

1-116

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**



**"ESTUDIOS QUIMICOS Y BIOLOGICOS DE LA  
BIOMASA MICROBIANA GENERADA EN UN  
SISTEMA AEROBIO DE TRATAMIENTO DE  
AGUAS RESIDUALES DE LA INDUSTRIA  
ALIMENTARIA"**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**  
**P R E S E N T A :**  
**VALDERRAMA HERRERA SANTA BEATRIZ**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## INDICE

	PAG.
1.0 INTRODUCCION.....	1
1.1. GENERALIDADES SOBRE BIOMASAS MICROBIANAS....	3
1.1.1. Composición química.....	4
1.1.2. Patrón de aminoácidos.....	6
1.1.3. Comparación de los patrones de aminoácidos de <i>Biomassas microbianas</i> - con los estándares de la FAO y -- huevo entero.....	7
1.1.4. Toxicidad de <i>Biomassas microbianas</i> .....	9
1.2. OBTENCION DE BIOMASAS MICROBIANAS.....	12
1.2.1. <i>Biomassas a partir de petróleo y derivados</i> .....	12
1.2.2. <i>Biomassas a partir de carbohidratos</i> ....	13
1.2.3. <i>Biomassas a partir del tratamiento biológico de aguas residuales industriales</i> .....	13
1.3. REACTOR BIOLÓGICO ROTATORIO.....	15
1.3.1. <i>Microorganismos presentes en cada una de las etapas</i> .....	15
1.3.2. <i>Concentración de nitrógeno orgánico en cada una de las etapas del reactor biológico rotatorio</i> .....	17
1.3.3. <i>Acondicionamiento de la biomasa microbiana</i> .....	18

2.0. OBJETIVOS.....	23
3.0 MATERIALES Y METODOS.....	24
3.1. MATERIA PRIMA.....	24
3.2. ANALISIS QUIMICO.....	24
3.3. ANALISIS MICROBIOLOGICO.....	25
3.4. PRUEBAS BIOLÓGICAS.....	26
4.0 RESULTADOS Y DISCUSION.....	33
4.1. DETERMINACIONES QUIMICAS.....	33
4.2. DETERMINACIONES MICROBIOLOGICAS.....	38
4.3. PRUEBAS BIOLÓGICAS.....	39
5.0 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	47
5.1. CONCLUSIONES.....	47
5.2. RECOMENDACIONES.....	48
APENDICE.....	51
BIBLIOGRAFIA.....	74

## 1.0. INTRODUCCION

El crecimiento demográfico en la Ciudad de México se ha incrementado notablemente. Esto ha traído consigo varios problemas, entre otros, un incremento en la demanda de alimentos así como de agua potable, con la consecuente disminución de su disponibilidad.

La industrialización de los alimentos contribuye a disminuir las reservas de agua potable ya que durante su procedimiento se requiere de grandes cantidades de este líquido y a la vez se producen afluentes (del Latín *effluere* = fluir hacia afuera) altamente contaminantes, que son arrojados a los desagües sin ningún tratamiento previo.

El maíz (*Zea mays*), base fundamental de la alimentación de la población mexicana, al ser industrializado, genera grandes cantidades de aguas residuales, tanto en los procesos de obtención de tortilla en forma mecanizada, como en aquellos para elaborar harinas precocidas de maíz nixtamalizado. Para que cualquiera de estos productos puedan ser consumidos por el humano, se realiza un proceso de lixiviación alcalina conocido como nixtamalización (del náhuatl, nexitli = cenizas de cal y tamalli = masa de maíz cocido). Durante este proceso tradicional se genera una proporción de aguas residuales con respecto a maíz de 5:1 y en fábricas, donde se ha tratado de reducir insumos se tienen proporciones de 2.5 - 3.1 de agua residual a maíz crudo procesado. Las aguas residuales generadas tienen un pH muy alto (10-14) y contienen, no solamente material en suspensión (cascanilla de maíz y granos rotos) sino una proporción muy alta de material disuelto proveniente de la hidrólisis alcalina de los componentes del

