0           | 3.2              | 2510                |
| Arroz                | 7.5               | 0.4            | 80.2       | 0.4            | 1.2              | 3100                |
| Harina de papa       | 7.0               | 0.6            | 77.2       | 1.5            | 3.2              | 2640                |
| Melaza de caña       | 4.0               | 2.0            | 61.7       | -              | 8.6              | 1958                |
| Harina de yuca       | 3.9               | 0.91           | 80.2       | 1.2            | 0.41             | 2970                |
| Harina de plátano    | 4.7               | 3.1            | 76.1       | 4.3            | 1.8              | 1986                |

POLLOS, 2002 <sup>115</sup>

Manual de nutrición aviar, 2003<sup>116</sup>

Manual Técnico Avícola, 2003<sup>117</sup>

- **Fuentes de albúminas y aminoácidos.** La tabla 8 muestra algunas materias primas con un alto contenido de proteína bruta y así mismo hace una sinapsis de los mas importantes portadores de albúmina y su concentración en proteína bruta, así como de los aminoácidos lisina y metionina, junto con la cistina, que son casi siempre los elementos limitantes, además de el contenido de energía metabolizable para aves tipo Broiler.

Tabla 8. Composición proteica y aminoácidos de algunos alimentos

| <b>MATERIA PRIMA</b> | <b>PROTEINA BRUTA %</b> | <b>METIONINA + CISTINA %</b> | <b>LISINA</b> | <b>E.M. Kcal/Kg</b> | <b>UNIDADES ALIMENTICIAS ENERGETICAS PARA AVES/ Kg</b> |
|----------------------|-------------------------|------------------------------|---------------|---------------------|--------------------------------------------------------|
| Harina de sangre     | 82.1                    | 2.03                         | 6.86          | 2940                | 543                                                    |
| Harina de pescado    | 67.0                    | 2.73                         | 5.20          | 3000                | 513                                                    |
| Gluten de maíz       | 63.0                    | 2.40                         | 1.20          | 3800                | 474                                                    |
| Pasta de soja        | 42.9                    | 1.25                         | 2.75          | 2620                | 445                                                    |
| Pasta de girasol     | 39.7                    | 1.58                         | 1.43          | 2030                | 429                                                    |
| Pasta de algodón     | 34.3                    | 1.10                         | 1.32          | 2530                | 341                                                    |
| Lev. de cerveza      | 23.2                    | 0.80                         | 0.76          | 1840                | 386                                                    |

Jeroch. 1998<sup>118</sup>

<sup>115</sup> POLLOS, Cartilla divulgativa de SOLLA LTDA., Buga, Colombia 2002

<sup>116</sup> Manual de Nutrición Aviar, Cartilla divulgativa para avicultores FINCA S.A., Bogota, Colombia 2003

<sup>117</sup> Manual Técnico Avícola, Cartilla divulgativa de ITALCOL S.A., Bogota, Colombia 2003

- **Aditivos.** Estas sustancias se le adicionan al alimento para que estos resulten mas eficaces. Estos cumplen diversas funciones, como prevenir enfermedades, estimular el crecimiento, antioxidantes, pigmentantes de carne y huevos, y otros simplemente para dar textura al alimento aviar. Entre los mas comunes tenemos<sup>119</sup>:
  - *Antibióticos.* Sus funciones dentro de las raciones de aves tipo Broiler, esta la de tratar infecciones particulares además de reducir la incidencia de infecciones bacterianas a niveles subclínicos del tracto digestivo. Entre los antibióticos mas empleados esta la penicilina procainica, la oxitetraciclina, la clortetraciclina, la bacitracina y la virginiamicina, a razón de 10g/ton de alimento.
  - ï *Arsenicales.* Su mecanismo de acción es similar al de los antibióticos, el acido arsenilico el arsanilato de sodio se emplean a niveles de 67.5g/ton de alimento como promotores del crecimiento y de la pigmentacion de las aves tipo Broiler.
  - ï *Furazolidona.* Esta droga antimicrobiana se emplea con estimulante del crecimiento y ayuda en la prevención de enfermedades.
  - ï *Antioxidantes.* Las raciones que tienen un contenido elevado de grasas y vitaminas A, E, y D, tienden a la rancidez, lo que conllevaría a la inapetencia de la aves. Por lo tanto su función es de evitar su desnaturalización, además pueden prevenir la encefalomalacia y ayudan en la pigmentación de la piel de las aves. Como antioxidante se emplean vitamina E, acido ascórbico, BHT, y etoxiquin, a razón de 163g/ton de alimento.
  - ï *Pigmentantes.* Por cuestiones de mercado se a creado en la mente del consumidor que entre mas amarilla la piel y mas rosa la carne, esta es mas fresca, lo que a generado que los productores de aves y de huevos, ofrezcan a sus aves alimentos con una dosis de elementos que permitan pigmentar la carne como las yemas de los huevos. Para ello emplean xantofilas y carotenoides, que se emplean a razón de 40g/ton de alimento para ponedoras y 150g/ton alimento para aves de engorde.
  - ï *Aglutinantes.* Estos ayudan a dar consistencia y palatabilidad al pelet, entre los mas utilizados están la bentonita que se emplea a razón de 2 –2.5%, la melaza de caña y grasas a razón de 3 –3.5%

---

<sup>118</sup> JEROCH, HEINZ, Nutrición de Aves. España : Editorial Acribia, 1998

<sup>119</sup> MORGAN, Op. cit., p. 201.

**2.7.5 Raciones alimenticias.** En la formulación de raciones para ves de engorde tipo Broiler se debe tener en cuenta cuatro aspectos que permiten obtener los mejores resultados en cuanto peso de las aves como a los costes por alimentación en que se incurre<sup>120, 121</sup>;

- Los alimentos deben proporcionar a las la sufriente energía
- Suministrar los nutrimentos necesarios para que las aves puedan cumplir con sus funciones vitales de una manera adecuada.
- Controlar los alimentos ya sea por escasez o por abundancia.
- Se debe estimar de manera adecuada los costes de levante, engorde y mantenimiento de las aves.

Dentro de la alimentación aviar es muy importante tener en cuenta los requerimientos mínimos de nutrimentos que las aves necesitan, ya que de esta depende en gran medida la ganancia de peso de las estas, y la minimización de los costes de producción<sup>122, 123</sup>

Las aves destinadas a la alimentación humana como son los pollos tipo Broiler, se les reconoce tres etapas fisiológicas de desarrollo, la primera una etapa de *Iniciación* que va desde el primer día de vida hasta aproximadamente los 24 o 26 días aproximadamente o cuando el ave alcance los 1200 a 1400g de peso corporal.<sup>124,125,126</sup>

En este periodo de vida a las aves se les tiene que suministrar un alimento que tenga como mínimo 20% de proteína, además de un alto contenido de energía metabolizable (E.M.) y con alto volumen de vitaminas, minerales mayores y menores, antibiótico, estimulantes del desarrollo, anticoccidiales entre otros, que ayuden al pollito a tener un desarrollo rápido, económico y adecuado.

Una segunda etapa corresponde a la *Crecimiento y desarrollo*, esta va desde los 24 hasta los 42 días de vida. En esta etapa a las aves se les debe suministrar un alimento altamente

---

<sup>120</sup> MORGAN, Op. cit., p. 202.

<sup>121</sup> NORTH, Op. cit., p. 143

<sup>122</sup> MORGAN, Op. cit., p. 202.

<sup>123</sup> NORTH, Op. cit., p. 143

<sup>124</sup> POLLOS, Op. cit., p. 17

<sup>125</sup> MANUAL DE NUTRICION AVIAR, Op. cit., p. 38

<sup>126</sup> MANUAL TÉCNICO AVÍCOLA, Op. cit., p. 22

energético, con un contenido mínimo de 19% de proteína, y un excelente balance de aminoácidos.

Una ultima fase es la de *Mantenimiento y finalización* que va desde los 42 hasta los 49 días, en este periodo a las aves se les debe suministrar un alimento con altos niveles de energía metabolizable (E.M), con un contenido proteico de 18% como mínimo. En este periodo el pollo consume aproximadamente el 25% del alimento y tiene un aumento de peso aproximado de 500g.

En esta fase se debe tener cuidado ya que la mayoría de los alimentos procesados comerciales destinados a la alimentación aviar para este periodo de vida, se les ha retirado las drogas anticoccidenciales para permitir un mayor desarrollo y eliminar residuos de aditivos en el producto final, además de los antibióticos y los estimulantes del crecimiento y desarrollo.

La tabla 9. muestra las cantidades en porcentaje de los requerimientos mínimos y máximos nutricionales para cada fases de desarrollo aviar en especial de aves tipo Broiler (pollos de engorde o asadero)<sup>127,128, 129</sup>

El consumo de alimentos por parte de las aves depende de sus necesidades de energía y no de sus necesidades de aminoácidos. Esto quiere decir que cuanto mayor contenido energético haya en la dieta, menor será el consumo de alimento por el ave y viceversa, a menor contenido energético, mayor consumo de alimento. Por lo tanto el contenido energético de la dieta determina el consumo de todos los nutrientes la relación energía/proteína se expresa como sigue:

$$\text{Calorías/proteína} = \frac{\text{kilocalorías por Kilo}}{\text{Porcentaje de proteína}}$$

---

<sup>127</sup> POLLOS, Op. cit., p. 17

<sup>128</sup> MANUAL DE NUTRICION AVIAR, Op. cit., p. 39

<sup>129</sup> MANUAL TÉCNICO AVÍCOLA, Op. cit., p. 23

Tabla 9. Composición de los raciones para aves tipo Broiler según su fase fisiológica de desarrollo

### **AVES EN INICIACION**

| <b>COMPOSICION</b>     | <b>CONTENIDO (%)</b> |
|------------------------|----------------------|
| Proteína (máximo)      | 20.0                 |
| Humedad (máximo)       | 13.0                 |
| Grasa (mínimo)         | 2.5                  |
| Carbohidratos (mínimo) | 49.5                 |
| Fibra (máximo)         | 5.0                  |
| Cenizas (máximo)       | 8.0                  |

### **CRECIMIENTO Y DESARROLLO**

|                        |      |
|------------------------|------|
| Proteína (máximo)      | 19.0 |
| Humedad (máximo)       | 13.0 |
| Grasa (mínimo)         | 2.5  |
| Carbohidratos (mínimo) | 51   |
| Fibra (máximo)         | 5.0  |
| Cenizas (máximo)       | 8.0  |

### **MANTENIMIENTO Y FINALIZACIÓN**

|                        |      |
|------------------------|------|
| Proteína (máximo)      | 18.0 |
| Humedad (máximo)       | 13.0 |
| Grasa (mínimo)         | 2.5  |
| Carbohidratos (mínimo) | 52.5 |
| Fibra (máximo)         | 5.0  |
| Cenizas (máximo)       | 8.0  |

POLLOS, 2002

Manual de nutrición aviar, 2003

Manual Técnico Avícola, 2003

Es así como las aves tipo Broiler necesitan de una relación Calorías/proteína de 132-143 desde las 0 –5 semanas de vida. Mientras que desde la semana 6 a la 7 necesitan de una relación de 152-165. Cuando existen condiciones adecuadas tanto del orden ambiental, de acomodación, como nutricional, la ganancia de peso en las aves es evidente, reflejándose en el aumento de la talla de las aves, además de la disminución la mortalidad. La tabla 10 muestra un patrón dietario de las aves tipo Broiler según sus semanas de vida.

Tabla 10. Patrón dietario de pollos tipo Broiler

| Semana | Consumo promedio ave | Consumo semanal | Consumo acumulado | Ganancia de peso promedio/día | Peso promedio ambos sexos | Conversión acumulada | Mortalidad acumulada |
|--------|----------------------|-----------------|-------------------|-------------------------------|---------------------------|----------------------|----------------------|
| 1      | 14-19                | 102-133         | 102-133           | 10.0-14.0                     | 110-140                   | 0.95-1.10            | 0.8-1.00             |
| 2      | 34-38                | 240-438         | 342-438           | 20.0-25.0                     | 260-320                   | 1.30-1.40            | 1.5                  |
| 3      | 58-65                | 410-456         | 725-894           | 35-43                         | 510-620                   | 1.40-1.45            | 2.5                  |
| 4      | 82-98                | 575-690         | 1327-1584         | 46-62                         | 840-1050                  | 1.50-1.60            | 3.5                  |
| 5      | 120-138              | 862-967         | 2189-2551         | 63-72                         | 1280-1550                 | 1.65-1.72            | 4.5                  |
| 6      | 160-170              | 1120-1186       | 3309-3737         | 64-70                         | 1750-2000                 | 1.85-1.90            | 5.5                  |
| 7      | 180-185              | 1270-1275       | 4579-5012         | 60-64                         | 2200-2400                 | 2.05-2.15            | 6.5                  |

POLLOS, 2002

Manual de Nutrición Aviar, 2003

Manual Técnico Avícola, 2003

- Las cifras de la izquierda (rango inferior) corresponden a alimentación restringida en clima frío.
- Las cifras de la derecha (rango superior) corresponden a alimentación controlada en clima cálido.
- Los pesos y las conversiones parciales son sin alimento en el buche y en la granja.

Mientras que los requerimientos de proteína y de aminoácidos para aves de tipo Broiler en cada una de sus etapas de producción, es decir desde el primer día hasta su sacrificio (semana 7), son expresadas como porcentajes de la dieta tal como se muestra en la tabla 11.

Tabla 11. Necesidades de proteínas y aminoácidos esenciales para aves de engorde tipo Broiler (como porcentaje en la ración)

| <b>REQUERIMIENTO<br/>NUTRICIONAL<br/>PROTEICO</b> | <b>INICIACIÓN<br/>0-4 semanas</b> | <b>CRECIMIENTO Y<br/>DESARRROLLO<br/>4 –5 semanas</b> | <b>MANTENIMIENTO<br/>Y FINALIZACIÓN<br/>6-7 semanas</b> |
|---------------------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| Arginina                                          | 1.10                              | 0.95                                                  | 1.40                                                    |
| Glicina + Serina                                  | 0.75                              | 0.65                                                  | 1.10                                                    |
| Histidina                                         | 0.30                              | 0.26                                                  | 0.40                                                    |
| Isoleucina                                        | 0.65                              | 0.60                                                  | 0.80                                                    |
| Luecina                                           | 1.20                              | 1.00                                                  | 1.50                                                    |
| Metionina + Cistina                               | 0.70                              | 1.00                                                  | 0.86                                                    |
| Metionina                                         | 0.40                              | 0.32                                                  | 0.46                                                    |
| Fenilalanina                                      | 0.62                              | 0.54                                                  | 0.70                                                    |
| Treonina                                          | 0.62                              | 0.56                                                  | 0.80                                                    |
| Triptófano                                        | 0.18                              | 0.15                                                  | 0.23                                                    |
| Valina                                            | 0.75                              | 0.62                                                  | 0.90                                                    |
| Proteína                                          | 20                                | 18                                                    | 22                                                      |
| E.M.(Kcal/Kg)                                     | 2900                              | 2800                                                  | 3000                                                    |
| Fibra (máximo)                                    | 4                                 | 6                                                     | 4                                                       |

Ávila, 1992

### **3. METODOLOGÍA**

El desarrollo del presente trabajo se llevó a cabo en tres fases:

1. Se realizó el aislamiento, propagación, purificación, conservación e identificación del género de los aislados provenientes de intestino tenue de pollo tipo Broiler de cuatro semanas de edad.
2. Se determinó el aislado con mayor capacidad amilolítica de las bacterias purificadas.
3. Se diseñó el medio de cultivo óptimo para el desarrollo de la bacteria aislada de acuerdo a parámetros como formación de biomasa, consumo de carbohidratos y producción de proteína. Para esto se tomó como control el agar almidón (Probalo®) (Anexo A).

#### **3.1 FASE I. AISLAMIENTO DE BACTERIAS AMIOLÍTICAS DE INTESTINO TENUE DE POLLO TIPO BROILER**

##### **3.1.1 Propagación**

1. Disección cloacal e intestinal. Para la extracción del material de estudio se emplearon seis pollos tipo Broiler de cuatro semanas de edad. Los individuos seleccionados presentaban excelentes condiciones fisiológicas (talla y peso) y sanitarias, como se verificó mediante inspección visual efectuada por la Médico Veterinario Neida Chavez, Coordinadora Programa de Sanidad Avícola FENAVI – FONAV - ICA en el proceso de selección en pié en galpón e inspección visual de vísceras rojas y blancas en la disección de las aves.

Una vez se insensibilizó el ave por asfixia, se la ubicó en una bandeja estéril, con el pecho hacia arriba y se procedió a limpiar el área con alcohol antiséptico, retirando las plumas de la misma. Con un bisturí estéril se realizó un corte longitudinal desde el pecho hasta el ano, desprendiendo el plumaje restante y la piel, de manera que quedó libre el músculo y hueso; la piel junto con el plumaje lateral se recubrieron con algodón estéril para evitar contaminación. Seguidamente se realizó un corte trasversal recorriendo el externón y se dejó al descubierto el área del sistema digestivo comprendida entre la molleja y el ano. Se ubicaron los dos extremos del intestino

delgado, se sujetaron con pinzas quirúrgicas estériles y se procedió a su separación (Fotografías 1 y 2).

Fotografía 1. Proceso de Disección



Fotografía 2. Proceso de extracción de intestino tenue



El intestino tenue separado se traspasó a una caja petri estéril donde se procedió a realizar un corte longitudinal a través del mismo. Empleando una espátula estéril se realizó un raspado del contenido intestinal y la mucosa obteniendo las muestras a trabajar.

2. Las muestras se pesaron sobre papel aluminio estéril en proporción 1:10 peso/volumen, o sea un gramo de muestra en la balanza analítica (OHAUS No. CT600®) y se vertió a 10 ml de caldo Todd Hewitt (BBL®) (Anexo A) y caldo Tioglicolato (Merck®) (Anexo A). Se incubó por espacio de 48 horas a 37°C.
3. Simultáneamente se pesó 1 gramo de contenido intestinal en papel aluminio estéril y se diluyó en 9 ml de solución salina peptonada al 0,89 % (Anexo A), (dilución  $10^{-1}$ ), se homogenizó en vórtex (JANKE & KUNKEL IKA LABORTECHNIK VF<sub>2</sub>®), y se realizaron diluciones decimales por duplicado en solución salina peptonada al 0,89 % hasta  $10^{-7}$ . A continuación se tomaron 100 µl de cada dilución y se sembraron por duplicado sobre agar MRS (Oxoid®) (Anexo A) modificado con azul de anilina (3 ml/l) y agar nutritivo (Merck®) (Anexo A), extendiendo la muestra con perlas de vidrio estériles con movimientos circulares. Se incubó a 37°C evaluando el crecimiento de microorganismos a las 24, 48 y 72 horas.

### 3.1.2 Aislamiento

4. Transcurridas las 72 horas se tomaron los tubos que presentaron turbiedad y se sembraron 0,1 ml de la muestra en agar MRS (Oxoid®) y agar Nutritivo (Merck®), suplementados con cicloexamida β sulfato (Merck®) (0,001 g/ml), extendiendo el inóculo con perlas de vidrio estéril, las cajas sembradas se incubaron a 37°C por 24, 48 y 72 horas para permitir el desarrollo y crecimiento microbiano.
5. De las cajas que presentaron crecimiento sobre agar MRS (Oxoid®) se repicó con asa de argolla las colonias de morfología macroscópica típica para bacterias lácticas (colonias de color azul intenso, elevadas y de bordes externos enteros)<sup>130</sup>, sobre agar MRS almidón 20g/l y agar almidón al 20% de almidón. Se incubó a 37°C por 24, 48 y 72 horas.

---

<sup>130</sup> BREED, Robert, MURRIA, E.D., SMITH, Nathan. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Estados Unidos : The Williams & Wilkins Company, 1995; p. 1105-1140

Las cajas con crecimiento sobre agar Nutritivo (Merck®) se repicaron con asa de argolla tomando las colonias que presentaron morfología microscópica compatible con el género *Bacillus*, sobre agar MRS almidón 20g/l y agar almidón al 20% de almidón. Se incubó a 37° C por 24, 48 y 72 horas.

6. De los caldos turbios se tomó una asada y se sembró sobre agar MRS almidón 20g/l y agar almidón al 20 %, para permitir el desarrollo de bacterias amilolíticas. Se incubó a 37° C durante 24, 48 y 72 horas.