maíz (Pedroza, 1984). Cuando estas aguas residuales, conocidas como nejayote (del náhuatl, áyoh = caldo o cosa aguada y atl = agua), son eliminados causan severos problemas de contaminación provocando alteraciones en los ecosistemas donde son arrojados, debido a que sus niveles de contaminación, medidos como demanda química y bioquímica de oxígeno son altos. Mediante un tratamiento adecuado de estas aguas de desecho de la materia orgánica puede ser removida y al mismo tiempo se genera biomasa microbiana que, mezclada con los materiales en suspensión del nejayote, es susceptible de ser utilizada como alimento para animales, presentándose como alternativa al uso de cereales, tanto por su contenido de proteína como por su composición de aminoácidos.

## 1.1. GENERALIDADES SOBRE LA BIOMASAS MICROBIANAS

La producción de proteína microbiana que pueden ser bacterias, levaduras y hongos, también llamada proteína unicelular o biomasa microbiana, es obtenida a partir de diversos sustratos. Su clasificación puede verse en el Cuadro 1.

CUADRO 1  
CLASIFICACION DE LOS SUSTRATOS PARA PRODUCCION  
DE PROTEINA UNICELUAR (QUINTERO, 1981)

RECURSOS NO RENOVABLES	RECURSOS RENOVABLES	
PETROLEO y DERIVADOS	DESPERDICIOS INDUSTRIALES y AGRICOLAS	CARBOHIDRATOS
Metano	Suero de leche	Azúcar
Metanol	Licor de sulfito	Melazas
n-Parafinas	Cáscaras y esquifos de productos hortofrutícolas	Almidón
Etolanol	Papel y desperdicios	Celulosa
Gasóleo		Madera

La ventaja de la producción de microorganismos sobre la producción de plantas y animales se debe a que: a) los microorganismos tienen un tiempo de generación corto y un incremento de la masa rápida. Bajo las mejores condiciones, las bacterias y las levaduras tienen un tiempo de generación alrededor de 0.5-2 hrs y 1-3 hrs respectivamente, las algas y los hongos tienen un tiempo de generación entre 2-6 hrs y 4-12 hrs respectivamente; b) los microorganismos pueden ser modificados genéticamente induciendo la mutación por métodos químicos, físicos

o enzimáticos y así, se puede modificar la temperatura de crecimiento o la composición de sus aminoácidos; c) el contenido de proteína es alto; d) la producción de proteína microbiana es independiente de los cambios climáticos, ocupa un área relativamente pequeña y los requerimientos de agua son bajos; e) los problemas son pequeños comparados con los que se deben enfrentar en otros procesos para la producción de alimentos.

### 1.1.1. Composición química.

La composición química de las células microbianas es generalmente afectada por cambios en el medio (concentración del sustrato y condiciones del cultivo).

La cantidad de proteína sintetizada depende de la relación C:N:P, o bien, consideran la relación demanda bioquímica de oxígeno ( $DBO_5$ ), nitrógeno y fósforo del sustrato. Una relación  $DBO_5$ :N:P es adecuada cuando es igual a 20:1:0.2. La deficiencia de alguno de estos elementos de la relación tiene efectos negativos sobre el crecimiento de la población microbiana (Pedroza, 1984). La cuantificación de estos parámetros en el rejayete puede verse en el Cuadro 2.



CUADRO 2  
RELACIONES ENTRE LA DEMANDA QUIMICA Y BIOQUIMICA  
DE OXIGENO CON LOS CONTENIDOS DE NITROGENO Y  
FOSFORO DE LAS DIFERENTES ETAPAS DEL PROCESO DE  
TRATAMIENTO BIOLÓGICO DE AGUAS RESIDUALES DE UNA  
PLANTA DE PROCESAMIENTO DE MAIZ POR NIXTAMALI-  
ZACION (MONTESINOS Y DURAN, 1987)