### **3.1.3 Purificación**

7. De las cajas de agar MRS almidón 20 g/l y agar almidón al 20% se repicó con asa de argolla y asa de punta las colonias de morfología típica para bacterias amilolíticas (que presentaron halos de hidrólisis alrededor de las colonias) a cajas con agar MRS modificado con azul de anilina. Se incubaron a 37° C durante 24, 48 y 72 horas. Del agar MRS modificado con azul de anilina se repicaron las colonias con morfología macroscópica típica para bacterias lácticas sobre agar MRS modificado con almidón 20g/l y agar almidón al 20 %; hasta observar cultivos completamente axénicos.

### **3.1.4 Identificación del Género**

8. Mediante coloración de Gram (Anexo B), se definió su morfología celular y se insinuó un posible genero.
9. Para verificar presencia de esporas en los asilados se realizó coloración de Scaeffler Fulton (Anexo B).
10. Se realizaron pruebas bioquímicas para el género *Bacillus* a los aislados obtenidos: Catalasa; Test de Voges-Proskauer; Fermentación de Glucosa; Arabinosa; Xilosa; Manitol; Hidrólisis de Caseína; Hidrólisis de Gelatina; Hidrólisis de Almidón; Degradación de Tyrosina; Deaminación de Phenylalanina; Producción de lecitinasa sobre yema de huevo; Formación de Indol; Reducción de nitratos a nitritos

### **3.1.5 Conservación**

11. Los aislados obtenidos e identificados por género se conservaron en tubo inclinado tapa rosca con agar almidón 5 g/l, constituyendo un stock de trabajo diario. La siembra se realizó con asa de punta por doble punción y estría en forma de cola de

pescado. Se incubaron a 37°C por 24 horas y se conservaron bajo refrigeración a 4-8°C en la puerta del refrigerador (HACEB®).

12. Se sembró una asada de los aislados de las cajas con agar almidón al 20% en caldo almidón al 5 g/l en tubos tapa rosca. Se incubaron a 37°C por 24 horas, transcurrido el tiempo, se adicionó glicerol estéril al 20%, una vez homogenizada la mezcla con movimientos circulares, se transfirió 1 ml a tubos nunc (CRYOBANC®) estériles y se conservaron a -64°C en termo de nitrógeno líquido (SEMEX®), para emplearlos como cepas madre.

### **3.1.6 Activación**

13. Los preservados establecidos como cultivos madre se transfirieron a erlenmeyers con 40 ml de caldo almidón estéril. Se incubaron a 37°C por 24 horas; transcurrido este tiempo se evaluó si había o no turbiedad en los caldos. De los caldos turbios se tomaron 4 ml y se transfirieron a otros erlenmeyers con la misma cantidad de caldo. Se incubaron en iguales condiciones. Finalmente se tomo una asada de los caldos turbios con asa de argolla y se repico por agotamiento en cajas con agar almidón las cuales se incubaron a 37°C por 24 horas.

## **3.2 FASE II. DETERMINACIÓN DEL AISLADO CON MAYOR CAPACIDAD AMIOLÍTICA**

Con un asa de punta se transfirió un inóculo pesado de las colonias purificadas puncionando en el centro de la caja petri con agar almidón 20 g/l, y se incubó a 37°C por 24 horas. Para revelar la hidrólisis del almidón las cajas fueron expuestas a vapores de yodo, el cual reacciona ante la presencia del polisacárido, formando el complejo yodo-almidón. Cuando hay hidrólisis, desaparece el color azul violáceo característico del complejo y se dejan visualizar ampliamente zonas claras, las cuales se extienden alrededor de las colonias bacterianas por la producción de amilasa extracelular que difunde por el medio<sup>131</sup>.

Este proceso se llevó a cabo bajo cámara de extracción de gases. Las cajas se llevaron inmediatamente a oscuridad durante 60 segundos aproximadamente, tiempo al cual se lograron visualizar claramente los halos y se tomaron las mediciones respectivas, para ello se realizaron 10 repeticiones correspondientes a cada aislado.

---

<sup>131</sup> BROCK, T. D. M. M.T. Microbiología. España : Editorial Acribia, 1993

Los resultados obtenidos se interpretaron mediante el análisis de varianza (ANDEVA) y la prueba de significancia de TUKEY permitiendo así la escogencia de una sola bacteria amilolítica para luego utilizarla en los ensayos de fermentación en los diferentes sustratos amiláceos.

### **3.3 FASE III. DISEÑO DEL MEDIO DE CULTIVO**

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el análisis anterior se seleccionó el aislado con mejor capacidad amilolítica, que sirvió como referencia para proponer la preparación del medio de cultivo que optimice su el crecimiento y producción de biomasa.

La optimización del medio de cultivo se realizó mediante la metodología de la superficie de respuesta que utiliza un diseño factorial compuesto por puntos centrales y puntos estrella, definiendo como variable de respuesta la producción de biomasa y como variables la composición del medio de cultivo, en este caso en particular cuenta con tres ingredientes principales: harina de yuca (como fuente de carbono y sustrato base del medio propuesto), urea (como fuente de nitrógeno) y melaza (como fuente de glucosa que proporciona las condiciones iniciales de fermentación optimas, así mismo como fuente de minerales y vitaminas). Además se empleo suero de leche magro (como fuente de sales y minerales reguladores del equilibrio osmótico) y sales minerales (Sulfato de magnesio heptahidratado, Sulfato disódico e Hidrógeno fosfato de potasio); estos dos últimos se mantuvieron constantes en cada una de las 18 fermentaciones planteadas.

#### **3.3.1 Obtención de materias primas**

##### **- Obtención de harina de yuca**

- *Recepción y pesaje:* Una vez adquirida la materia prima, y verificada su calidad y estado sanitario, se procedió a pesarla, tomando como base de cálculo 10 kg de material fresco.
- *Lavado y desinfección.* La materia prima pesada se lavó por inmersión en agua potable y se cepilló, con el fin de retirarle las impurezas físicas adheridas a la corteza. La desinfección se llevó a cabo también por inmersión, en una solución de hipoclorito de sodio 150 ppm por 10 minutos, finalmente las raíces se enjuagaron con agua potable por aspersion.

- *Pelado.* El pelado se realizó manualmente, despuntando y retirando la corteza en su totalidad.
- *Acondicionado.* Las raíces peladas se rebanaron en lonchas de 2 a 3 mm de ancho.
- *Inmersión en solución de ácido cítrico.* Las lonchas de yuca se sumergieron por 10 minutos en una solución de ácido cítrico al 1.5% con el fin de evitar el pardeamiento enzimático, transcurrido el tiempo se escurrieron y se pasaron por papel absorbente para retirar el exceso de humedad superficial.
- *Secado.* Para secar los trozos de yuca se utilizó el secador de bandejas (COMEK®) ubicado en la Planta Piloto, la materia prima se distribuyó en las 10 bandejas, tomando la primera como control, generando los datos que se emplean en el balance de materia del proceso de secado, la base de cálculo fue 800 g de yuca fresca en lonchas. El secado se realizó por flujo de aire transversal a una temperatura de trabajo de 60°C por 8 horas.
- *Molienda.* Los trozos de yuca secos se molieron en molino de martillos (COMEK®), obteniendo una harina con tamaño de partícula variable, la cual se pasó sobre tamiz de malla número 200 (tamaño de partícula 75  $\mu$ m ó 0,0029 pulg), obteniendo un producto uniforme. Las partículas retenidas en el tamiz, se sometieron nuevamente a molienda para disminuir su tamaño y se tamizaron nuevamente.
- *Empaque.* La harina obtenida se almacenó en envases plásticos estériles y herméticos, protegida de la luz y la humedad, a temperatura ambiente.
- *Control de calidad.* La harina de yuca se sometió a control de calidad microbiológico para determinar si era apta para el proceso, para esto se realizó recuento de microorganismos mesófilos, NMP de coliformes totales y fecales y recuento de hongos (Anexo C).
- **Obtención de suero de leche**
  - *Recepción de la leche.* Se recibieron 40 litros de leche fresca y se le realizaron las pruebas de acidez titulable y densidad (Anexo D).

- *Filtrado.* La leche se pasó por lienzo para retirar las impurezas macroscópicas que contenía.
- *Pasteurización.* Se realizó una pasteurización baja, sometiendo la leche a una temperatura de 75°C por 20 segundos.
- *Enfriamiento:* La leche pasteurizada se enfrió hasta los 40°C.
- *Preparación de solución de cuajo.* Se diluyó en 20 ml de agua a 40°C una pastilla de cuajo (MARSHALL®) con 0,5 g de sal común.
- *Adición del cuajo.* A la leche a 40°C se le adicionó la solución de cuajo, y se mezcló lentamente por 3 minutos, para garantizar su distribución.
- *Cuajado.* Se dejó en reposo la leche por 30 – 40 minutos, a una temperatura entre 35 y 40°C, para permitir la formación del coágulo.
- *Corte y retirado del coagulo.* Transcurridos el tiempo se verifica la firmeza del coágulo y se corta la cuajada en granos de 1 cm de lado, se agita por cinco minutos lentamente y con fuerza por un minuto más, simultáneamente se calienta hasta llegar a 45°C de temperatura. La cuajada se retira empleando lienzo limpio, obteniendo de esta manera el suero fresco.
- *Separación de las proteínas remanentes.* Debido a que el suero fresco contiene proteínas solubles (albúminas y globulinas), que se desnaturalizan a temperaturas superiores a 65°C, es necesario retirarlas para llevar a cabo un óptimo proceso de fermentación. Para ello se calentó el suero hasta temperatura de ebullición y se permitió la floculación de las proteínas, las cuales se retiraron empleando lienzo limpio, obteniendo así un suero desproteinizado.
- *Control de calidad.* El suero obtenido se sometió a control de calidad microbiológico (Anexo C), organoléptico y físico químico (Anexo D) para determinar su aptitud para el proceso.
- **Relación Carbono – Nitrógeno.** Considerando que los microorganismos requieren unas relaciones composicionales mínimas específicas de nutrimentos para cumplir sus funciones vitales y permitirle desarrollarse y multiplicarse, en especial de carbono y nitrógeno, siendo para los microorganismos del género *Bacillus* de 4:1, con un

suplemento adecuado de sales minerales<sup>132</sup>, se estableció ésta como la relación óptima para el diseño del medio de cultivo, relación que se aplica también en la formulación de varios medios de cultivo comerciales como el medio almidón (Oxoid®) y el agar almidón (Probalo®), sobre los cuales se observa crecimiento normal de diversas cepas amilolíticas.

### 3.3.3 Condiciones de cultivo.

**1. Selección del filtro para caldo almidón.** Para la estandarización del método turbidimétrico en evaluación de cinética de crecimiento por espectrofotometría se procedió a seleccionar el filtro para el caldo almidón puro sin inocular y así conocer la longitud de onda en nanómetros del filtro en la cual se debe trabajar con este medio. Para realizarlo se empleo el espectrofotómetro (HASH DR/2010®). El equipo se puso en cero con agua desmineralizada estéril como blanco a 395 nm, en esta misma longitud se midió la densidad óptica para el caldo almidón estéril; luego, nuevamente se puso en cero el equipo con agua desmineralizada estéril a 405 nm y se midió aquí la densidad óptica para el caldo, esta operación se repitió en intervalos de 10 nm hasta los 905 nm. Con los datos obtenidos se selecciono la longitud de onda del filtro a la cual la densidad óptica es óptima. Esta longitud de onda se seleccionó para realizar la cinética de crecimiento del aislado que mejor consumo de almidón presento.

**2. Cultivo del inóculo.** A partir de un stock de trabajo se tomó una asada con asa de argolla de la bacteria amilolítica, se inoculó en 40 ml de caldo almidón 20 g/l a 37°C por 24 horas.

Del caldo turbio se tomaron 10 ml de inóculo y se pasaron a 90 ml del caldo almidón (Oxoid®) estéril, ajustándolo al 10 % v/v<sup>133</sup>. Se incubó en iguales condiciones; al cabo de este tiempo se calculó el número de bacterias por ml, para ello se realizó el conteo en cámara de Neubauer, obteniéndose una densidad celular del inóculo en bacterias/ml.

**3. Cinética de crecimiento.** Una vez determinada la densidad celular se procedió a inocular en una proporción del 10% v/v 250 ml de caldo almidón estéril. El anterior momento representó el tiempo cero (To) de la cinética de crecimiento, se homogenizó el contenido del erlenmeyer con movimientos circulares y se incubó a 37°C con

---

<sup>132</sup> MERCHUK Josse, The Fermentation . Israel : Ben Gurion University. 1999; p. 35-46

<sup>133</sup> CRUEGER, Op. cit., p. 42

agitación constante en agitador orbital (Coller Palmer®). Se realizaron muestreos cada hora, durante 24 horas, y se determinó el perfil cinético mediante turbidimetría, a la longitud de onda establecida en el aparte 1. Graficando el logaritmo natural de la densidad óptica vs el tiempo, se obtuvo el tiempo óptimo de cosecha y se reconoció las características de crecimiento del aislado de trabajo.

Adicionalmente se determinó la tasa de crecimiento que corresponde a la pendiente del gráfico semilogarítmico en fase de crecimiento exponencial. Se define como:

$$\mu = d\ln X/dt$$
$$\mu = d\ln D.O./dt$$

Y el tiempo de duplicación, definido como el intervalo de tiempo entre dos generaciones sucesivas, se expresa:

$$td = \ln 2/\mu^{134}$$

- 4. Fermentación en matraz.** De la matriz del diseño factorial se obtuvo un número total de 18 fermentaciones, las cuales variaban entre sí de acuerdo a la concentración de las materias primas seleccionadas (harina de yuca, melaza y urea) y se mantuvieron constante para las 18 fermentaciones el suero de leche desproteinizado magro y las sales minerales. Los medios se sirvieron en recipientes de vidrio cilíndricos con capacidad de 250 ml, se esterilizaron en autoclave a 121°C y 15 psi por 15 minutos.

Los aislados fueron cultivados en los recipientes con agitación constante en un agitador orbital (Coller Palmer®) con un volumen de 180 ml y se mantuvieron a 37°C. La inoculación se hizo al 10% v/v, a partir del inóculo. Para realizar las pruebas necesarias se tomaron muestras de 10 ml por duplicado en tubos tapa rosca estériles de cada uno de los 18 recipientes en condiciones estériles en cámara de flujo laminar sencilla tipo II (Sterilof®), a intervalos de tiempo de una hora, durante 8 horas.

**3.3.4 Parámetros de fermentación.** Una vez inoculada la bacteria al 10% v/v en los diferentes medios y previa agitación, se tomaron muestras para evaluar la formación de biomasa, el consumo de carbohidratos y la formación de proteínas.

---

<sup>134</sup> CRUEGER, Op. cit., 43

Dichos parámetros se evaluaron al tiempo cero, considerando como tal el tiempo en el cual se virió el inóculo en el sustrato. Las muestras se tomaron cada hora y se realizaron en cámara de flujo laminar y los recipientes se mantuvieron a 37°C con agitación constante en agitador orbital (Coller Palmer®) a 100 rpm.

1. **Determinación de proteínas.** Las proteínas fueron dosificadas de acuerdo al método Lowry (1951) (Anexo E). Donde a temperaturas elevadas (50 °C) las proteínas reaccionan con el reactivo de Folin-Cicalteu produciendo un complejo de color azul intenso debido a la reacción del cobre alcalino con la proteína<sup>135</sup>.

La intensidad del color depende del número de aminoácidos aromáticos y al número de enlaces peptídicos. La absorbancia de la reacción fue leída a una longitud de onda de 750 nm el espectrofotómetro (HASH DR/2010®). Este método permite dosificar entre 30 y 300 mg/l de proteína. Se hizo necesario hacer diluciones a las muestras del cultivo, debido a que los datos obtenidos de la longitud de onda excedían el rango permitido (entre 0 y 1). Para evaluar las concentraciones de proteína, previamente se estandarizó la curva de calibración con seroalbúmina bovina de concentraciones conocidas entre 0 y 300 mg/l.

2. **Determinación de azúcares totales.** Los azúcares totales fueron dosificados de acuerdo al método de Antrona (1956) (Anexo F). Donde se realiza una hidrólisis de polisacáridos en medio ácido al calor. El reactivo de antrona reacciona con las hexosas y aldopentosas para dar un complejo verde-azul, que presenta un máximo de absorbancia a una longitud de onda de 650 nm. Este método permite dosificar azúcares en concentraciones de 0 a 50 mg/l<sup>136</sup>. Teniendo en cuenta la sensibilidad del método fue necesario hacer diluciones considerables a las muestras a dosificar, debido a los datos al igual que en la determinación de proteínas excedían el rango de medición. Se estandarizó la curva de calibración con glucosa de concentraciones conocidas entre 0 y 50 mg/l.
3. **Determinación de Biomasa Por Peso Seco.** Un volumen de 1 ml de suspensión celular se centrifugo a 1000 rpm en centrifuga (Mermet®) durante 20 minutos en tubos ependorf previamente pesados en balanza analítica (OHAUS EXPLORER®), se eliminó el sobrenadante con micropipeta (BRAND®). Las células se secaron en

---

<sup>135</sup> CARMONA, Fabio. Practicas de Microbiología Industrial. Santiago de Cali : Universidad del Valle, Facultad de Ciencias de la Salud – Programa de Bacteriología, 1998, p. 58.

<sup>136</sup> Ibid., p. 59.

estufa (Mermet®) a 50°C durante 24 horas. Pasado este tiempo y antes de pesarse se dejaron en desecador (Pyrex®) por 30 minutos más, transcurrido este tiempo se pesaron los tubos y se determinó el peso seco por litro de células por diferencia del peso final e inicial.<sup>137</sup>

**3.3.5 Evaluación de los parámetros de fermentación.** El sistema de balance de fermentación permite controlar un producto mediante el seguimiento global del sustrato disponible en un rango definido de tiempo. Se reportan los valores de azúcares totales disponibles, proteínas, biomasa y tasa de crecimiento a lo largo del proceso de fermentación del sustrato. La expresión de resultados de los parámetros de fermentación se obtuvieron con base en un análisis de matrices a través de ecuaciones de primer orden, así:

- Biomasa por peso seco: g/l biomasa final – g/l biomasa inicial
- Producción de proteínas: g/l proteínas finales – g/l proteínas iniciales
- Consumo de azúcares: g/l azúcares iniciales – g/l azúcares finales no fermentables

Además el rendimiento biomasa/sustrato<sup>138</sup> ( $Y_{x/s}$  en g/g) gramos de biomasa formada por gramos de sustrato consumido, se determinó así:

- $Y_{x/s} = (X_f - X_i) / (S)$

Donde,

$X_i$  y  $X_f$  : gramos de biomasa inicial y final respectivamente

$S$  : gramos de sustrato inicial

### **3.3.6 Determinación del procedimiento para recuperación de proteína unicelular.**

Una vez definido el medio de cultivo óptimo para la producción de proteína unicelular (SCP) se propondrán las operaciones unitarias mediante un diagrama de flujo que permitan recuperar la SCP del medio, esto con el fin de facilitar el manejo posterior de la misma y el empleo en las raciones que se podrían utilizar en modelos aviares de futuras investigaciones.

---

<sup>137</sup> ENTREVISTA con Pablo Fernández, Candidato a Ph. D. Profesor Departamento de Biología Universidad de Nariño. San Juan de Pasto, Septiembre de 2004.

<sup>138</sup> RODRÍGUEZ, Op. cit., p. 40

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

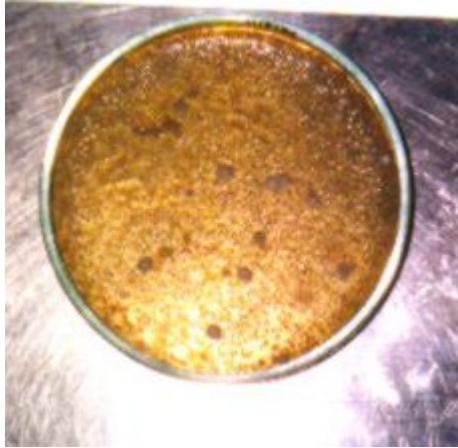
### 4.1 FASE I. AISLAMIENTO DE BACTERIAS AMILOLÍTICAS DE INTESTINO TENUE DE POLLO TIPO BROILER

**4.1.1 Propagación, Aislamiento y Purificación.** De los seis individuos que se diseccionaron se obtuvieron 55 microorganismos viables para el crecimiento sobre agar MRS modificado con azul de anilina y agar nutritivo, siendo el género *Bacillus* el de mayor predominancia, los cuales corresponden en agar MRS modificado con azul de anilina a colonias puntuales, pigmentadas de color azul oscuro, con bordes enteros, de superficie elevada y consistencia cremosa; y en agar nutritivo a colonias puntuales, de color blanco, de superficie elevada y consistencia cremosa. Ver fotografías 3 y 4.