ETAPA DEL PROCESO	DDO	DBO <sub>5</sub>	N	P	DDO:N:P	DBO <sub>5</sub> :N:P
C <sub>1</sub>	24735.6	6600	118.6	52.5	127.9:1:0.28	35:1:0.28
C <sub>2</sub>	22448.9	5820	169.3	40.8	132.6:1:0.24	34.4:1:0.24
C <sub>3</sub>	20876.9	3480	171.6	45.2	121.7:1:0.26	20.3:1:0.26
C <sub>4</sub>	21134.9	3145	174.9	48.9	120.8:1:0.28	18.0:1:0.28

Cuando el nitrógeno es el factor limitante durante el crecimiento de las células microbianas hay acumulación de grandes cantidades de lípidos. Ejemplo de ello es Rhodospirillum rubrum, Nocardia y Chlorella que creciendo bajo condiciones limitantes de nitrógeno (u oxígeno) producen 60, 70 y 80% de grasa respectivamente (base seca) (Enelo, 1956).

Otro factor que afecta la síntesis de proteína es la velocidad de crecimiento, ya que cuando ésta se incrementa ocurre una mayor producción de RNA lo cual no es conveniente

pues puede producir problemas de toxicidad (descrito en pág. subsecuentes). El Cuadro 3 muestra aproximadamente el contenido de nitrógeno, grasa, cenizas y ácidos nucleicos de células que crecieron bajo condiciones óptimas.

CUADRO 3  
COMPOSICION DE CELULAS MICROBIANAS  
(BASE SECA) (KIHLEBERG, 1972)

%	HONGOS FILAMEN TOSOS	ALGAS	LEVADURAS	BACTERIAS
Nitrógeno	5-8	75-10	7.5-8.5	11.5-12.5
Grasa	2-8	7-20	2-6	1.5-3
Cenizas	9-14	8-10	5-9.5	3-7
Ac. nu- cleicos	-	3-8	8-12	8-16

#### 1.1.2. Patrón de aminoácidos.

La composición de aminoácidos de una proteína determina su valor como fuente de nitrógeno para mantenimiento y crecimiento. El análisis del contenido de aminoácidos da la información sobre el valor del potencial nutritivo de la proteína aunque no siempre refleja correctamente la disponibilidad fisiológica de sus aminoácidos, particularmente si ha sido tratada térmicamente.

En algunos estudios, se ha visto que en bacterias el contenido de metionina es más alto que para levaduras, en oposición con el contenido de lisina. Otro aspecto a considerar en la utilización de proteínas microbianas como fuente nitrogenada, es la digestibilidad, que en el caso de microorganismos se ve afectada negativamente por la presencia de la pared celular (Kihlberg, 1973).

1.1.3. Comparación de los patrones de aminoácidos de biomasa microbianas con los estándares de la FAO y del huevo entero.

Para tener un acercamiento al valor nutritivo de las proteínas es conveniente hacer una comparación de su contenido de aminoácidos con los estándares establecidos. El Cuadro 4 presenta una comparación del contenido de aminoácidos de los estándares de la FAO y del huevo entero, con diferentes biomasa, incluyendo la biomasa obtenida del tratamiento aeróbico del nejayote.

CUADRO 4  
ANÁLISIS COMPARATIVO DE AMINOÁCIDOS EN DIFERENTES  
FUENTES DE PROTEÍNA UNICELULAR (CON DIFERENTES  
SUSTRATOS)

AMINOÁCIDO	PROTEÍNAS DE REFERENCIA		CULTIVO MIXTO DE NEJAYOTE <sup>3</sup>	CELLULOMONAS EN CELLULOSA <sup>4</sup>	HIDROGENOMONAS EN METANO <sup>5</sup>
	ESTANDAR TAO <sup>1</sup>	HUEVO ENTERO <sup>2</sup>			
Isoleucina	4.2	6.7	3.8	3.4	2.77
Leucina	4.8	8.9	6.2	8.4	4.04
Lisina	4.2	6.5	5.7	6.4	2.65
Fenilalanina	2.8	6.8	8.5	3.3	2.20
Metionina	2.2	3.2	2.0	1.5	1.14
Treonina	2.8	5.1	4.5	4.7	2.15
Triptófano	1.4	1.6	1.72	-	0.78
Valina	4.2	7.3	5.0	7.7	3.03
Tirosina	2.8	4.2	3.9	2.5	1.75