Fotografía 3. Morfología macroscópica para microorganismos viables sobre Agar MRS modificado con azul de anilina

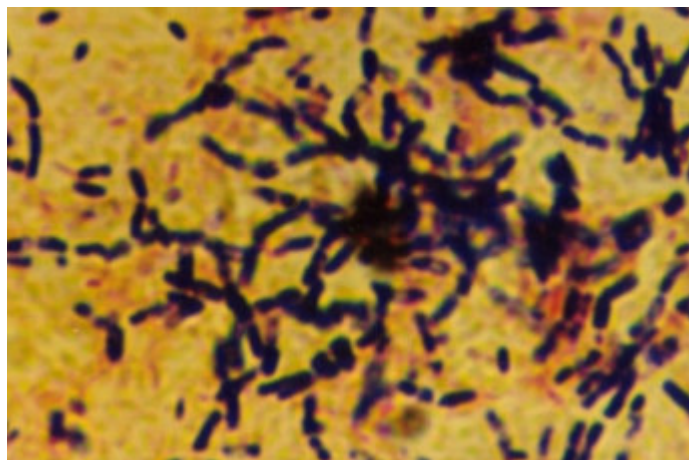


Fotografía 4. Morfología macroscópica para microorganismos viables sobre agar nutritivo

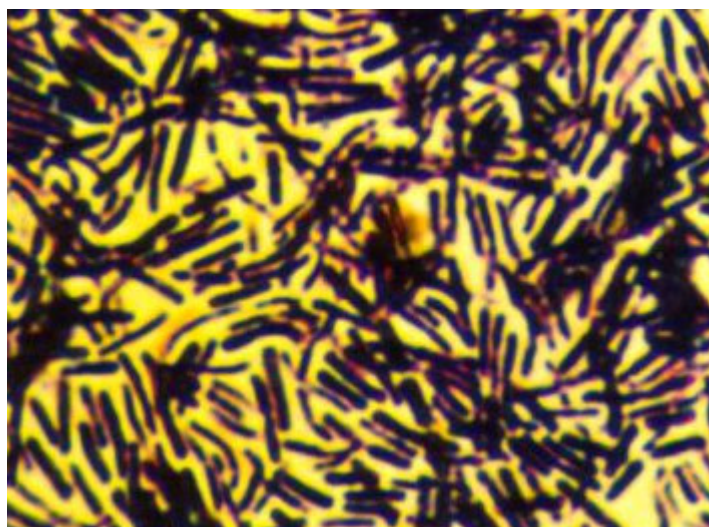


Como criterio de purificación se empleó la tinción de Gram para verificar que los cultivos sean axénicos y descartar las bacterias Gram negativas (Fotografía 5) que se obtuvieron en la fase de aislamiento, que en total sumaron 7 bacterias para los seis individuos, cuya morfología predominante era la del género *Bacillus* (Fotografía 6).

Fotografía 5. Tinción de Gram de cultivo contaminado con bacterias Gram negativas



Fotografía 6. Tinción de Gram para cultivo axénico del género *Bacillus*



Estos aislamientos fueron rotulados empleando la letra P para designar todos los aislados, seguida de un número entre 1 y 6, que corresponde al ave de la cual proviene el aislado y un segundo número correspondiente al microorganismo obtenido de una misma ave e igual morfología microscópica.

De acuerdo a la Tabla 12, la morfología que predominó en los diferentes individuos fue: para P1 bacilos largos libres; P2 bacilos cortos libres y en cadena; P3 bacilos cortos libres y en cadena; P4 levaduras; P5 bacilos largos libres y P6 bacilos largos en cadena. Destacándose que del individuo P3 se obtuvieron el mayor número de aislamientos.

La presencia de microorganismos del género *Bacillus* en el intestino tenue de las aves tipo Broiler, es corroborada por Jayne<sup>139</sup>, quien asegura que los microorganismos predominantes en este hábitat corresponden a bacterias lácticas, *bifidobacterium*, *Bacillus cereus* y *Bacillus s.p.*, quienes son los responsables de los procesos metabólicos y de absorción de nutrientes útiles para el desarrollo de las aves. Así mismo un sinnúmero de microorganismos que han colonizado el intestino tenue son las levadura y algunos microorganismos Gram negativos.

---

<sup>139</sup> JAYNE, Op. cit., p. 82

Tabla 12. Frecuencia de características morfológicas en la propagación y aislamiento para los microorganismos Gram positivos sobre agar MRS modificado con azul de anilina y agar nutritivo

| MICROORGANISMOS          | INDIVIDUOS |    |    |    |    |    | TOTALES |
|--------------------------|------------|----|----|----|----|----|---------|
|                          | P1         | P2 | P3 | P4 | P5 | P6 |         |
| Levaduras                | 2          | 0  | 0  | 4  | 1  | 2  | 9       |
| Bacilos cortos sueltos   | 0          | 2  | 4  | 1  | 1  | 0  | 8       |
| Bacilos cortos en cadena | 1          | 2  | 4  | 2  | 0  | 1  | 10      |
| Bacilos largos sueltos   | 4          | 1  | 0  | 0  | 3  | 1  | 9       |
| Bacilos largos en cadena | 3          | 1  | 2  | 0  | 2  | 3  | 11      |
| Cocos tetradas           | 1          | 0  | 3  | 0  | 0  | 0  | 4       |
| Cocos en racimos         | 0          | 0  | 1  | 2  | 1  | 0  | 4       |
| <b>TOTALES</b>           | 11         | 6  | 14 | 9  | 8  | 7  | 55      |

Fuente: Esta Investigación

Dadas las composiciones de los medios empleados en la propagación (Anexo A), agar MRS modificado con azul de anilina y el agar nutritivo(Oxoid)®, en los cuales los microorganismos disponen de una fuente simple de carbono, como lo es la glucosa, se obtuvo una gran variedad de aislados, los cuales en su mayoría no presentan una actividad amilolítica sobre los medios modificados en su fuente de carbono con almidón. Por lo tanto se tomó como criterio este aspecto para la purificación y su utilización en posteriores fases para el desarrollo del presente proyecto, tal como lo anota Miles<sup>140</sup>, dentro de la microbiota aviar se encuentran una gran cantidad de microorganismos amilolíticos, siendo los de formas bacilares los de mayor capacidad amilolítica presentan.

La Tabla 13 muestra la morfología de los aislados que respondieron de manera positiva a las siembras sobre agares modificados, obteniéndose únicamente 12 aislados con actividad amilolítica, siendo los bacilos largos en cadena los predominantes.

---

<sup>140</sup> MILES, R., and WILSON, A., Microbiota aviar. Reino Unido, 1977; p. 205

Tabla 13. Bacterias que presentaron crecimiento sobre medios que contienen almidón

| MICROORGANISMOS<br>AMILOLÍTICOS | INDIVIDUOS |          |          |          |          |          | TOTALES   |
|---------------------------------|------------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|
|                                 | P1         | P2       | P3       | P4       | P5       | P6       |           |
| Bacilos cortos en cadena        | 0          | 1        | 1        | 0        | 0        | 0        | 2         |
| Bacilos largos sueltos          | 1          | 0        | 0        | 0        | 1        | 0        | 2         |
| Bacilos largos en cadena        | 2          | 1        | 1        | 0        | 2        | 2        | 8         |
| <b>TOTALES</b>                  | <b>3</b>   | <b>2</b> | <b>2</b> | <b>0</b> | <b>3</b> | <b>2</b> | <b>12</b> |

Fuente: Esta Investigación

Comparado con los reportes de Jayne<sup>141</sup>, se concluye que la microbiota del intestino tenue de las aves de corral, son microorganismos mesófilos, que se desarrollan fácil y rápidamente a una temperatura media de 37° C, sin necesidad de tiempos de incubación superiores a 24 horas, ya que es el tiempo suficiente para el desarrollo celular, donde la morfología macroscópicas se hace evidente.

#### 4.1.2 Identificación del Género

- **Observación microscópica.** Luego de someter los microorganismos a la tinción de Gram y Scaeffler Fulton se observaron los aislados compatibles con bacilos Gram positivos, de tres tipos: bacilos largos sueltos, bacilos largos en cadena y bacilos cortos en cadena. En los bacilos largos en cadena se observó la presencia de espora terminal. Se sugirió luego de describir la morfología de las colonias y la morfología celular de bacilos largos en cadenas, Gram positivos, esporulados que son compatibles con el género *Bacillus*, lo cual concuerda en buena medida con lo descrito por Jayne<sup>142</sup>
- **Identificación por pruebas bioquímicas.** Estas pruebas se realizaron a los microorganismos que expresaron capacidad amilolítica (Tabla 13). Las pruebas bioquímicas para confirmar el género se extractaron del Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey's. De acuerdo a las pruebas bioquímicas realizadas, se puede establecer de manera presuntiva que los perfiles de los aislados P2-2 y P3-2 corresponden al perfil de *Bacillus cereus*, los aislados P1-3, P5-1, P5-3, P6-1 y P6-2 corresponden a *Bacillus thuringiensis* y los aislados P1-2 y P3-1 a *Bacillus subtilis*. Mientras que los tres aislados restantes (P1-1, P2-1 Y P5-2) no se ajustan a ningún

<sup>141</sup> JAYNE, Op. cit., p. 79

<sup>142</sup> JAYNE, Op. cit., p. 82

perfil específico de los referidos en el Manual Sistemático de Bergey's, identificándose como *Bacillus s.p.* Los resultados de las pruebas bioquímicas se presentan en la tabla 14.

Tabla 14. Pruebas bioquímicas para los aislados con actividad amilolítica

| AIS. | CAT | V.P. | GLU | ARA | XIL | MAN | CAS | GEL | ALM | D.T. | D.P. | E.Y.L. | IND | R.N. | PERFIL        |
|------|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|--------|-----|------|---------------|
| P1-1 | -   | +    | +   | -   | -   | -   | +   | +   | -   | +    | -    | +      | -   | +    | <i>B. s.p</i> |
| P1-2 | +   | -    | +   | -   | -   | -   | +   | +   | +   | -    | -    | +      | -   | +    | <i>B. s.p</i> |
| P1-3 | +   | +    | +   | -   | -   | -   | +   | +   | +   | +    | -    | +      | -   | +    | <i>B. th</i>  |
| P2-1 | +   | +    | +   | -   | -   | -   | -   | +   | -   | +    | -    | +      | -   | +    | <i>B. s.p</i> |
| P2-2 | +   | +    | +   | -   | -   | -   | +   | +   | +   | +    | -    | +      | -   | +    | <i>B. c</i>   |
| P3-1 | +   | -    | +   | -   | -   | -   | +   | +   | +   | +    | -    | +      | -   | +    | <i>B. s.p</i> |
| P3-2 | +   | +    | +   | -   | -   | -   | +   | +   | +   | +    | -    | +      | -   | +    | <i>B. c.</i>  |
| P5-1 | +   | +    | +   | -   | -   | -   | +   | +   | +   | +    | -    | +      | -   | +    | <i>B. th</i>  |
| P5-2 | +   | +    | +   | -   | -   | -   | -   | +   | -   | +    | -    | +      | -   | +    | <i>B. s.p</i> |
| P5-3 | +   | +    | +   | -   | -   | -   | +   | +   | +   | +    | -    | +      | -   | +    | <i>B. th</i>  |
| P6-1 | +   | +    | +   | -   | -   | -   | +   | +   | +   | +    | -    | +      | -   | +    | <i>B. th</i>  |
| P6-2 | +   | +    | +   | -   | -   | -   | +   | +   | +   | +    | -    | +      | -   | +    | <i>B. th</i>  |

Fuente: Esta Investigación

Convenciones: CAT: Catalasa; V.P.: Test de Voges-Proskauer; GLU: Glucosa; ARA: Arabinosa; XIL: Xilosa; MAN: Manitol; CAS: Hidrólisis de Caseína; GEL: Hidrólisis de Gelatina; ALM: Hidrólisis de Almidón; D.T.: Degradación de Tyrosina; D.P.: Deaminación de Phenylalanina; E.Y.L.: Producción de lecitinasa sobre yema de huevo; IND: Formación de Indol; R.N. Reducción de nitratos a nitritos. *B. c.*: *Bacillus cereus*; *B. th.*: *Bacillus thuringiensis*; *B. s.p.*: *Bacillus s.p.*

Los microorganismos encontrados concuerdan en gran parte con lo reportado por Braude<sup>143</sup>, cuyos ensayos estaban destinados a encontrar bacterias lácticas capaces de servir como fuente de proteína microbiana para la alimentación aviar, a partir de intestino tenue de pollos de engorde.

**4.1.3 Conservación.** Los aislados obtenidos se conservaron de manera óptima mediante los dos métodos: cultivos stock, hasta tres meses y las cepas madre en nitrógeno líquido hasta seis meses, a los cuales periódicamente se les determinaba su viabilidad mediante su activación sobre agar almidón 20 g/l y agar MRS almidón. Dichos aislados se mantuvieron estables en los periodos establecidos, lo que concuerda con lo reportado por Braude<sup>144</sup> y Jayne<sup>145</sup>. Ver fotografías 7 y 8.

<sup>143</sup> BRAUDE, R., *et all.*, Interacción de microorganismos lácticos en la alimentación de aves de engorde. Reino Unido; 1975, p. 55 .

<sup>144</sup> Ibid., p. 47.

<sup>145</sup> JAYNE, Op. cit., p. 61

Fotografía 7. Cultivos stock de los diferentes aislados



Fotografía 8. Cultivos madre de los diferentes aislados



#### **4.2 FASE II. DETERMINACIÓN DEL AISLADO CON MAYOR CAPACIDAD AMIOLÍTICA**

De los doce aislados que mostraron crecimiento sobre los dos medios que contienen almidón en su composición (Agar MRS almidón y Agar Almidón), se encontró que nueve (75%) respondieron positivamente a la prueba de hidrólisis de almidón (Fotografía 9).

Fotografía 9. Capacidad amilolítica de los aislados



La tabla 15 muestra los resultados de las diez repeticiones que se hicieron para cada aislado y su promedio, las cuales se realizaron teniendo en cuenta que a mayor número de repeticiones la reproducibilidad de los resultados es mayor.

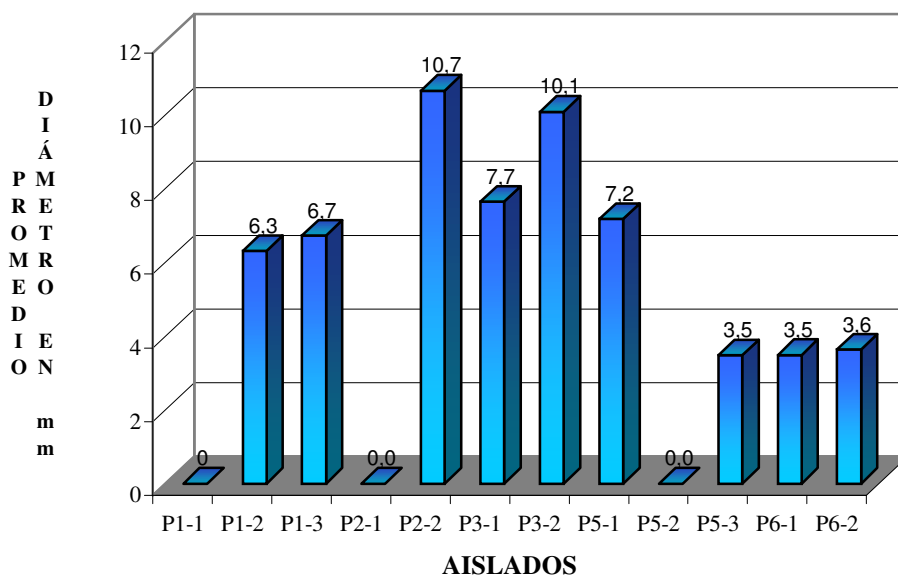
Tabla 15. Capacidad amilolítica de los aislados

| AISLADO     | HALO (mm) |     |     |      |     |      |     |      |      |      | PROMEDIO<br>HALO (mm) |
|-------------|-----------|-----|-----|------|-----|------|-----|------|------|------|-----------------------|
|             | 1         | 2   | 3   | 4    | 5   | 6    | 7   | 8    | 9    | 10   |                       |
| <b>P1-1</b> | -         | -   | -   | -    | -   | -    | -   | -    | -    | -    | -                     |
| <b>P1-2</b> | 6,0       | 6,2 | 8,0 | 6,5  | 5,5 | 5,5  | 8,0 | 6,0  | 5,3  | 5,8  | 6,3                   |
| <b>P1-3</b> | 8,0       | 6,0 | 6,5 | 11,0 | 8,0 | 5,0  | 6,0 | 6,2  | 6,0  | 5,7  | 6,8                   |
| <b>P2-1</b> | -         | -   | -   | -    | -   | -    | -   | -    | -    | -    | -                     |
| <b>P2-2</b> | 7,7       | 8,0 | 6,5 | 9,2  | 8,0 | 15,5 | 8,5 | 21,0 | 6,5  | 13,0 | 10,4                  |
| <b>P3-1</b> | 6,0       | 7,5 | 7,3 | 6,8  | 6,0 | 8,0  | 7,0 | 7,0  | 7,2  | 12,2 | 7,5                   |
| <b>P3-2</b> | 7,0       | 7,5 | 7,0 | 15,0 | 6,2 | 6,0  | 8,7 | 18,5 | 6,0  | 16,2 | 9,8                   |
| <b>P5-1</b> | 6,0       | 6,0 | 6,0 | 7,0  | 6,0 | 10,5 | 5,5 | 6,0  | 11,2 | 6,5  | 7,1                   |
| <b>P5-2</b> | -         | -   | -   | -    | -   | -    | -   | -    | -    | -    | -                     |
| <b>P5-3</b> | -         | 4,0 | 5,2 | 2,0  | 7,0 | 3,0  | 4,0 | 2,0  | 2,0  | 2,5  | 3,2                   |
| <b>P6-1</b> | 2,5       | 2,3 | 4,5 | 10,0 | 2,0 | 3,0  | 2,5 | 2,2  | 2,0  | 3,0  | 3,4                   |
| <b>P6-2</b> | 2,0       | 3,5 | 5,0 | 3,0  | 3,0 | 3,0  | 3,0 | 3,0  | 3,0  | 6,4  | 3,5                   |

Fuente: Esta Investigación

Empleando el análisis de varianza, mediante la prueba de rangos múltiples, TUKEY, que determina la diferencia de medias entre las muestras, con un 95% de confiabilidad y  $p < 0.5$ , se determinó que el aislado con mayor capacidad amilolítica fue el denominado P2-2, cuyo tamaño de halo corresponde a 10.4 mm, el cual mostró diferencias altamente significativas respecto a los otros ocho aislados analizados. En la gráfica 1 se muestran estadísticamente los aislados que presentan mayor capacidad amilolítica.

Gráfica 1. Promedios de halos de hidrólisis de almidón para las bacterias amilolíticas y prueba de Tukey



Con base en este análisis se determinó que el aislado a emplear en la fase de diseño del medio de cultivo sería el denominado P2-2.

### 4.3 FASE III. DISEÑO DEL MEDIO DE CULTIVO

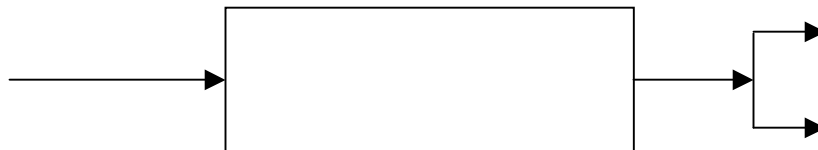
#### 4.3.1 Obtención de Materias Primas

- **Obtención de harina de yuca.** Para la obtención de harina de yuca a partir de raíces frescas se trabajó en las instalaciones de la Planta Piloto de la Universidad de Nariño, con base en las siguientes condiciones:

Tabla 16. Condiciones de operación de la unidad de secado

| VARIABLE                                    | PRESECADO Y SECADO |
|---------------------------------------------|--------------------|
| Humedad relativa ambiente.                  | 64,5 %             |
| Temperatura ambiente                        | 21,5° C            |
| Humedad relativa entrada a cámara de secado | 9,6 %              |
| Temperatura de entrada a la cámara          | 53,4° C            |
| Temperatura de bulbo seco                   | 32,7               |
| Temperatura de bulbo húmedo                 | 19,8               |
| Velocidad de flujo de aire                  | 7,5 m/s            |
| Temperatura de trabajo                      | 60° C              |
| Tipo de flujo                               | Transversal        |
| Fuente: Esta investigación                  |                    |

- **Balance de materia para acondicionamiento de la yuca.** Un primer balance de materia se estableció durante el proceso de acondicionamiento de las raíces de yuca.
- Base de calculo: 10 kg de yuca



$$\text{Yuca Fresca} = \text{Raíces Limpias} + \text{Tierra} + \text{Cáscaras}$$

$$\text{Impurezas} = \text{Tierra} + \text{Cáscaras}$$

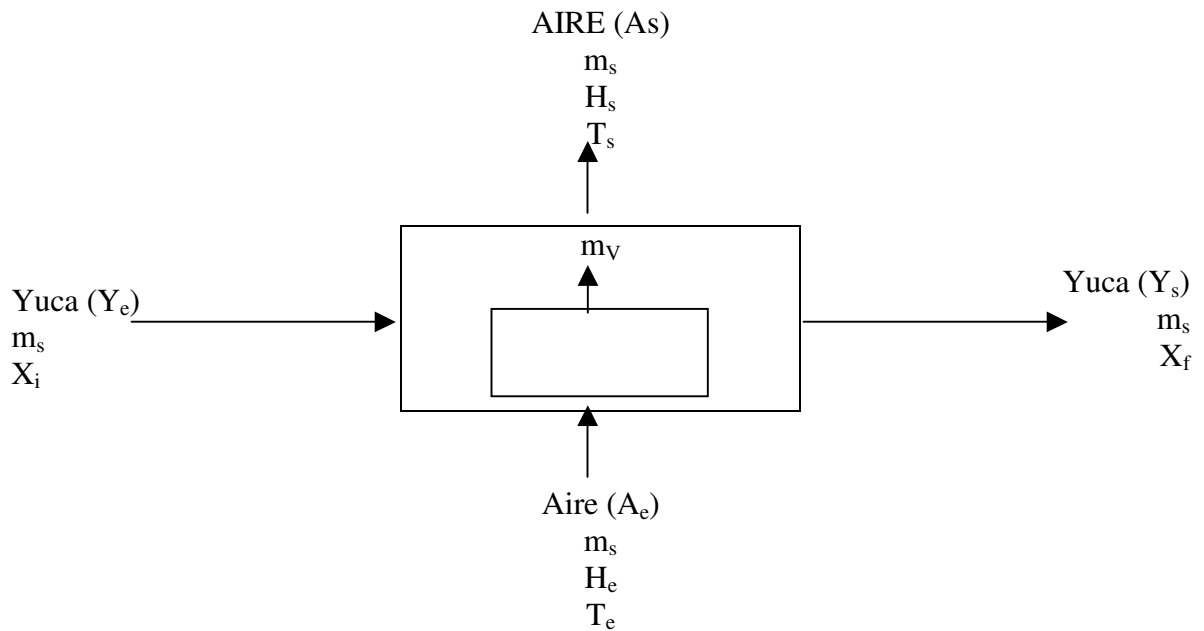
$$10 \text{ Kg Yuca Fresca} = 7.2 \text{ Kg de Raíces Limpias} + \text{Impurezas}$$

$$\text{Impurezas} = 10 \text{ Kg Yuca Fresca} - 7.2 \text{ Kg de Raíces Limpias}$$

$$\text{Impurezas} = 2.8 \text{ Kg}$$

- **Balance de materia del proceso de secado de la yuca**

## Balance de Materia



Donde:

$Y_e, Y_s$ : yuca a la entrada y a la salida respectivamente  
 $A_e, A_s$ : aire a la entrada y a la salida respectivamente  
 $m_s$ : masa de sólido seco  
 $m_v$ : masa de agua evaporada  
 $m_g$ : masa de gas seco  
 $T_e$  y  $T_s$ : temperatura de entrada y de salida  
 $H_e$  y  $H_s$ : humedad a la entrada y a la salida  
 $X_i$  y  $X_f$ : humedad de las lonchas de yuca.

- Balance Global. Hace referencia al sistema de secado en general:

$$F_e + A_e = F_s + A_s$$

- Balance Parcial: O por componente del sistema de secado:

$$Y_e X_i + A_e H_e = Y_s X_f + A_s H_s$$

Para efectos del calculo de balance de materia se asume:

- La masa de aire seco de entrada es igual a la masa de aire seco a la salida.
- La masa de sólido seco de yuca a la entrada es igual a la masa de sólido seco de yuca a la salida.

Por lo tanto el balance se reduce:

$$m_g (H_s - H_e) = m_s (X_i - X_f)$$

$$m_v = m_s (X_i - X_f) \quad (1)$$

$$m_v = m_g (H_s - H_e) \quad (2)$$

Por lo tanto, para el secado de lonchas de yuca a 60°C se tiene:

$$X_i = 42 \%$$

$$X_f = 12,16\%$$

$$H_e = 0,0116 \text{ Kg agua / Kg aire seco}$$

$$m_s = 0,298 \text{ Kg}$$

Reemplazando los valores anteriores en la ecuación (1) se tiene:

$$m_v = m_s (X_i - X_f)$$

$$m_v = 0,298 (0,42 - 0,1216)$$

$$m_v = 0,089 \text{ Kg de agua evaporada.}$$

Para calcular el flujo másico de aire seco ( $m_g$ ), se realiza el siguiente procedimiento:

- Velocidad del aire a la entrada de la cámara de acondicionamiento = 7,5 m/s
- Diámetro de la tubería = 11 cm
- Área de la sección transversal del tubo = 0,0095 m<sup>2</sup>
- Caudal (Q) = 256,3 m<sup>3</sup>/h
- Volumen húmedo (VH) = 1,1871 m<sup>3</sup>/kg

$$Q = m_g * VH \quad (3)$$

Despejando  $m_g$  de la ecuación (3) se tiene:

$$m_g = Q/VH$$

$$m_g = 256.3 \text{ m}^3/\text{h} / 1.1871 \text{ m}^3/\text{kg}$$

$$m_g = 216.07 \text{ Kg/h}$$

Utilizando la ecuación (2), se tiene:

$$m_v = m_g (H_s - H_e)$$

$$H_s = m_v / m_g + H_e$$

$$H_s = 0,089 / 216,07 + 0,0116$$

$$H_s = 0,012 \text{ Kg de agua / Kg de Aire seco}$$

#### **- Curva de Secado para Yuca**

De acuerdo con los datos obtenidos se establecen las curvas de secado como son:

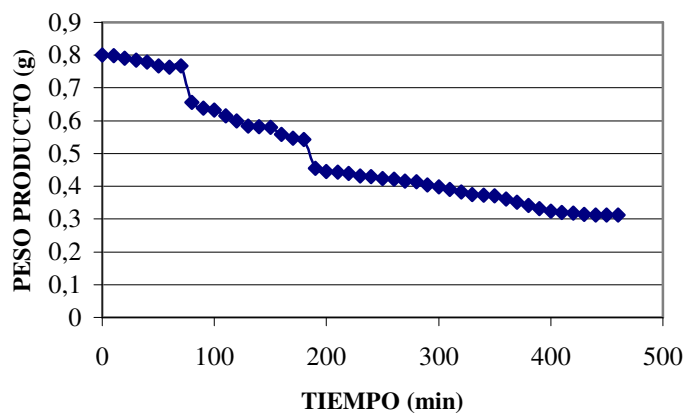
- Peso vs Tiempo
- Humedad de producto vs. Tiempo

Estas curvas determinan cual es el comportamiento de la yuca en la temperatura seleccionada, además se estableció que la clase de flujo fijado como transversal el cual da como resultado un secado mas uniforme y permite realizar el secado a una mayor velocidad.

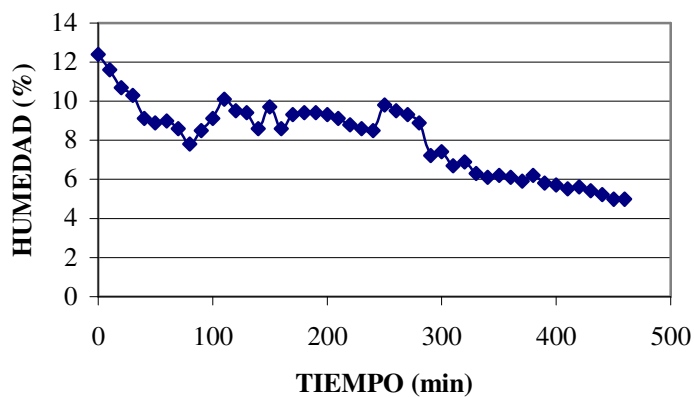
El Anexo G muestra los datos de variación de peso en el tiempo, la humedad relativa, la temperatura de bulbo seco y de bulbo húmedo en la cámara de secado.

La gráfica 2 muestra el comportamiento de la yuca en lonchas a lo largo del proceso de secado, a una temperatura constante de 60°C. Se observa un decrecimiento constante durante todo el proceso hasta su estabilización a los 440 minutos de iniciado. Lo mismo sucede con el comportamiento de la humedad en el tiempo, aunque se presentan picos debido a factores ambientales que afectan el proceso, como se muestra en la gráfica 3.

Gráfica 2. Curva de Secado: Peso del Producto (g) Vs Tiempo (min)



Gráfica 3. Curva de Secado: Humedad (%) Vs Tiempo (min)



- **Control de calidad microbiológico de la harina de yuca**

| ANÁLISIS                    | VALOR            |
|-----------------------------|------------------|
| Mesófilos aerobios          | Negativo         |
| Coliformes totales          | Negativo         |
| Coliformes fecales          | Negativo         |
| Confirmativa <i>E. Coli</i> | Negativa         |
| <i>Salmonella</i>           | Negativo         |
| Hongos                      | $10 \times 10^1$ |
| Fuente: Esta investigación  |                  |

- **Obtención de suero de leche.** Como base de cálculo para la obtención de suero de leche desproteínizado se emplearon 40 litros de leche fresca, el proceso de elaboración está consignado en la Tabla 17.

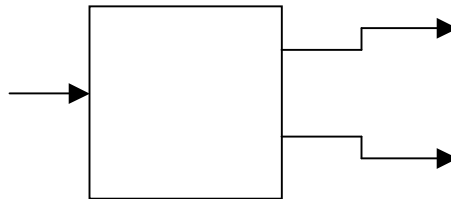
Tabla 17. Flujograma de proceso obtención suero de leche

| PARÁMETRO                          | CANTIDAD            | TEMPERATURA<br>(°C) | ACIDEZ<br>TITULABLE<br>(°D) | PROTEÍNA<br>(%) |
|------------------------------------|---------------------|---------------------|-----------------------------|-----------------|
| Recepción Leche<br>cruda           | 40 L                | 30                  | 14                          | 3,5             |
| Filtrado                           | 40 L                | 30                  | 14                          | 3,5             |
| Pasteurización                     | 40 L                | 75                  | 14                          | 3,5             |
| Enfriamiento                       | 40 L                | 40                  | 14                          | 3,5             |
| Preparación solución<br>cuajo      | 1,2 g               | 40                  |                             |                 |
| Cuajado                            | 40 L                | 40                  | 14                          | 3,5             |
| Corte y retirado<br>cuajada        | 5,6 Kg cuajada      | 45                  | 14                          | 20              |
| Obtención suero<br>entero          | 34,85 L             | 45                  | 14                          | 0,9             |
| Separación proteínas<br>remanentes | 1,72 Kg<br>requesón | 65                  | 14                          | 18,43           |
| Obtención suero<br>desproteinizado | 33,17 L             | 65                  | 14                          | 0,01            |

Fuente: Esta investigación

#### - Balance de Materia Obtención Suero Desproteinizado

##### A. Balance de Materia Elaboración de Cuajada



Balance general:

$$40 \text{ L} = X + Y$$

$$41,2 \text{ Kg} = X + Y$$

$$Y = 41,2 \text{ Kg} - X$$

(Multiplicando por la densidad de la leche)

(1)

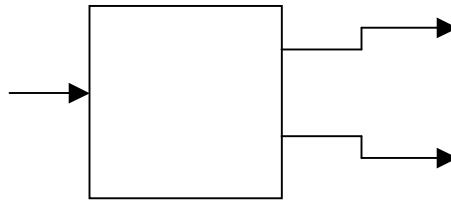
Balance por componentes:

$$41,2 \text{ Kg} * PtL = (X * PtX) + (Y * PtY)$$
$$41,2 \text{ Kg} * 3,5 = 20 * X + 0,9 * Y \quad (2)$$

$$144,2 \text{ Kg} = 20 X + ((41,2 \text{ Kg} * 0,9) - (0,9 * X)) \quad (\text{Reemplazando (1) en (2)})$$
$$X = 5,6 \text{ Kg cuajada}$$

$$Y = 41,2 \text{ Kg} - 5,6 \text{ Kg} \quad (\text{Reemplazando el valor de X en (1)})$$
$$Y = 35,59 \text{ Kg Suero Entero}$$
$$Y = 34,85 \text{ L Suero Entero} \quad (\text{Multiplicando por la densidad del suero} = 1,021)$$

B. Balance de Materia Obtención de Suero Desproteínizado



Balance general:

$$35,59 \text{ Kg} = X + Y$$
$$Y = 35,59 \text{ Kg} - X \quad (1)$$

Balance por componentes:

$$35,59 \text{ Kg} * PtS = (X * PtX) + (Y * PtY)$$
$$35,59 \text{ Kg} * 0,9 = 18,43 * X + 0,01 * Y \quad (2)$$

$$32,03 \text{ Kg} = 18,43 X + ((35,59 \text{ Kg} * 0,01) - (0,01 * X)) \quad (\text{Reemplazando (1) en (2)})$$
$$X = 1,71 \text{ Kg requesón}$$

$$Y = 35,59 \text{ Kg} - 1,71 \text{ Kg} \quad (\text{Reemplazando el valor de X en (1)})$$
$$Y = 33,87 \text{ Kg Suero desproteínizado}$$
$$Y = 33,24 \text{ L Suero desproteínizado} \quad (\text{Multiplicando por la densidad del suero Desproteínizado} = 1,019)$$

- **Control de calidad organoléptico, fisicoquímico y microbiológico de la leche entera cruda**

Tabla 18. Parámetros para control de calidad organoléptico, fisicoquímico y microbiológico de leche entera cruda

| ANÁLISIS                    | VALOR              |
|-----------------------------|--------------------|
| Apariencia y Olor           | Normal             |
| Color                       | Blanco amarillento |
| Sabor                       | Característico     |
| Acidez                      | 14° D              |
| Densidad                    | 1,030 Kg/L         |
| Proteína total              | 3,5%               |
| Aptitud de coagulación      | Normal             |
| Mesófilos aerobios          | 50.000             |
| Coliformes totales          | 3                  |
| Coliformes fecales          | Negativo           |
| Confirmativa <i>E. Coli</i> | Negativa           |
| Fuente: Esta investigación  |                    |

- **Control de calidad organoléptico, fisicoquímico y microbiológico del suero desproteinizado**

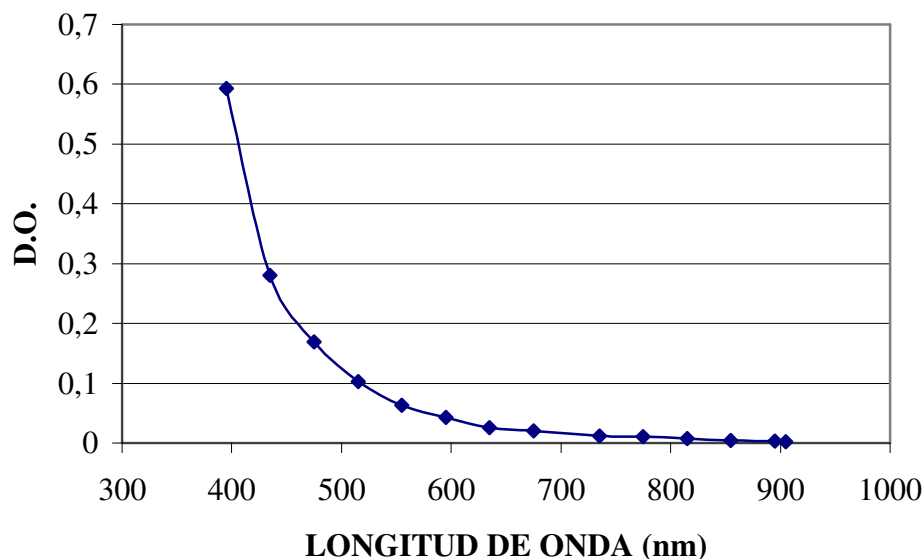
Tabla 19. Parámetros de control de calidad organoléptico, fisicoquímico y microbiológico de suero desproteinizado

| ANÁLISIS                    | VALOR            |
|-----------------------------|------------------|
| Apariencia y Olor           | Normal           |
| Color                       | Amarillo verdoso |
| Sabor                       | Característico   |
| Acidez                      | 14° D            |
| Densidad                    | 1,019 Kg/L       |
| Proteína total              | 0,01%            |
| Mesófilos aerobios          | 1.000            |
| Coliformes totales          | Negativo         |
| Coliformes fecales          | Negativo         |
| Confirmativa <i>E. Coli</i> | Negativa         |
| Fuente: Esta investigación  |                  |

#### 4.3.1. Condiciones de cultivo

- **Selección del filtro para caldo almidón.** Para el Caldo Almidón estéril la menor densidad óptica fue de 0.002, la cual se obtuvo con un filtro de 905 nanómetros de longitud de onda para el espectrofotómetro HASH DR/2010® (Anexo H), como lo muestra la gráfica 4.

Gráfica 4. Curva de Absorbancia Espectral para Caldo Almidón Estéril



- **Cinética de crecimiento.** Una vez seleccionado el microorganismo, se procedió a realizar una fermentación in batch con la cual se determinó su cinética de crecimiento y su comportamiento metabólico sobre un sustrato, que empleó como fuente de carbono almidón soluble (Merck)®.

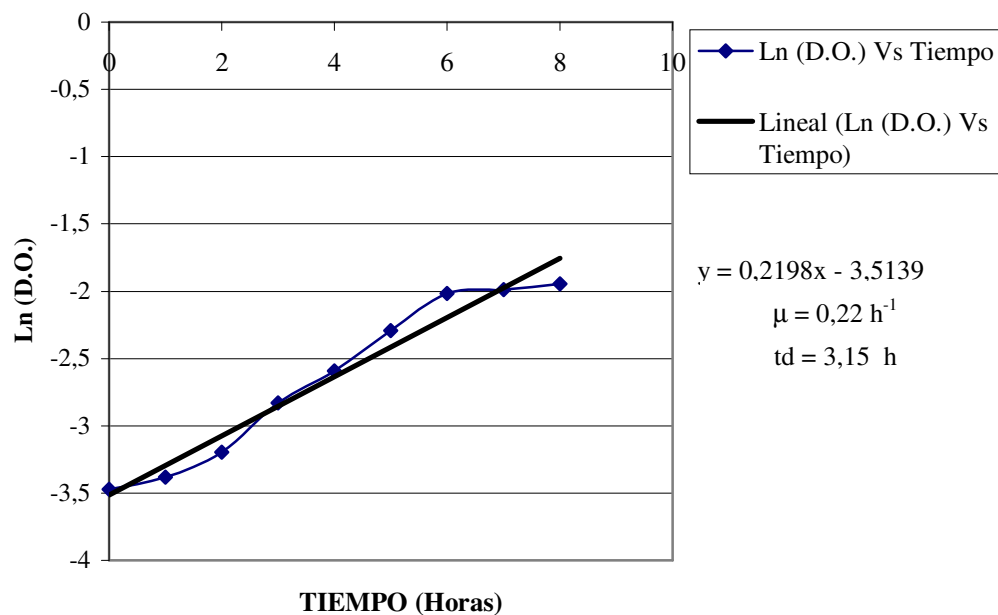
Con base en la gráfica 5 y las ecuaciones referidas en el numeral 2.3.3., se determinó que el tiempo de cosecha para el aislado es de 8 horas a partir del tiempo cero, y se obtuvo que la tasa de crecimiento para este aislado es de  $0,2198 \text{ h}^{-1}$  y su tiempo de duplicación es de 3,15 horas, determinando que *Bacillus cereus* es una bacteria de crecimiento rápido en el medio caldo almidón, como también lo afirma Tortuero<sup>146</sup>; en contraste con otros aislados reportados por Figueroa<sup>147</sup> y Rodríguez<sup>148</sup>.