\* Pérdidas durante la hidrólisis

1 Senz, 1972

2 Kihlberg, 1972

3 Durán de Bazúa, 1983

4 Dunlap, 1972

5 Foster y Litchfield, 1964

Puede verse que, con respecto al estándar de la FAO la proporción leucina-isoleucina es un poco alta pero tiene una cantidad adecuada de lisina. La metionina, a pesar de las pérdidas durante la hidrólisis para su determinación, alcanza el estándar. Comparando su contenido de treonina y fenilalanina con otros microorganismos como Cellulomonas en celulosa, resulta mejor a estos. Con respecto a Hidrogenomonas en metano, el cultivo mixto resulta mejor.

#### 1.1.4. Toxicidad de biomasa microbianas

Los alimentos no tradicionales ricos en proteínas deben pasar por pruebas de inocuidad realizadas en animales de laboratorio y, si es posible de granja. Esto se debe a que en la materia prima o en algún paso del método de elaboración hasta la obtención del producto final, es posible la presencia de alguna sustancia tóxica. Existen normas internacionales de las Naciones Unidas para que los nuevos materiales proteicos sean aceptados. Estas normas contemplan la realización de pruebas de toxicidad a corto, mediano y largo plazo en animales de laboratorio, con el objeto de observar crecimiento y posibles problemas cancerígenos y teratológicos. El Cuadro 5 resume las pruebas que se deben hacer a alimentos proteicos no tradicionales (Larraaga, 1976).

Por otra parte, la presencia de pequeñas cantidades de D-aminoácidos puede tener implicaciones negativas, debido a la posibilidad de estar incluidos en algunos polipéptidos (por ejemplo en antibióticos polipeptídicos elaborados por ciertos microorganismos) causando problemas sobre el animal que ingiere esta biomasa, por la eliminación de la flora bacteriana intestinal con la consecuente improductividad de algunas vitaminas. Este tipo de aminoácidos también puede estar presente como componente de la pared celular haciendo que la disponibilidad de los aminoácidos disminuya y al no ser absorbidos, generar problemas de flatulencia y diarrea por fermentación en el intestino (Casey, 1963).

La presencia de otros agentes tóxicos como aflatoxinas es importante, aunque el porcentaje de incidencia no es muy común pues no es posible eliminarlas aún mediante tratamientos térmicos de la biomasa (Wilson, 1973).

Tal vez el mayor problema de toxicidad y el más frecuente en biomasa microbiana se deba a la presencia de altas concentraciones de ácidos nucleicos. Una alta concentración es característica de una velocidad de crecimiento rápida de las células. Comparando con un alimento convencional y uno no convencional, los microorganismos tienen entre 8 y 25 g. de ácidos nucleicos por cada 100 g. de proteína, en tanto que el hígado contiene abajo de 4 g. de ácidos nucleicos por cada 100 g. de proteína. El problema se presenta porque los ácidos nucleicos son depolimerizados por el jugo pancreático y convertidos a nucleósidos por las enzimas intestinales durante la absorción. Las bases púricas guanina y adenina son metabolizadas a ácido úrico con lo que se incrementa el contenido en plasma y orina. La alta concentración en plasma (dada su baja solubilidad) hace que se precipite como urato predisponiendo al animal a la enfermedad llamada "gota" (Kihlberg,

1972).

## 1.2. OBTENCION DE BIOMASAS MICROBIANAS

### 1.2.1. Biomosas a partir de petróleo y derivados.

El gasóleo (que se encuentra entre el diesel y los lubricantes) contiene entre 70 y 75% de hidrocarburos parafínicos ( $C_{10}$ - $C_{18}$ ) que pueden ser utilizados por los microorganismos. El cultivo de Micrococcus cerificans en un medio con n-hexadecano ha presentado buen crecimiento, encontrándose un contenido de proteína entre 65 y 75%, su patrón de aminoácidos es bueno comparado con el estándar de la FAO. Al comparar el valor biológico de la proteína celular recuperada que es de 67 con el de caseína que es de 70, se considera adecuado. En este caso el material celular es purificado con éter de petróleo para no afectar la calidad de la proteína (ya que la mayor parte del medio de cultivo son isoparafinas, parafinas cíclicas y compuestos aromáticos que tienen efecto carcinogénico) (Estola, 1969).