---

<sup>146</sup> TORTUERO, Op. cit., p. 32

<sup>147</sup> FIGUEROA, Op. cit., p. 47

Gráfica 5. Cinética de crecimiento para *Bacillus cereus* en caldo almidón



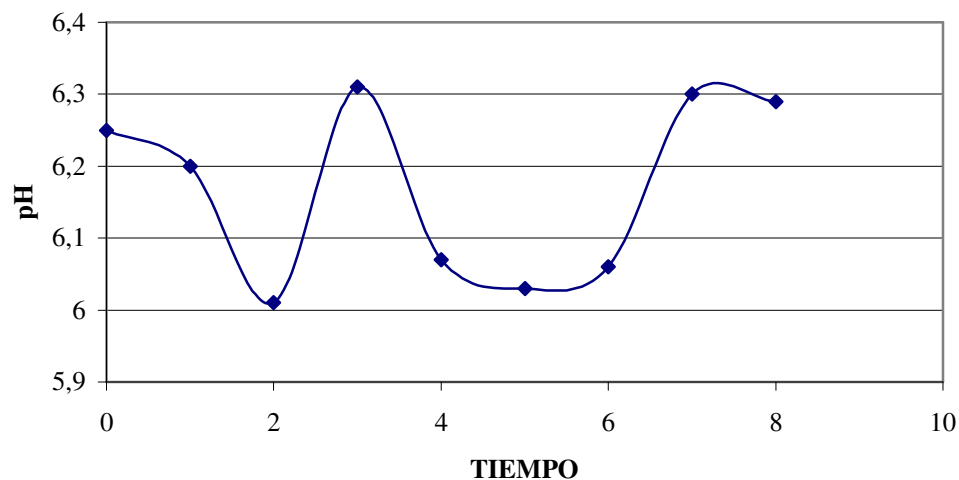
El comportamiento del pH en esta fermentación se mantuvo aproximadamente estable durante toda la cinética, concluyendo que la bacteria sintetiza metabolitos que indican cambios poco significativos de pH, como lo afirma Tortuero<sup>149</sup>, lo que facilita la estandarización del sustrato ya que en las fermentaciones posteriores no se requirió del empleo de un regulador de pH, tal como lo muestra la Gráfica 6. Igualmente esta afirmación la corrobora Miles<sup>150</sup>, quien en sus estudios demuestra que esta bacteria no produce cantidades significativas de ácidos orgánicos.

<sup>148</sup> RODRÍGUEZ, Op. cit., p. 62

<sup>149</sup> TORTUERO, Op. cit., p. 33

<sup>150</sup> MILES, Op. cit., p. 206

Gráfica 6. Evaluación de pH en la cinética de crecimiento de *Bacillus cereus* sobre caldo almidón



#### 4.3.2. Fermentación en matraz.

**Diseño de la Matriz.** Con base en la formulación del caldo almidón, según guía de laboratorio para Elaboración de Medios de Cultivo<sup>151</sup> (relación carbono:nitrógeno de 4:1) se elaboró una matriz con tres variables (Concentración de harina de yuca, melaza y urea) y 18 puntos, con el fin de formular los componentes de los medios utilizados para los ensayos de fermentación Ver tabla 20. Los rangos empleados en el diseño, se determinaron de manera aleatoria y se muestran a continuación:

| FACTOR         | NIVEL |     |     |
|----------------|-------|-----|-----|
|                | -1    | 0   | +1  |
| Harina de Yuca | 1,6   | 3,2 | 4,8 |
| Melaza         | 0,4   | 0,8 | 1,2 |
| Úrea           | 0,5   | 1,0 | 1,5 |

<sup>151</sup> CARMONA, Op. cit., p. 58

Tabla 20. Matriz composicional para la optimización del sustrato por 100 ml

| FERMENTACION | HARINA DE<br>YUCA (g) | MELAZA (g) | UREA (g) |
|--------------|-----------------------|------------|----------|
| 1            | 3,2                   | 0,8        | 1,0      |
| 2            | 3,2                   | 0,8        | 1,0      |
| 3            | 3,2                   | 0,8        | 1,0      |
| 4            | 3,2                   | 0,8        | 1,0      |
| 5            | 1,6                   | 0,4        | 0,5      |
| 6            | 4,8                   | 0,4        | 0,5      |
| 7            | 1,6                   | 1,2        | 0,5      |
| 8            | 4,8                   | 1,2        | 0,5      |
| 9            | 1,6                   | 0,4        | 1,5      |
| 10           | 4,8                   | 0,4        | 1,5      |
| 11           | 1,6                   | 1,2        | 1,5      |
| 12           | 4,8                   | 1,2        | 1,5      |
| 13           | 0,509131              | 0,8        | 1,0      |
| 14           | 5,89087               | 0,8        | 1,0      |
| 15           | 3,2                   | 0,127283   | 1,0      |
| 16           | 3,2                   | 1,47272    | 1,0      |
| 17           | 3,2                   | 0,8        | 0,159104 |
| 18           | 3,2                   | 0,8        | 1,8409   |

Fuente: Esta Investigación

#### 4.3.4. Evaluación de Parámetros de Fermentación

- Elección del sustrato.** La optimización del sustrato se realizó tomando como variable de respuesta la producción de biomasa, ya que la biomasa producida se podría emplear como suplemento en la formulación de piensos en la alimentación animal, en especial de pollos tipo Broiler. El tiempo que tarda el microorganismo en llegar a su fase de latencia oscila entre siete y ocho horas después de iniciada la fermentación, tal como lo afirma Rodríguez<sup>152</sup>, y así lo demostró la cinética de fermentación para cada ensayo por lo tanto la biomasa se estimó a las ocho horas de iniciado el proceso, tiempo estandarizado como óptimo para la cosecha de biomasa. La tabla 21 muestra la producción de biomasa en cada uno de los ensayos.

---

<sup>152</sup> RODRÍGUEZ, Op. cit., p. 46

Tabla 21. Producción de biomasa para *Bacillus cereus* en los 18 fermentos con harina de yuca, melaza y urea en T = 8

**FERMENTACION BIOMASA (g/100 ml)**

|    |       |
|----|-------|
| 1  | 7,227 |
| 2  | 7,127 |
| 3  | 7,334 |
| 4  | 7,753 |
| 5  | 2,398 |
| 6  | 4,696 |
| 7  | 3,577 |
| 8  | 5,009 |
| 9  | 3,785 |
| 10 | 7,235 |
| 11 | 3,916 |
| 12 | 8,361 |
| 13 | 2,332 |
| 14 | 7,638 |
| 15 | 5,618 |
| 16 | 7,695 |
| 17 | 4,009 |
| 18 | 7,516 |

Fuente: Esta Investigación

Teniendo en cuenta los datos obtenidos de producción de biomasa por peso seco para cada una de las 18 fermentaciones en tiempo de cosecha de 8 horas, se realizó el análisis del diseño experimental mediante la metodología de la superficie de respuesta, definiendo como variable de respuesta la producción de biomasa y como variables la composición del medio de cultivo (Harina de yuca, urea y melaza; ya que el suero de leche magro se empleó en igual concentración para las 18 fermentaciones). Los resultados obtenidos son los siguientes:

- Comportamiento de la Variable de Respuesta (Biomasa). La gráfica 7 del diagrama de Pareto muestra la influencia de cada uno de los factores para la variable de respuesta, biomasa. El factor que mayor influencia tiene sobre la producción de biomasa es la Harina de Yuca (H). La línea que atraviesa las barras horizontales muestra las diferencias estadísticamente significativas, con lo cual se demuestra que la interacción harina de yuca – urea (AC), presenta la mayor formación de biomasa bacteriana, mientras que la interacción harina de yuca – melaza (AB) es la menor, y la interacción BC, correspondiente a melaza – urea, presenta una interacción negativa tal como lo muestra la tabla 22, lo que implica

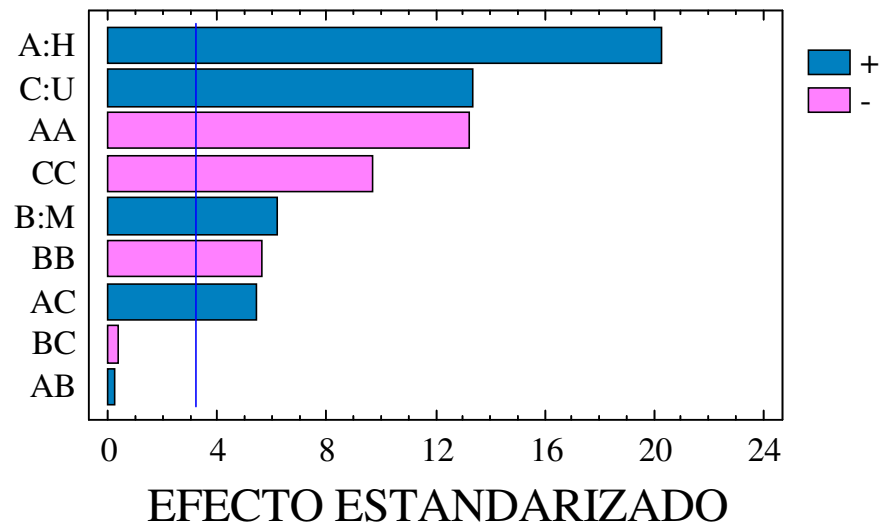
que las condiciones nutricionales para el microorganismos son limitadas y no permiten la producción adecuada de biomasa.

Tabla 22. Resultados Estimados para la Variable de Respuesta (Biomasa)

|          |           |                |
|----------|-----------|----------------|
| Promedio | 7.40063   | $\pm 0,316239$ |
| A : H    | 3,00927   | $\pm 0,342798$ |
| B : M    | 0,91413   | $\pm 0,342798$ |
| C : U    | 1,97924   | $\pm 0,342798$ |
| AA :     | - 2,04099 | $\pm 0,356101$ |
| AB       | 0,03225   | $\pm 0,447888$ |
| AC       | 1,04125   | $\pm 0,447888$ |
| BB       | - 0,85905 | $\pm 0,35619$  |
| BC       | - 0,05875 | $\pm 0,447888$ |
| CC       | - 1,49121 | $\pm 0,35619$  |

Fuente: Esta investigación  
H : Harina de Yuca, M : Melaza, U : Urea

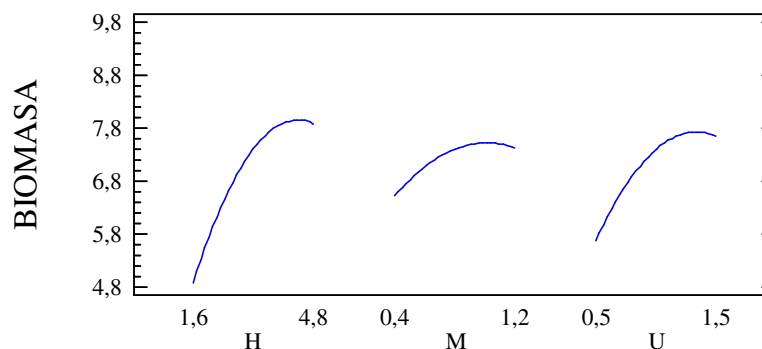
Gráfica 7. Diagrama de Pareto



El efecto de la concentración de la Harina de Yuca (H) sobre la biomasa es cuadrático, es decir que hay un punto máximo, que puede estar cerca de los 4.8 g, por encima del cual

tiene un efecto negativo sobre la producción de biomasa; de igual manera sucede con la concentración de la urea en el medio, cuyo punto máximo se encuentra alrededor de 1.50g; como se muestra en la gráfica 8, de los efectos medios para la variable de respuesta Biomasa.

Gráfica 8. Efectos medios para Biomasa



#### - Análisis de Varianza para la Biomasa

El análisis de ANOVA determina la significancia estadística de cada efecto al comparar los cuadrados medios contra el cálculo del error experimental. En este caso 7 efectos tienen el valor de P por debajo de 0,05. Lo que indica que son significativamente diferentes desde cero a 95% de nivel de confianza. El test de Lack of fit determina si el diseño seleccionado es adecuado para describir los datos obtenidos o si debe emplearse otro modelo. El valor de P para el lack of fit en la tabla 23 es mayor o igual a 0,05; por lo tanto el diseño planteado para este caso es el adecuado para los datos obtenidos, con un 95% de nivel de confianza.

El R – cuadrado indica que el diseño se explica en un 95,39% de variabilidad para la variable de respuesta, biomasa. El R – cuadrado ajustado es mas apropiado para comparar los diseños con diferentes números de variables independientes, con un 90,2085%. El análisis estadístico de Durbin – Watson (Valor – P), evalúa los residuos para determinar si hay correlación significativa basada en el orden en el cual se generan los datos. Puesto que el Valor – P es menor de 0,05 se demuestra que hay correlación entre los datos. El Valor-P y Valor F general para el análisis de varianza para Biomasa se muestra en tabla 24.

Tabla 23. Análisis de Varianza para la Variable de Respuesta (Biomasa)

| COMPONENTE   | SUMA DE CUADRADOS | GRADOS DE LIBERTAD | CUADRADOS MEDIOS | VALOR F | VALOR P |
|--------------|-------------------|--------------------|------------------|---------|---------|
| A : H        | 30,9182           | 1                  | 30,9182          | 408,43  | 0,0003  |
| B : M        | 2,85307           | 1                  | 2,85307          | 37,69   | 0,0087  |
| C : U        | 13,3748           | 1                  | 13,3748          | 176,68  | 0,0009  |
| AA :         | 13,173            | 1                  | 13,173           | 174,01  | 0,0009  |
| AB           | 0,00208012        | 1                  | 0,00208012       | 0,03    | 0,8789  |
| AC           | 2,1684            | 1                  | 2,1684           | 28,64   | 0,0128  |
| BB           | 2,33371           | 1                  | 2,33371          | 30,83   | 0,0115  |
| BC           | 0,00690313        | 1                  | 0,00690313       | 0,091   | 0,7824  |
| CC           | 7,03205           | 1                  | 7,03205          | 92,89   | 0,0024  |
| Lack of fit  | 2,98255           | 5                  | 0,596511         | 7,88    | 0,0599  |
| Error        | 0,227103          | 3                  | 0,0757009        |         |         |
| <b>TOTAL</b> | <b>69,6573</b>    | <b>17</b>          |                  |         |         |

Fuente: Esta Investigación

R – cuadrado: 95,3922%

R – cuadrado (ajustado para los Grados de Libertad): 90,2085%

Error estandar: 0,275138

Error cuadrados medios: 0,356016

Dubin Watson st: 1,02423

Valor – P: 0,0106

Tabla 24. Valor-P y Valor F general para el análisis de varianza para Biomasa.

|                 | SUMA DE CUADRADOS | GRADOS DE LIBERTAD | CUADRADOS MEDIOS | F    | VALOR- P |
|-----------------|-------------------|--------------------|------------------|------|----------|
| <b>Modelo</b>   | 47,1459           | 3                  | 15,7153          | 9,77 | 0,001    |
| <b>Residual</b> | 22,5113           | 14                 | 1,60795          |      |          |
| <b>Total</b>    | 69,6573           | 17                 |                  |      |          |

Fuente: Esta Investigación

- Coeficiente de Regresión para Biomasa. Los valores consignados en la Tabla 25 generan la ecuación que describe el modelo ajustado, siendo esta la ecuación que mejor representa el comportamiento de *Bacillus cereus* en el sustrato harina de yuca, urea, melaza.

Tabla 25. Coeficiente de Regresión para Biomasa

|           |           |
|-----------|-----------|
| Constante | -5,25502  |
| A : H     | 2,8207    |
| B : M     | 5,5042    |
| C : U     | 5,97908   |
| AA :      | -0,398631 |
| AB        | 0,0251953 |
| AC        | 0,650781  |
| BB        | -2,68455  |
| BC        | -0,146875 |
| CC        | -2,98242  |

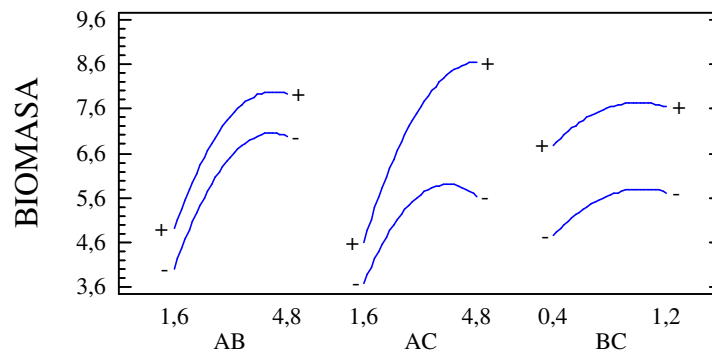
Fuente: Esta Investigación

Modelo ajustado para *Bacillus cereus*:

$$\text{BIO} = -5,25502 + 2,8207 \cdot H + 5,5042 \cdot M + 5,97908 \cdot U - 0,398631 \cdot H^2 + 0,0251953 \cdot H \cdot M + 0,650781 \cdot H \cdot U - 2,68455 \cdot M^2 - 0,146875 \cdot M \cdot U - 2,98242 \cdot U^2$$

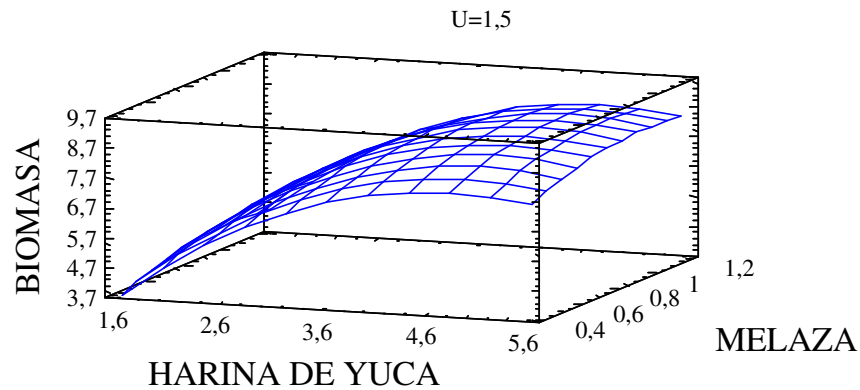
- Interacciones para Biomasa. La Gráfica 9 muestra el comportamiento de la producción de Biomasa en las interacciones que se pueden presentar entre los componentes del medio. Las interacciones Harina de yuca (A) – Melaza (B), Harina de yuca (A) – Urea (C) y Melaza (B) – Urea (C), presentan un comportamiento positivo en el nivel máximo de concentración y un comportamiento negativo en el nivel mínimo de concentración, siendo en el nivel mínimo más significativa la diferencia en las interacciones AC y BC que en la interacción AB.

Gráfica 9. Interacciones para la Producción de Biomasa



- Superficie de Respuesta. La gráfica 10 representa el comportamiento parabólico de la producción de biomasa del aislado seleccionado, teniendo en cuenta los componentes del medio, Harina de yuca, Melaza y Urea; observando que a partir de los niveles óptimos de concentración se presenta descenso en la producción de biomasa.

Gráfica 10. Superficie de Respuesta



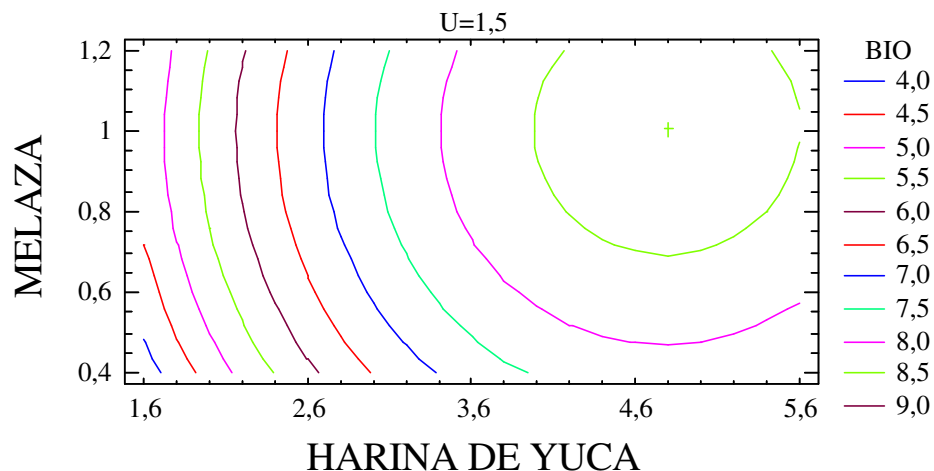
La gráfica 11 muestra la trayectoria de ascenso desde el centro de la región experimental actual en la cual las respuestas estimadas se modifican por el más pequeño cambio en los factores experimentales. En la gráfica se observa que el modelo propuesto genera un área de trabajo adecuado con las materias primas propuestas, ya que se generó un gráfico circular que permite determinar las concentraciones óptimas de materias primas para la obtención de biomasa. En la tabla 26 se presenta una predicción de la producción de biomasa, como resultado de la aplicación de la Ecuación que describe el modelo ajustado, con incrementos de 1,0 g de Harina de yuca.

Tabla 26. Predicción de Biomasa

| HARINA DE YUCA<br>(g/100 ml) | MELAZA<br>(g/100 ml) | UREA<br>(g/100 ml) | BIOMASA ESTIMADA<br>(g/100 ml) |
|------------------------------|----------------------|--------------------|--------------------------------|
| 3.2                          | 0.8                  | 1.0                | 7.40063                        |
| 4.2                          | 0.89384              | 1.2591             | 8.50605                        |
| 5.2                          | 1.19437              | 1.8151             | 8.38392                        |
| 6.2                          | 1.20498              | 1.4178             | 7.78444                        |
| 7.2                          | 1.25081              | 1.2988             | 5.88225                        |
| 8.2                          | 1.28438              | 1.1667             | 2.89914                        |

Fuente: Esta Investigación

Gráfica 11. Contornos estimados para la Superficie de Respuesta



- Optimización del modelo. La tabla 27 muestra la combinación de niveles de materias primas los cuales maximizan la producción de biomasa sobre la región indicada. Según este análisis la producción máxima de biomasa será de 8,76407 g en los niveles óptimos de concentración de las materias primas.

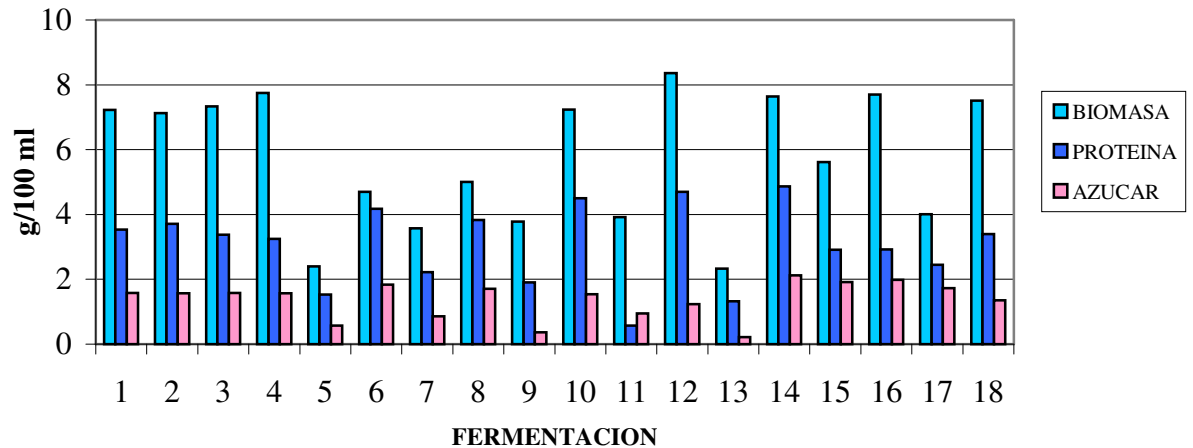
Tabla 27. Optimización del modelo

| FACTOR         | MINIMO<br>(g/100 ml) | MÁXIMO<br>(g/100 ml) | ÓPTIMO<br>(g/100 ml) |
|----------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Harina de Yuca | 0,509131             | 5,89087              | 4,79502              |
| Melaza         | 0,127283             | 1,47272              | 1,00655              |
| Urea           | 0,159104             | 1,8409               | 1,50074              |

Fuente: Esta investigación

- Rendimientos.** Adicionalmente, en la elección del sustrato más adecuado para el desarrollo del aislado se tuvo en cuenta el consumo de azúcares y la producción de proteína en el medio optimizado (Anexo I), con el fin de determinar el comportamiento metabólico del aislado, frente a estos dos parámetros y analizar su eficiencia.

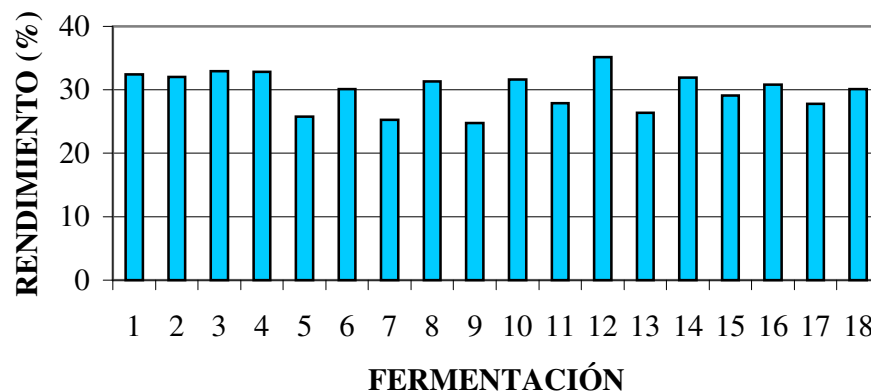
Gráfica 12. Producción de biomasa y proteínas, y consumo de azúcares de *Bacillus cereus* en los 18 fermentos



- **Rendimiento Biomasa/Sustrato.** El rendimiento Biomasa/Sustrato está dado por la diferencia del peso final y el peso inicial de biomasa, entre el peso del sustrato suministrado en cada una de las fermentaciones, equivalente a la suma de los tres componentes (Anexo J).

El mayor rendimiento obtenido para la producción de biomasa con respecto al sustrato inicial se registra en la fermentación 12, como se observa en la gráfica 13, con un 35,2%.

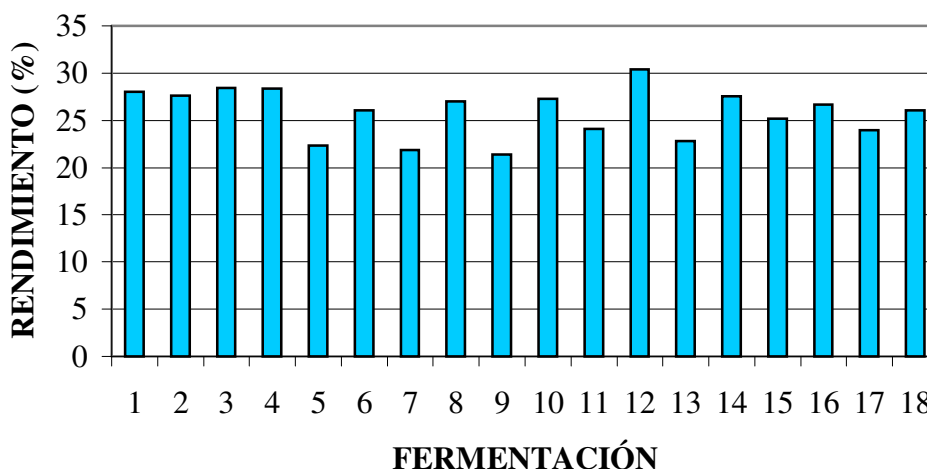
Gráfica 13. Rendimiento Biomasa/Sustrato



- **Rendimiento Proteína/Sustrato.** El rendimiento Proteína/Sustrato está dado por la diferencia del peso final y el peso inicial de proteína, entre el peso del sustrato suministrado en cada una de las fermentaciones, equivalente a la suma de los tres componentes (Anexo K).

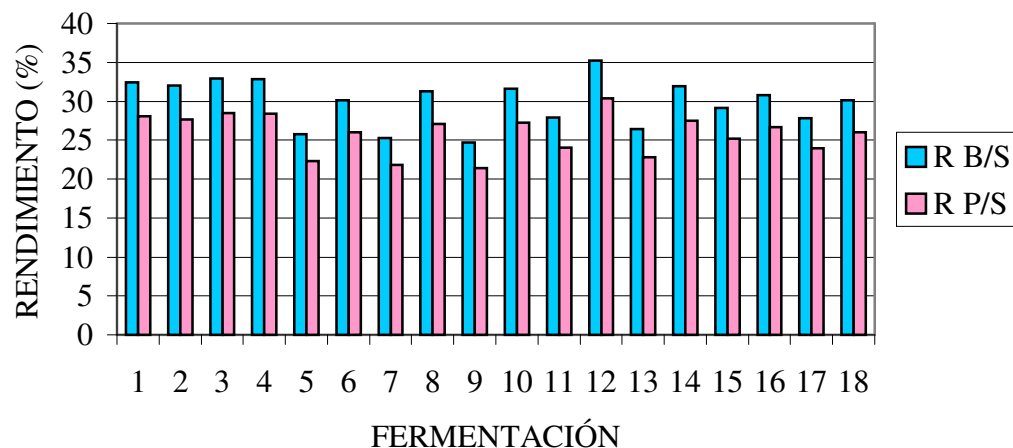
Tal como lo se observa en la gráfica 14, el mejor rendimiento de proteína sobre el sustrato inicial se obtuvo en la fermentación 12, con un 30.39%, corroborando la información obtenida en el análisis del rendimiento de biomasa/sustrato.

Gráfica 14. Rendimiento Proteína/Sustrato



Se observa en la gráfica 15 que los mayores rendimientos para *Bacillus cereus*, tanto para Biomasa/Sustrato como para Proteína/Sustrato se presenta en la Fermentación 12. Esta información corrobora el análisis de optimización del diseño, el cual se ajusta a una composición del medio de 4.79 g de harina de yuca, 1.00 g de melaza y 1.5 g de urea, que es similar a la composición del medio para la fermentación 12 que según la matriz diseñada contiene 4.8 g de harina de yuca, 1.2 g de melaza y 1.5 g de urea.

Gráfica 15. Rendimientos Biomasa/Sustrato y Proteína/Sustrato



**4.3.5 Condiciones Óptimas de Fermentación.** El medio y las condiciones óptimas una vez realizados y procesados los datos obtenidos en los diferentes ensayos se resumen en la tabla 28.

Tabla 28. Condiciones óptimas de Fermentación

| FACTOR                     |    | GRAMOS PARA 100 ml<br>DE MEDIO |
|----------------------------|----|--------------------------------|
| HARINA DE YUCA             |    | 4.795                          |
| MELAZA                     |    | 1.006                          |
| ÚREA                       |    | 1.574                          |
| SUERO FRESCO               |    | 50 ml                          |
| AGUA DESTILADA             |    | 50 ml                          |
| pH                         |    | 6,2                            |
| PORCENTAJE                 | DE | 10                             |
| INÓCULO                    |    |                                |
| TEMPERATURA                |    | 37° C                          |
| Fuente: Esta Investigación |    |                                |

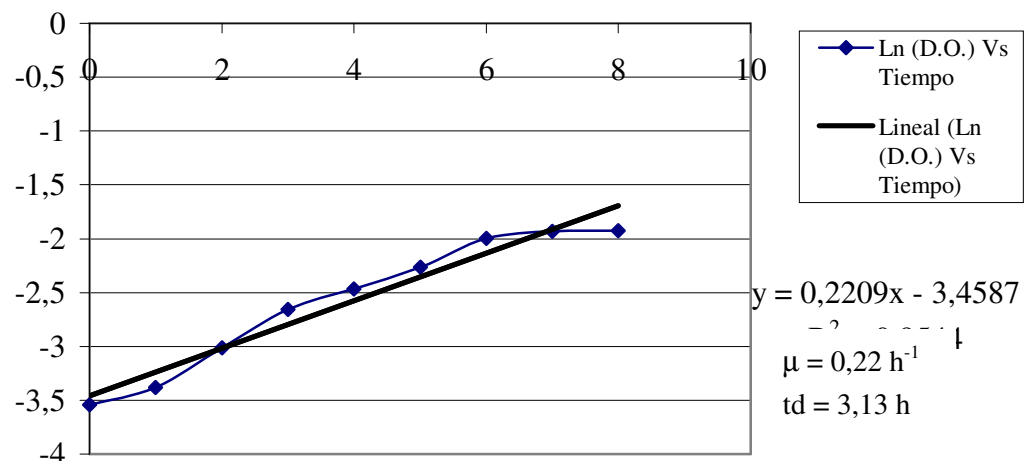
La relaciones de lactosuero magro y sales minerales se mantuvieron constantes para cada una de las 18 fermentaciones así:

|                                      |           |
|--------------------------------------|-----------|
| Citrato de amonio                    | 2 g       |
| Acetato de sodio anhidro             | 5 g       |
| Sulfato de magnesio heptahidratado   | 0.2 g     |
| Sulfato de manganeso monohidratado   | 0.5 g     |
| Fosfato dipotasico                   | 2.6 g     |
| Suero de leche desproteinizado magro | 50 ml     |
| pH final a 20°C                      | 6,2 ± 0.2 |
| Fuente: Esta Investigación           |           |

#### 4.3.6 Evaluación de la Fermentación Óptima

- **Cinética de Crecimiento.** Evaluadas estadísticamente las 18 fermentaciones en cuanto a producción de biomasa y proteína se refiere, se estableció la composición óptima del medio de cultivo en la cual el aislado presenta rendimientos óptimos con respecto a estos parámetros. La cinética de crecimiento se evaluó teniendo como referencia las condiciones óptimas de fermentación resumidas en la tabla 28 y la metodología empleada en el numeral 3.3.3. del presente trabajo. De la gráfica 16 se concluye que *Bacillus cereus*, tiene una tasa de crecimiento de  $0.22\text{h}^{-1}$  y su tiempo de duplicación es de 3,13 horas. El tiempo de cosecha es de ocho horas después de inoculado el medio, al igual que en la cinética de crecimiento para este aislado sobre caldo almidón.

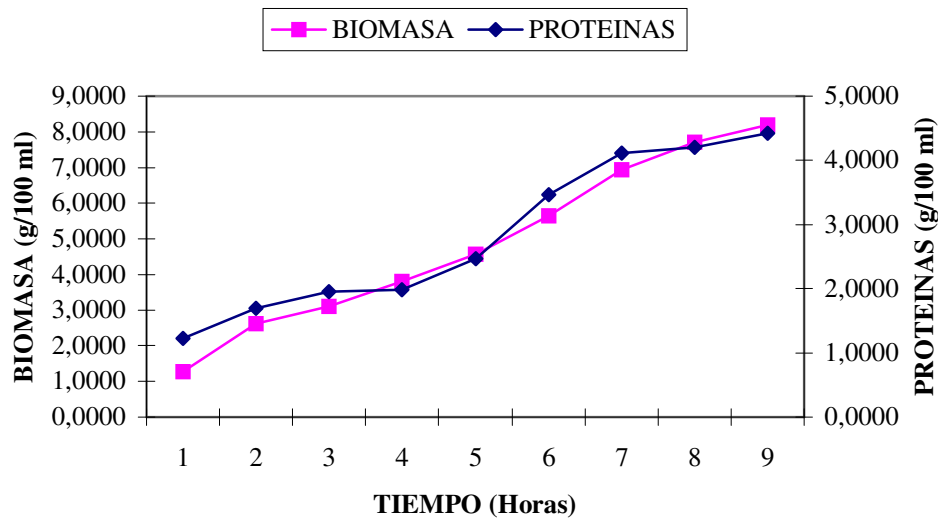
Gráfica 16. Cinética de Crecimiento para *Bacillus cereus* sobre el Medio Optimizado



## - Evaluación de los parámetros de fermentación

- Producción de Biomasa y Proteínas. Al determinar la formación de biomasa y la producción de proteínas para *Bacillus cereus* sobre el medio optimizado se observa un incremento constante de estos dos parámetros a lo largo de la fermentación hasta el tiempo de cosecha (T=8), donde se registra una formación de biomasa de 8,1950 g/100 ml y una producción de proteína de 4,4256 g/100 ml, en concordancia con los resultados obtenidos por Pollman<sup>153</sup>, quien según su investigación produjo 74,6 g/l de biomasa y 40,8 g/l de proteína en un medio constituido por harina de cebada, harina de carne y suplementado con lactosa. Gráfica 17.

Gráfica 17. Producción de Proteínas y Formación de Biomasa de *Bacillus cereus* sobre medio optimizado

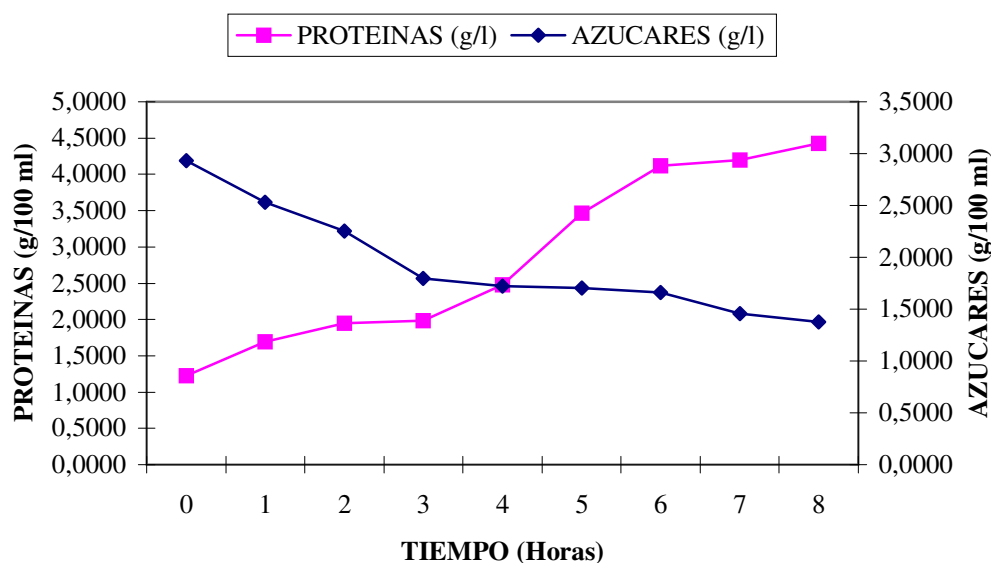


- Producción de Proteínas y Consumo de Carbohidratos. *Bacillus cereus* presentó una adecuada producción de proteínas en el medio optimizado, debido a que se observa un consumo constante de azúcares, proporcional a la producción de proteínas, como se observa en la gráfica 18. En el tiempo de cosecha (T=8) se registra en el medio una concentración de azúcar 1,3795 g/100 ml de medio y

<sup>153</sup> POLLMAN, D. Effect of *Bacillus cereus* in the diets of broiler chicks. Reino Unido : Butterworth's and Company Publisher, 1997

4,4256 g proteína/100 ml de medio. Resultados similares obtuvo Tortuero<sup>154</sup> en sus experiencias con un sustrato compuesto por harina de cebada, harina de soya, harina de carne y sal, empleando *Bacillus cereus* cepa CCT – 953 y virginimiacina para alimentación de pollos tipo Broiler. Gráfica 18.