El metano, componente del gas (80-90% metano), es usado por bacterias y también por cultivo mixto de hongos (Graphium trichoderma) para la producción de biomasa gracias a la oxidación del gas. Bacterias como Pseudomonas methanica producen alrededor del 71% de proteína (Bewersdorff, 1971). La combustión del gas (producción de dióxido de carbono) es empleado también para el cultivo de bacterias y algas como fuente de carbono (Prescott, 1971).

### 1.2.2. Biomosas a partir de carbohidratos.

Almidones de tapioca, desechos de papas, etc., pueden ser fermentados en condiciones adecuadas continuas en procesos simbióticos con Endomicopsis fibulger que hidroliza el almidón a azúcares, los cuales son utilizados para la producción de biomasa por Candida utilis. El almidón puede ser fermentado directamente por hongos amilolíticos (Spicer, 1971).

Los recursos celulósicos por su carácter renovable y su relativa abundancia, representan una fuente importante de sustrato para la producción de biomasa microbiana. Para su utilización se pueden seguir dos caminos: a) mediante hidrólisis de la celulosa (sea mediante un proceso ácido o enzimático) para producir azúcar y su posterior fermentación y, b) por fermentación directa de los desperdicios celulósicos. En este último se emplea un cultivo mixto de bacterias celulolíticas (Celullomonas sp) y levaduras, obteniéndose una biomasa de alta calidad y no tóxica (Quintero, 1981). La utilización de cualquiera de estas rutas dependerá de los recursos con los que se cuente.

Uno de los subproductos de la elaboración de azúcar son las melazas (mieles incristalizables con no más de 3% de sacarosa). Su utilización en la producción de biomasa se está efectuando con Candida utilis. Esta proteína se utiliza como complemento alimenticio de animales (Quintero, 1981).

### 1.2.3. Biomosas a partir del tratamiento biológico de aguas residuales industriales.

En el tratamiento de aguas residuales de la industria del papel se encontró en un estudio realizado por Crawford que usa Thermomonospora fusca (actinomiceto termófilo celulolítico).



lice), microorganismo que tiene una buena actividad sobre la celulosa suspendida. La fermentación desarrollada degrada sustancialmente la celulosa y además se obtiene 30% de proteína microbiana. Esta proteína muestra por estudios preliminares con pollos pequeños y con base en su contenido de aminoácidos, que tiene una buena calidad nutricia y además no presenta sustancias tóxicas (Crawford, 1973).

Las aguas residuales de la industrialización del maíz (nejayote), contienen grandes cantidades de materia orgánica disuelta y en suspensión. De acuerdo con estudios realizados por Pedraza y Durán (1985), su composición se muestra en el Cuadro 6. Debido al alto poder contaminante de estos afluentes se han desarrollado investigaciones relacionadas con su tratamiento para disminuir el efecto contaminante de las mismas y una vez tratadas, reutilizarlas, así como utilizar los subproductos obtenidos (biomasa microbiana).

CUADRO 6  
COMPOSICION PROMEDIO DEL NEJAYOTE

PARAMETRO	CONCENTRACION
Azúcares reductores totales (mg/l)	2.58
Nitrógeno Kjeldahl (mg N/l)	291.00
Proteína (%N x 6.25)	1.81
Fósforo (mg PO <sub>4</sub> /l)	178.00
Relación N:P	1:0.61
Cenizas (%)	10.20
Grasa (%)	4.50
DBO <sub>5</sub> (mg O <sub>2</sub> /l)	7875.00
DQO (mg O <sub>2</sub> /l)	27280.00
Sólidos (ppm)	19490.00

### 1.3. REACTOR BIOLÓGICO ROTATORIO

Se sabe que los sistemas de tratamiento biológicos aerobios y anaerobios son los más eficientes para degradar la materia orgánica presente en las aguas residuales de molinos de nixtomal (Civil y col. 1984; Marmolejo y González, 1984; Montesinos y Durán, 1986; Pedroza, 1985).