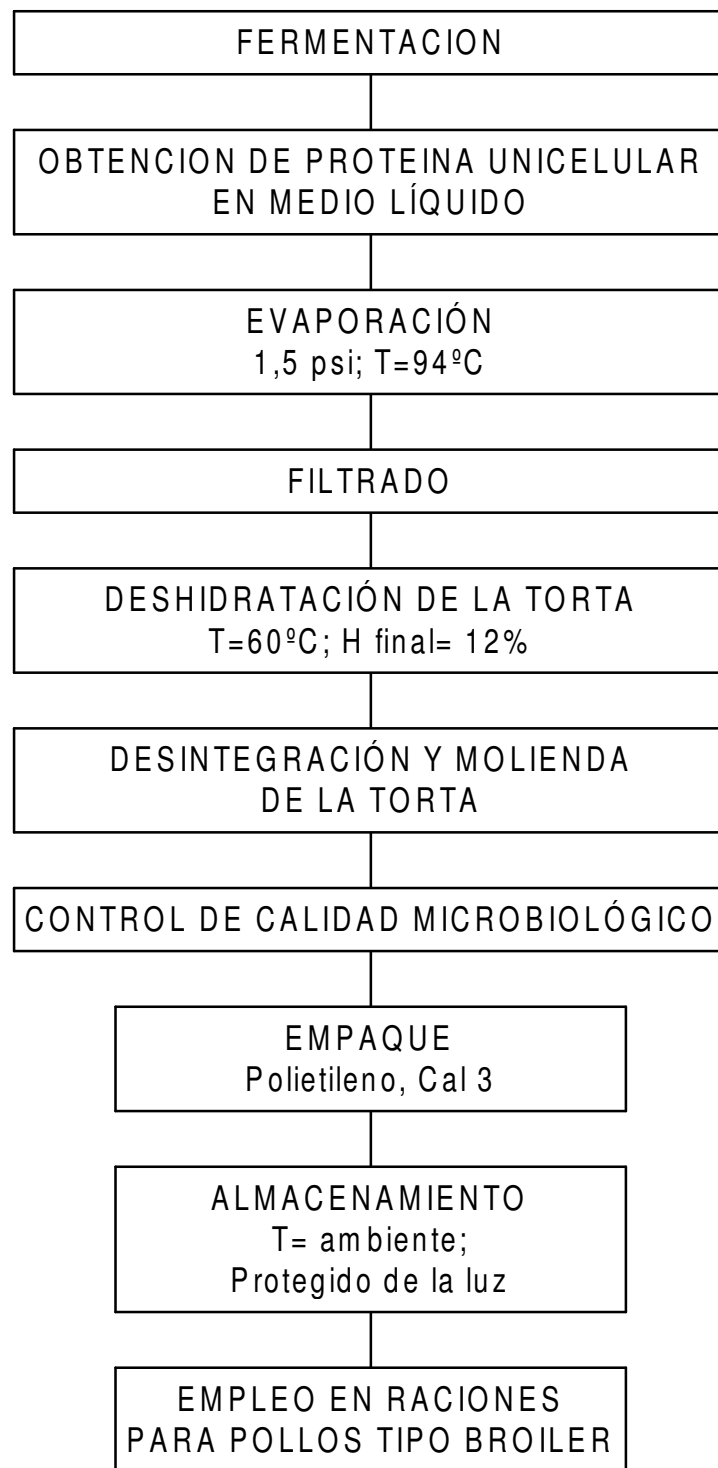
Gráfica 18. Consumo de Azúcares y Producción de Proteínas de *Bacillus cereus* sobre el medio optimizado



**4.3.7 Determinación del procedimiento para recuperación de proteína unicelular.** El proceso de recuperación de la proteína unicelular tiene como objetivo la reducción de la actividad acuosa del medio fermentado, ya que esta propiedad dificulta su manejo y posterior empleo en la elaboración de raciones. El proceso planteado para su recuperación en planta piloto incluye las siguientes operaciones:

<sup>154</sup> TORTUERO, Op. cit., p. 36

Figura 6. Diagrama de Flujo para Proceso de Recuperación de SCP



#### 4. CONCLUSIONES

De los 62 aislados bacterianos de intestino de pollo tipo Broiler solo 12 demostraron capacidad de degradar el almidón, siendo el genero *Bacillus* el mas representativo, de estos 2 se identificaron mediante pruebas bioquímicas como *Bacillus cereus*, 5 como *Bacillus thuringensis*, 2 como *Bacillus subtilis* y 3 como *Bacillus sp*, considerándose estos dos últimos con un perfil inespecífico según el Manual Sistemático de Bergey's.

De los 12 aislados que crecieron sobre agar almidón, solo 9 (75%) fueron positivos para la hidrólisis de almidón. De los anteriores el aislado codificado como P2-2 mostró la mayor capacidad amilolitica según la prueba de significancia de Tukey con un  $P < 0.05$ .

Las condiciones físicas que permiten obtener un producto estable de harina de yuca son: 60 °C, secado en flujo transversal durante 440 minutos..

El aislado P2-2 que se identifico como *Bacillus cereus* presentó los siguientes parámetros de fermentación en la evaluación de su cinética de crecimiento sobre caldo almidón: tasa de crecimiento de 0,22 h<sup>-1</sup>; tiempo de duplicación de 3,15 horas y tiempo de cosecha de 8 horas, y la cinética de crecimiento para el aislado sobre el medio optimizado determino una tasa de crecimiento de 0,22 h<sup>-1</sup>, un tiempo de duplicación de 3,13 horas, y un tiempo de cosecha de 8 horas.

De acuerdo a la evaluación de los parámetros de fermentación con respecto a la variable de respuesta (Biomasa), y utilizando una matriz composicional según el modelo estadístico de la superficie de respuesta se determino las condiciones optimas de concentración de materias primas a 4.79 g de harina de yuca, 1.00 g de melaza y 1.50 g de urea en 50 ml de agua estéril y 50 ml de suero desproteinizado fresco.

La producción de biomasa en el medio optimizado fue de 8,195 g/dl, considerando el rendimiento Biomasa/Sustrato (35.2%), Proteína/Sustrato (30.39%); un consumo de azúcares 1.3795 g/dl y una óptima producción de proteína, 4,4256 g/dl.

Los resultados de la estimación de biomasa acompañados por la producción de proteína y consumo de azúcares, y sus respectivos rendimientos, contribuyen en la determinación de la factibilidad técnica de la implementación de un proceso agroindustrial a nivel piloto, que viabilice la posibilidad de emplear la proteína unicelular obtenida *in vitro* como una materia prima que reemplace las que tradicionalmente se utilizan en la elaboración de alimentos para levante de pollo de engorde. Esto debido a que en el sector avícola, dedicado a la explotación de pollos tipo Broiler se requiere del empleo de insumos eficientes, con un elevado contenido de proteína, que faciliten la ganancia en peso y la formación de músculo en el ave, parámetros que determinan la calidad y precio de venta en el mercado.

## **5. RECOMENDACIONES**

Analizar la producción de metabolitos del aislado, como la verginiamicina; metabolito que participa en la elongación del intestino tenue de pollo tipo Broiler y que además mejora el proceso de absorción de nutrientes al prolongar el tiempo de permanencia del alimento en el intestino e incrementar el número de microorganismos que intervienen en dicho proceso, Tortuero, 1999, y aplicarlo en un modelo aviar, empleando las materias primas propuestas en esta investigación para determinar su eficacia.

Evaluar el potencial enzimático de la bacteria, ya que demostró alta eficiencia en el consumo del sustrato propuesto; y verificar su potencial en procesos agroindustriales dada su viabilidad de crecimiento en amplios rangos de temperatura.

Aplicar en laboratorio el proceso de recuperación de la proteína unicelular (SCP) planteado en los resultados del presente trabajo, para determinar la factibilidad técnica en el empleo en raciones para alimento de pollos tipo Broiler.

Realizar investigaciones, mediante aplicación de modelos aviares estables, que permitan determinar la eficacia y eficiencia en la alimentación de pollos tipo Broiler con proteína unicelular, contra los métodos de alimentación tradicional con concentrado a base de soya y que garanticen una baja mortalidad de los individuos estudiados.

## BIBLIOGRAFIA

AREQUE, C. Uso de la urea en la alimentación de aves de corral. Venezuela : Centro de Investigaciones Agropecuarias del Estado Táchira, 2001

AVILA, GONZALES E. Alimentación de las aves. México : Editorial Trillas, 1992

BALAGOPALAN, C. Y PADMAJA, G. Cassava in food, feed and industry. Estados Unidos : CRC Press INC, 1988

BRAHAM, E. Effect of defaulting on amylose content, viscosity characteristics and organoleptic quality of cassava. En: Food Technology, USA (1992). Vol. 17; p. 761

BRAUDE, R., *et all.*, Interacción de microorganismos lácticos en la alimentación de aves de engorde. Reino Unido; 1975, p. 55.

BREDON, R.M. Subproductos Lácteos. En: Occasional Bulletin Department of veterinary services and animal industry. Roma, No. 124, 1997

BREED, Robert, MURRIA, E.D., SMITH, Nathan. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Estados Unidos : The Williams & Wilkins Company, 1995; p. 1105-1140

BROCK, T. D. M. M.T. Microbiología. España : Editorial Acribia, 1993

BROWN, C., CAMBELL, I., PRIEST, F. Introducción a la biotecnología. España : Acribia S.A., 1993

CALERO, Alvaro. Proteína unicelular. Santiago de Cali : Universidad del Valle, Facultad de Ingeniería, 1992

CARDENAS, O. Sour cassava starch production: a preliminary study. En: Food Science. Vol. 45; p. 1509 – 1512

CARMONA, Fabio. Practicas de Microbiología Industrial. Santiago de Cali : Universidad del Valle, Facultad de Ciencias de la Salud – Programa de Bacteriología, 1998

CEREDA, M. Alguns aspectos da fermentação da fécula de mandioca- Características de polvilho azedo comercial. Brasil : UNESP, 1973

CEREDA, M. Estudos físico-químicos e microbianos da esterlização e da fermentação da fécula de mandioca. Brasil : UNESP, 1981.

COCK, James H. Programa de Sistemas de Producción de Yuca. Colombia : Centro Internacional de Agricultura Tropical. CIAT, 1984; p. 2 –17

CRUEGER, W. Y CRUEGER, A. Biotecnología: Manual de microbiología industrial. España : Acribia, 1993

DUPRAT, F. y GALLANT, D. L'amidon, les polymeres vegetaux. Francia : Mountes, 1990

ESCAMILLA ARCE, Leopoldo. Manual Práctico de avicultura Moderna. México : CECSA, 1979

FERNÁNDEZ, H. Elaboración de piensos. Santiago de Cali : CENICAÑA – CORPOICA, 1997

FIGUEROA, Carlos. Fermentación de almidón de yuca. Santiago de Cali : CIAT – UNIVALLE, 1991

Food and Agricultural Organization, Production year book, p. 135 – 170; Vol.48 (2000)

Food and Agricultural Organization, La alimentación en países subdesarrollados. Roma : FAO, 2001

GIBRAD, C. La yuca en raciones para aves tipo Broiler. Colombia : CIAT, 1995

GIRAUD,E. Contribution a l'étude physiologique et enzymologique d'une nouvelle souche de *Lactobacillus plantarum* amylolytique isolée du manioc fermenté. Francia : ORSTOM, 1993

GUILBOT, A. El almidón, un polímero vegetal. Francia : ORSTOM, 1980

HUDSON, B. Lipids of cassava tubers (*Manihot esculenta crantz*). En: Food Agric. Estados Unidos. Vol 25; p. 1503 – 1512

IKEDIOBI, C. Linamarase activity and detoxification of cassava during fermentation for gari production. En: Agric. Biol. Chem. Vol. 46 (1982); p. 1667-1678

JARAMILLO, E., BENITES H. y SAAVEDRA, J. Influencia del suero lácteo y otros nutrientes en procesos de bioconversión con *Bacillus plantarum* en reactor discontinuo. Medellín : Universidad de Antioquia y Universidad Nacional, 2002

JAYNE, W. Y FULLER, R. Influencia de los microorganismos intestinales en la alimentación de las aves. En: Fisiología y bioquímica de las aves de corral, Academic Press Inc. Reino Unido (1991); p. 72 – 92

JEROCH, HEINZ, Nutrición de Aves. España : Editorial Acribia, 1998

JOKLIK, W. y WILLETT, Hilda. Microbiología Zinsser. Argentina : Médica Panamericana, 1994

KHAJARERN, S. Use of cassava as a food supplement for Broiler Chickens. Colombia : CIAT, 1987

LABBE, S., URDANETA, R. PEROZO, R. Utilización de la suplementación con melaza, urea y yuca en el crecimiento de pollos tipo Broiler. En: agronomía Tropical. Venezuela, Vol. 25, (1997), p. 201 – 205

LASARRETA, M. Estudio de la influencia de factores físicos, químicos y biológicos en la cinética de crecimiento, esporulación y producción de la bacteriocina cereina 7 por *Bacillus cereus* Bc7 en un fermentador. Chile : Universidad Católica, 2003

LINDSEY, J. y SMITH, P. Cuadernillo agropecuarios para extensionistas. Chile : FAO, 1990

LOZADA, E. La investigación sobre el cultivo de la yuca (*Manihot esculenta crantz*) en Colombia. En: Resúmenes analíticos sobre yuca, CIAT (1998)

MADIGAN, M., MARTINKO, J., PARKER, J. Biología de los microorganismos. Reino Unido : PRENTICE HALL, 1999

Manual de Nutrición Aviar, Cartilla divulgativa para avicultores FINCA S.A., Bogota, Colombia 2003

Manual Técnico Avícola, Cartilla divulgativa, ITALCOL S.A., Bogota, Colombia 2003

MARTINEZ, Alfredo. Aislamiento y caracterización de la flora presente en la fermentación de yuca y estudios del proceso. Bogota : Universidad Nacional – ICTA – CIAT, 1981

MERCHUK Josse, The Fermentation . Israel : Ben Gurion University. 1999; p. 35-46

MILES, R., and WILSON, A., Microbiota aviar. Reino Unido 1977; p. 205

MORGAN, J. Y LEWIS, D. Nutrition of pigs and poultry. Reino Unido : Butterworth's and Company Publisher, 1995

MOTHWRY, E. Metodologías para la utilización de suero de ganado vacuno en alimentación de aves de postura. En: Avicultura Tropical, Venezuela, p. 45 – 53, 2003

NAKAMURA, I. Some physico – chemical properties of ferments cassava starch. En: Campinas, Die Starke, Brasil , Vol. 27; (1975); p. 295-297

North, Marck. Manual de producción avícola. México : Editorial el Manual Moderno, 1982

NORTH, Mack y BAL, Donald. Manual de producción Avícola. México : Manual Moderno S.A., 1990

PEREZ, R. y PRESTON, T. Utilización de melaza en raciones para animales. En: Revista cubana de ciencias agrícolas. Cuba, Vol. 4, (1991); p. 111

POLLMAN, D. Effect of *Bacillus cereus* in the diets of broiler chicks. Reino Unido : Butterworth's and Company Publisher, 1997

POLLOS, Cartilla divulgativa de SOLLA LTDA., Buga, Colombia 2002

REED, G., REM, J., STADLER, P. Biotechnology 4, Measuring modeling and control. Alemania : VCH, 1981

RODRÍGUEZ, S. Producción de biomasa láctica a partir de harina de yuca. Santiago de Cali : Universidad del Valle, Departamento de Ingeniería, 1995

SANTOS, E. La harina de yuca y la soya cocida en la alimentación de aves de postura. Colombia : Instituto Colombiano Agropecuario, ICA, 1996; p. 17 – 53

SCRIBAN, R. Manual moderno de biotecnología. México : Panamericana Editores, 1985

SEMINARIO AVÍCOLA REGIONAL. Memorias del Seminario Avícola Regional. San Juan de Pasto : Facultad de Ciencias Pecuarias. Programa de Zootecnia. Universidad de Nariño, 1999.

SOCCOL, T. Y RAIMBAULT, K. Evaluación de harina de yuca en raciones de pollo de engorde. En: Agricultura Tropical, 1993

STAINER, R. y DOUDORFF, M. Microbiología. España : Ediciones Aguilar, 1987

STUMP, Perkins. The biochemistry of plants. U.K. : Jack Press, 1998

TOMMIE, G. Tecnología para la fabricación de alimentos balanceados. Colombia : AFIA, 1994

TORRES, B. Quesos: Cuadernillo técnico para agroempresas. Ecuador : IICA – ECUARURAL, 2002

TORTUERO, F., MARTÍN, L., REJAS, J. The effect of *Bacillus cereus* or virginiamycin in Broilers barley diets on the performance, cecal flora and intestinal tract length. España : Instituto de Alimentación Animal C.S.I.C., 1999

ZAPATA, L. Y PARADA, J. Almidón agrio de yuca: Aspectos tecnológicos y metodológicos. Santa Fe de Bogotá : ICTA – Ministerio de Agricultura, 1988

ZAPATA, L., QUIROS, C. Aspectos tecnológicos en el procesamiento de Yuca (*Manihot esculenta* Crantz). Colombia : CIAT, 1998

ZOBEL, M. Molecules to granules: a development, in starch. En: Chemical and Technology. New York. Vol. 48; (1998); p. 795 - 801

# **ANEXOS**

## **ANEXO A. Medios de Cultivo**

### **AGAR MRS (OXOID)®**

|                                    |         |
|------------------------------------|---------|
| Peptona de caseína                 | 10 g    |
| Extracto de carne                  | 10 g    |
| Extracto de levadura               | 5 g     |
| Glucosa                            | 20 g    |
| Citrato de amonio                  | 2 g     |
| Acetato de sodio anhidro           | 5 g     |
| Sulfato de magnesio heptahidratado | 0.2 g   |
| Sulfato de manganeso monohidratado | 0.5 g   |
| Fosfato dipotásico                 | 2.6 g   |
| Tween 80                           | 1 ml    |
| Agar                               | 15 g    |
| Agua desmineralizada               | 1000 ml |
| pH final a 20°C $6.8 \pm 0.2$      |         |

### **AGAR MRS MODIFICADO CON AZUL DE ANILINA**

En 10 ml de agua destilada disolver 0.2 g de azul de anilina y autoclavar a 121°C, 15 psi por 15 minutos.

Proporción: A 1 lt de agar MRS estéril y aun licuado, agregar 3 ml de solución de azul de anilina, mezclar homogéneamente.

### **AGAR MRS MODIFICADO 20 GRAMOS DE ALMIDON POR LITRO**

|                                    |       |
|------------------------------------|-------|
| Peptona de caseína                 | 10 g  |
| Extracto de carne                  | 10 g  |
| Extracto de levadura               | 5 g   |
| Almidón soluble (Merck)            | 20 g  |
| Citrato de amonio                  | 2 g   |
| Acetato de sodio anhidro           | 5 g   |
| Sulfato de magnesio heptahidratado | 0.2 g |
| Sulfato de manganeso monohidratado | 0.5 g |
| Fosfato dipotasico                 | 2.6 g |

|                      |               |
|----------------------|---------------|
| Tween 80             | 1 ml          |
| Agar                 | 15 g          |
| Agua desmineralizada | 1000 ml       |
| pH final a 20°C      | $6.8 \pm 0.2$ |

#### **AGAR NUTRITIVO (Merck)®**

|                      |               |
|----------------------|---------------|
| Extracto de carne    | 1 g           |
| Peptona de caseína   | 5 g           |
| Extracto de levadura | 2 g           |
| Cloruro de sodio     | 5 g           |
| Agar                 | 15 g          |
| Agua                 | 1000 ml       |
| pH                   | $7.8 \pm 0.2$ |

#### **AGAR ALMIDÓN (Probalo)®**

|                                    |               |
|------------------------------------|---------------|
| Extracto de carne                  | 2.6 g         |
| Peptona de caseína                 | 5 g           |
| Almidón soluble                    | 4 g           |
| Glucosa                            | 3 g           |
| Sulfato de manganeso monohidratado | 0.4           |
| Fosfato dipotasico                 | 2.2           |
| Citrato de amonio                  | 0.4           |
| Agar                               | 15 g          |
| Agua destilada                     | 1000 ml       |
| pH final a 20°C                    | $7.1 \pm 0.2$ |

#### **CALDO TODD HEWITT (BBL)®**

|                      |               |
|----------------------|---------------|
| Extracto de carne    | 10 g          |
| Peptona de caseína   | 20 g          |
| Glucosa              | 2 g           |
| Bicarbonato de sodio | 2 g           |
| Cloruro de sodio     | 2 g           |
| Fosfato de sodio     | 0.4 g         |
| Agua                 | 1000 ml       |
| pH                   | $7.8 \pm 0.2$ |

### **CALDO TIOGLICOLATO (OXOID)®**

|                                 |         |
|---------------------------------|---------|
| L-cistina                       | 0.5 g   |
| Cloruro de sodio                | 2.5 g   |
| Glucosa                         | 5.5     |
| Extracto de levadura            | 5 g     |
| Digerido pancreático de caseína | 15 g    |
| Tioglicolato de sodio           | 0.5 g   |
| Agua                            | 1000 ml |
| pH final a 20°C $7.1 \pm 0.2$   |         |

### **SOLUCIÓN SALINA PEPTONADA AL 0,89%**

|                               |         |
|-------------------------------|---------|
| Peptona de caseína            | 1 g     |
| Cloruro de sodio              | 8.9 g   |
| Agua                          | 1000 ml |
| pH final a 20°C $7.0 \pm 0.2$ |         |

## **ANEXO B. Técnicas de tinción**

### **TECNICA DE COLORACION DE GRAM**

1. Realizar un frotis de la bacteria sobre un cubreobjetos y fijar al calor.
2. Aplicar cristal de violeta y dejar actuar por 1 minuto.
3. Lavar con agua
4. Aplicar lugol, dejar actuar por 1 minuto.
5. Aplicar fuscina básica, dejar actuar por 1 minuto.
6. Lavar con agua y dejar secar a temperatura ambiente.

### **TECNICA DE COLORACION DE ESPORAS (METODO DE SCHAEFFER-FULTON)**

1. Preparar un frotis de la bacteria sobre un cubreobjetos y fijarlo al calor.
2. Cubrir la muestra con una solución de verde malaquita.
3. Calentar durante 5 a 10 minutos la lámina produciendo evaporación, sin dejar secar.
4. Lavar con agua de grifo durante 30 segundos.
5. Cubrir la preparación con safranina durante 15 segundos.
6. Lavar con agua de grifo, escurrir, dejar secar al aire.

### **ANEXO C. Control de calidad microbiológico**

1. Para preparar la dilución  $10^{-1}$ , se pesan 11 g de la harina en balanza analítica o se miden 11 ml de leche y se vierte sobre 99 ml de diluyente (solución salina peptonada estéril al 0,89 %)
2. Agitar vigorosamente el frasco y finalmente se deja reposar por 10 minutos.
3. Transferir 1 ml de la dilución  $10^{-1}$  a un tubo de ensayo que contenga 9 ml de diluyente para obtener la dilución  $10^{-2}$
4. Homogenizar la mezcla uniformemente en vortex, y transferir un ml a otro tubo con 9 ml de diluyente para obtener la dilución  $10^{-3}$
5. Repetir estos pasos hasta obtener el numero de diluciones necesarias.

#### **6. Recuento de microorganismos mesofilos.**

##### ○ Materiales:

- ♣ Cajas petri 100x10 mm estériles
- ♣ Puntas azules estériles
- ♣ Cuenta colonias
- ♣ Plate count Agar licuado

##### ○ Técnica:

- ♣ Transferir por duplicado, alícuotas de 1 ml de cada una de las diluciones en cajas petri estériles, previamente marcadas.
- ♣ Verter 15-20 ml de Plate count Agar licuado.
- ♣ Homogenizar la mezcla (inoculo-agar), con movimientos circulares.
- ♣ Dejar solidificar el agar e incuba a 35°C por 48 horas
- ♣ Realizar lectura de las cajas y sus respectivos cálculos.
- ♣ Reportar los resultados por numero de microorganismos / g ó ml de producto.

## **7. Numero mas probable (N.M.P) de Coliformes Totales.**

### ○ Materiales:

- ♣ Puntas azules estériles
- ♣ Gradillas
- ♣ Caldo lactosado bilis verde brillante al 2 % en tubos de ensayo con tubo durham invertido.
- ♣ Agar eosina azul de metileno
- ♣ Asa de argolla

### ○ Técnica:

#### Prueba Presuntiva.

- ♣ Transferir por triplicado, alícuotas de 1 ml de cada una de las diluciones a los tubos, previamente marcados.
- ♣ Incubar los tubos a 35°C por 24-48 horas.
- ♣ Verificar la producción de gas en los tubos, anotar los positivos y reincubar por 24 horas mas.
- ♣ Pasadas las 48 horas, anotar los tubos que muestren producción de gas.

#### Prueba Confirmativa.

- ♣ De los tubos positivos con turbiedad o producción de gas, tomar una asada y sembrarla por estrías en agar EMB. Incubar a 35 °C por 24 horas.
- ♣ Pasado este tiempo se hace la lectura de las colonias típicas de coliformes.
- ♣ Anotar el numero de tubos confirmados como positivos para organismos coliformes en cada dilución.
- ♣ Realizar lectura de las cajas y sus respectivos cálculos.
- ♣ Reportar los resultados como NMP de coliformes totales / g ó ml de producto.

## **8. Numero mas probable (N.M.P) de Coliformes Fecales.**

### **○ Materiales:**

- ♣ Baño maría a 45 °C
- ♣ Caldo lactosado bilis verde brillante al 2 % en tubos de ensayo con tubo durham invertido.
- ♣ Caldo indol
- ♣ Reactivo de Kovacs
- ♣ Asa de argolla

### **○ Técnica:**

- ♣ De los tubos positivos de NMP de coliformes totales transferir una asada a caldo lactosado bilis verde brillante al 2 % y a caldo indol.
- ♣ Incubar en baño maría a 45 °C por 48 horas.
- ♣ Observar la producción de gas en el caldo lactosado bilis verde brillante al 2 %.
- ♣ Revelar el caldo indol adicionando 0,2 ml de reactivo de Kovacs, agitar suavemente y observar la presencia o no de un anillo rojo cereza en la superficie.
- ♣ Confrontar los resultados con la tabla de NMP
- ♣ Expresar los resultados como NMP de coliformes fecales /g ó ml de producto.

## **9. Recuento de hongos y levaduras**

### **○ Materiales:**

- ♣ Cajas petri 100x10 mm estériles
- ♣ Puntas azules estériles
- ♣ Cuenta colonias
- ♣ Agar PDA licuado o Agar oxitetraciclina glucosa extracto de levadura licuado.

○ **Técnica:**

- ♣ Transferir por duplicado, alícuotas de 1 ml de cada una de las diluciones en cajas petri estériles, previamente marcadas.
- ♣ Verter 15-20 ml de agar PDA licuado o agar oxitetraciclina glucosa extracto de levadura licuado.
- ♣ Homogenizar la mezcla (inoculo-agar), con movimientos circulares.
- ♣ Dejar solidificar el agar e incuba a temperatura ambiente por 5-7 días.
- ♣ Realizar lectura de las cajas y sus respectivos cálculos.
- ♣ Reportar los resultados como numero de hongos y levaduras / g ó ml de producto.

## **ANEXO D. Control de calidad fisicoquímico**

### **- Acidez titulable de la leche:**

#### **Materiales y reactivos:**

- Beaker de 50 ml
- Pipeta de 10 ml
- Buretra
- Fenolftaleína 2%
- NaOH 0,1 N

#### **Técnica:**

- Tomar 9 ml de leche cruda fresca con pipeta estéril, verterla en el beaker.
- Adicionar 3 o 4 gotas de fenolftaleína 2% y agitar
- Titular con NaOH 0,1 N hasta obtener una coloración rosa pálido permanente
- Interpretación: Cada 0,1 ml de NaOH 0,1N gastado equivale a 1° Dornick de acidez.

### **- Densidad de la leche:**

#### **Materiales:**

- Termolactodensímetro
- Probeta de 1 litro
- Paleta de agitación

#### **Técnica:**

- Agitar la leche
- Tomar 600 – 700 ml de leche y depositarlos en la probeta
- Introducir el termolactodensímetro y hacerlo rotar suavemente, esperar hasta que descanse
- Realizar la lectura de densidad y temperatura, y realizar la corrección correspondiente.

## **ANEXO E. Determinación de proteína - método de Lowry**

### **Reactivos:**

- Solución A: Se disuelven 0.5 g de Tartrato de sodio y potasio, 2.5 g de Carbonato de sodio, en 125 ml de Hidróxido de sodio 1N, y 125 ml de agua destilada.
- Solución B: Se disuelven 2 g Tartrato de sodio y potasio 1 g de sulfato de cobre, en 10 ml de Hidróxido de sodio 1N, y 90 ml de agua destilada.
- Solución C: Reactivo de Folin- ciocalteau en agua destilada en relación 1:14
- Solución estándar de seroalbúmina bovina: 15 mg en 50 ml de agua destilada, con una concentración final de 300 mg/ml
- Curva estándar: de 0 a 300 mg/l a partir de una serie de tubos con 0, 1, 2, 3, 4, 5, 8 y 7.5 ml de solución seroalbúmina bovina y se completa a 10 ml con agua destilada.

### **Método:**

- A cada tubo se le adiciona 0.5 ml de NaOH 2N
- Baño de ebullición durante 10 minutos
- Enfriamiento en banco de hielo por 5 minutos
- Se adiciona 0.5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.6 N
- Se agrega 0.9 ml de solución A
- Baño maría a 50°C por 10 minutos
- Enfriar por 3 minutos
- Adicionar 0.1 ml de la solución B
- Llevar por 10 minutos a oscuridad
- Adicionar 3 ml de la solución C
- Baño maría a 50°C por 10 minutos
- Realizar lecturas de la Densidad Óptica (DO) a 750 nm comparando con un blanco
- El blanco corresponde a 1 ml de agua destilada con todas las soluciones del proceso anterior.

## **ANEXO F. Determinación de azúcares totales - método de Antrona**

### **Reactivos**

- Antrona
- Ácido sulfúrico 96%
- Glucosa grado reactivo.
- Curva estándar.
- Solución madre: disolver 1 g de glucosa en 200 ml de agua destilada (5g/L)
- Disoluciones patrones: establecer una curva estándar de 0 a 50 mg/l. Después de efectuar una disolución de 1/10 de la solución madre (50g/L), depositar en una serie de tubos 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.50, 1.75, 2.0, 2.25, 2.50 ml de la solución madre y completar a 2.5 ml con agua destilada.

### **Método**

- La dosificación de los azúcares totales se realiza sobre 2.5 ml de muestra, haciendo diluciones decimales.
- Preparar un blanco con agua desmineralizada (2.5 ml)
- Poner las muestras y el blanco en un banco de hielo.
- Preparar la solución de antrona: 200 mg de antrona por 100 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 96 %, poner la solución en un frasco ámbar
- Adicionar 5 ml de reactivo de antrona a cada tubo con muestra y al blanco
- Agitar con vortex hasta obtener una solución homogénea.
- Llevar a ebullición por 10 minutos.
- Enfriar en banco de hielo.
- Agitar y esperar 15 minutos para eliminar las burbujas de aire
- Leer la absorbancia a 625 nm contra el blanco.

### ANEXO G. Datos proceso de secado

| TIEMPO<br>(min) | W. PRO.<br>(Kg) | HR % | td<br>(°C) | WB<br>(°C) | TIEMPO<br>(min) | W. PRO.<br>(Kg) | HR % | td<br>(°C) | WB<br>(°C) |
|-----------------|-----------------|------|------------|------------|-----------------|-----------------|------|------------|------------|
| 0               | 0,8             | 12,4 | 14,8       | 26,2       | 240             | 0,43            | 8,5  | 14,9       | 28,1       |
| 10              | 0,798           | 11,6 | 14,9       | 26,7       | 250             | 0,424           | 9,8  | 13,9       | 26,8       |
| 20              | 0,79            | 10,7 | 15,4       | 27,3       | 260             | 0,422           | 9,5  | 13,5       | 26,7       |
| 30              | 0,784           | 10,3 | 15,5       | 27,7       | 270             | 0,416           | 9,3  | 13,1       | 26,4       |
| 40              | 0,778           | 9,1  | 13,8       | 27,1       | 280             | 0,414           | 8,9  | 16,1       | 28,9       |
| 50              | 0,768           | 8,9  | 14,8       | 27,9       | 290             | 0,404           | 7,2  | 14,7       | 28,9       |
| 60              | 0,764           | 9    | 13,7       | 27,1       | 300             | 0,398           | 7,4  | 16,1       | 29,7       |
| 70              | 0,768           | 8,6  | 14,3       | 27,5       | 310             | 0,39            | 6,7  | 15,7       | 29,9       |
| 80              | 0,656           | 7,8  | 13,1       | 27,3       | 320             | 0,382           | 6,9  | 16         | 30,1       |
| 90              | 0,638           | 8,5  | 15,2       | 28,4       | 330             | 0,374           | 6,3  | 15,1       | 30         |
| 100             | 0,632           | 9,1  | 16,4       | 28,9       | 340             | 0,372           | 6,1  | 15,8       | 30,6       |
| 110             | 0,614           | 10,1 | 17,7       | 29,2       | 350             | 0,37            | 6,2  | 15,4       | 30         |
| 120             | 0,6             | 9,5  | 16,4       | 28,6       | 360             | 0,362           | 6,1  | 14,3       | 29,4       |
| 130             | 0,584           | 9,4  | 15,7       | 28,3       | 370             | 0,352           | 5,9  | 16,2       | 27,1       |
| 140             | 0,582           | 8,6  | 15,6       | 28,6       | 380             | 0,342           | 6,2  | 15,7       | 28,6       |
| 150             | 0,58            | 9,7  | 16,1       | 23,8       | 390             | 0,332           | 5,8  | 14,7       | 28,4       |
| 160             | 0,558           | 8,6  | 15,8       | 28,8       | 400             | 0,324           | 5,7  | 14,9       | 28,6       |
| 170             | 0,546           | 9,3  | 15,3       | 28,1       | 410             | 0,32            | 5,5  | 13,9       | 27,9       |
| 180             | 0,542           | 9,4  | 16,2       | 28,6       | 420             | 0,318           | 5,6  | 13,5       | 28,5       |
| 190             | 0,454           | 9,4  | 15,9       | 28,4       | 430             | 0,438           | 5,4  | 13,8       | 28,2       |
| 200             | 0,446           | 9,3  | 15,9       | 28,6       | 440             | 0,312           | 5,2  | 14,3       | 28,1       |
| 210             | 0,444           | 9,1  | 16,2       | 28,9       | 450             | 0,312           | 5    | 14,1       | 27,8       |
| 220             | 0,44            | 8,8  | 15,7       | 28,5       | 460             | 0,312           | 5    | 14,2       | 27,5       |
| 230             | 0,432           | 8,6  | 14,7       | 28         |                 |                 |      |            |            |

Fuente: Esta investigación.

W. PRO.: Peso del producto en kilogramos

HR%: Humedad relativa

Td: Temperatura de rocío

Wb: Temperatura de bulbo húmedo

#### ANEXO H. Lectura espectral para caldo almidón estéril

| <b>LONGITUD<br/>DE ONDA</b> | <b>D.O.</b> | <b>LONGITUD<br/>DE ONDA</b> | <b>D.O.</b> | <b>LONGITUD<br/>DE ONDA</b> | <b>D.O.</b> |
|-----------------------------|-------------|-----------------------------|-------------|-----------------------------|-------------|
| 395                         | 0,593       | 535                         | 0,079       | 675                         | 0,020       |
| 405                         | 0,432       | 545                         | 0,072       | 685                         | 0,019       |
| 415                         | 0,374       | 555                         | 0,063       | 695                         | 0,018       |
| 425                         | 0,323       | 565                         | 0,057       | 715                         | 0,014       |
| 435                         | 0,280       | 575                         | 0,052       | 735                         | 0,012       |
| 445                         | 0,243       | 585                         | 0,047       | 755                         | 0,011       |
| 455                         | 0,214       | 595                         | 0,043       | 775                         | 0,011       |
| 465                         | 0,189       | 605                         | 0,039       | 795                         | 0,009       |
| 475                         | 0,169       | 615                         | 0,033       | 815                         | 0,007       |
| 485                         | 0,148       | 625                         | 0,031       | 835                         | 0,006       |
| 495                         | 0,131       | 635                         | 0,026       | 855                         | 0,004       |
| 505                         | 0,116       | 645                         | 0,025       | 875                         | 0,003       |
| 515                         | 0,103       | 655                         | 0,025       | 895                         | 0,003       |
| 525                         | 0,089       | 665                         | 0,022       | 905                         | 0,002       |

Fuente: Esta Investigación

**ANEXO I. Producción de proteínas y consumo de azúcares de *bacillus cereus*  
en sustratos con diferentes concentraciones de  
harina de yuca, melaza y urea en t = 8**

| <b>FERMENTACIÓN</b> | <b>PROTEINAS<br/>(g/100 ml)</b> | <b>AZUCARES<br/>(g/100 ml)</b> |
|---------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| 1                   | 3,5352                          | 1,5788                         |
| 2                   | 3,7156                          | 1,5649                         |
| 3                   | 3,3714                          | 1,5821                         |
| 4                   | 3,2509                          | 1,5735                         |
| 5                   | 1,5348                          | 0,5733                         |
| 6                   | 4,1783                          | 1,8354                         |
| 7                   | 2,2163                          | 0,8557                         |
| 8                   | 3,8260                          | 1,7054                         |
| 9                   | 1,9083                          | 0,3608                         |
| 10                  | 4,4989                          | 1,5430                         |
| 11                  | 0,5753                          | 0,9468                         |
| 12                  | 4,6999                          | 1,2384                         |
| 13                  | 1,3247                          | 0,2193                         |
| 14                  | 4,3701                          | 2,1245                         |
| 15                  | 2,9097                          | 1,9180                         |
| 16                  | 4,5215                          | 1,9832                         |
| 17                  | 2,4469                          | 1,7231                         |
| 18                  | 3,3966                          | 1,3515                         |

Fuente: Esta Investigación

**ANEXO J. Rendimiento biomasa/sustrato en las 18 fermentaciones de harina de  
yuca, urea y melaza con *Bacillus cereus***

| <b>FERMENTACIÓN</b> | <b>BIOMASA<br/>(g/100 ml)</b> | <b>SUSTRATO<br/>(g/100 ml)</b> | <b>RENDIMIENTO</b> |
|---------------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------|
| 1                   | 1,622                         | 5                              | 0,324              |
| 2                   | 1,600                         | 5                              | 0,320              |
| 3                   | 1,647                         | 5                              | 0,329              |
| 4                   | 1,641                         | 5                              | 0,328              |
| 5                   | 0,646                         | 2,5                            | 0,258              |
| 6                   | 1,718                         | 5,7                            | 0,301              |
| 7                   | 0,834                         | 3,3                            | 0,253              |
| 8                   | 2,034                         | 6,5                            | 0,313              |
| 9                   | 0,866                         | 3,5                            | 0,247              |
| 10                  | 2,114                         | 6,7                            | 0,316              |
| 11                  | 1,198                         | 4,3                            | 0,279              |
| 12                  | 2,638                         | 7,5                            | 0,352              |
| 13                  | 0,610                         | 2,309131                       | 0,264              |
| 14                  | 2,450                         | 7,69087                        | 0,319              |
| 15                  | 1,260                         | 4,327283                       | 0,291              |
| 16                  | 1,750                         | 5,67272                        | 0,308              |
| 17                  | 1,155                         | 4,159104                       | 0,278              |
| 18                  | 1,760                         | 5,8409                         | 0,301              |

Fuente: Esta Investigación

**ANEXO K. Rendimiento proteína/sustrato para las 18 fermentaciones con harina de  
yuca, melaza y urea**

| <b>FERMENTACIÓN</b> | <b>PROTEÍNA<br/>(g/100 ml)</b> | <b>SUSTRATO<br/>(g/100 ml)</b> | <b>RENDIMIENTO</b> |
|---------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------|
| 1                   | 1,4014                         | 5                              | 0,2803             |
| 2                   | 1,3824                         | 5                              | 0,2765             |
| 3                   | 1,4230                         | 5                              | 0,2846             |
| 4                   | 1,4178                         | 5                              | 0,2836             |
| 5                   | 0,5577                         | 2,5                            | 0,2231             |
| 6                   | 1,4843                         | 5,7                            | 0,2604             |
| 7                   | 0,7206                         | 3,3                            | 0,2184             |
| 8                   | 1,7574                         | 6,5                            | 0,2704             |
| 9                   | 0,7482                         | 3,5                            | 0,2138             |
| 10                  | 1,8265                         | 6,7                            | 0,2726             |
| 11                  | 1,0351                         | 4,3                            | 0,2407             |
| 12                  | 2,2792                         | 7,5                            | 0,3039             |
| 13                  | 0,5270                         | 2,309131                       | 0,2282             |
| 14                  | 2,1168                         | 7,69087                        | 0,2752             |
| 15                  | 1,0886                         | 4,327283                       | 0,2516             |
| 16                  | 1,5120                         | 5,67272                        | 0,2665             |
| 17                  | 0,9979                         | 4,159104                       | 0,2399             |
| 18                  | 1,5206                         | 5,8409                         | 0,2603             |

Fuente: Esta Investigación