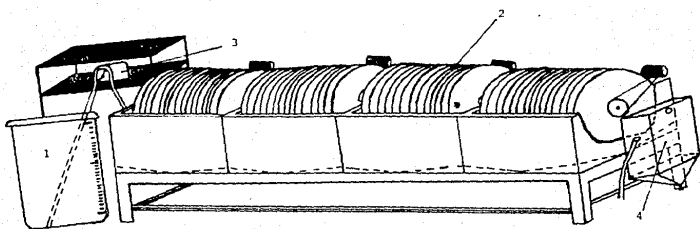
En particular, el reactor biológico rotatorio, más conocido como reactor de biodiscos (Fig. 1), en el cual la degradación se lleva a cabo en forma secuencial, es uno de los más eficientes. Al tener el sistema una población microbológica heterogénea (bacterias, hongos, protozoarios, levaduras, etc.) y adherida a un medio inerte, se localizan microorganismos especializados en la degradación del material orgánico que no ha sido degradado en etapas anteriores por lo que su efectividad en el tratamiento es elevada. El sistema presenta además otras ventajas como es su fácil operación, mantenimiento y supervisión mínimos y bajo consumo de energía.

Una descripción más detallada sobre el reactor biológico rotatorio puede verse en los trabajos realizados por Alvarez (1986), Escárcega y Pulido (1986) y Luna (1987).

#### 1.3.1. Microorganismos presentes en cada una de las etapas.

Como se mencionó anteriormente, en el RBR se tiene un cultivo mixto de microorganismos. El Cuadro 7 muestra en forma general, los microorganismos presentes en cada una de las etapas del reactor.

Fig. 1 Reactor Biológico Rotatorio.



- 1.- Tanque de Alimentación
- 2.- Biodiscos
- 3.- Bomba Peristáltica
- 4.- Sedimentador

CUADRO 7  
 MICROORGANISMOS PRESENTES EN CADA UNA DE LAS ETAPAS  
 DEL TRATAMIENTO BIOLÓGICO AEROBIO (LUNA, 1987)

MICROORGANISMOS	
Cámara 1	Bacterias, flagelados, ciliados
Cámara 2	Bacterias, flagelados, ciliados
Cámara 3	Bacterias, flagelados, ciliados y amibas
Cámara 4	Bacterias, flagelados, ciliados y amibas.

En la primera cámara se tiene una actividad metabólica especializada en la degradación de carbohidratos (bacterias amilolíticas), en la segunda cámara existe actividad metabólica para degradar los residuos celulósicos, en la tercera cámara ocurre la degradación de grasa y en la cuarta hay actividad predominantemente proteolítica.

Un estudio más profundo sobre la actividad biológica en la degradación de la materia orgánica en el sistema aerobio es el desarrollado por Luna (1987).

### 1.3.2. Concentración de nitrógeno orgánico en cada una de las etapas del reactor biológico rotatorio (RBR).

Con base en un estudio realizado por Montesinos y Durán (1986), en la Fig. 2 se observó que el contenido de nitrógeno va aumentando hasta la cámara 3, posteriormente

comienza a descender debido a que al disminuir la disponibilidad de nutrientes, la población presente compete por el sustrato y comienza a presentarse un fenómeno de proteólisis, disminuyendo así el contenido de proteína.

### 1.3.3. Acondicionamiento de la biomasa microbiana.

La biomasa microbiana que se genera durante el tratamiento aerobio se recolecta en un sedimentador secundario (Fig. 1). Para su valoración química y biológica fue necesario obtener la cantidad mínima necesaria para realizar las pruebas. En el trabajo realizado por Álvarez y col. (1985) se estudiaron tres diferentes métodos de secado para ver cuál era el idóneo. Dos sistemas intermitentes, secado por charolas en una estufa a baja temperatura y liofilización y un sistema de secado continuo, secado por aspersión, fueron los métodos estudiados. Para verificar el efecto que tenían en la biomasa se caracterizaron los productos secos con aminogramas y pruebas sensoriales de apariencia general (olor y sabor). El cuadro 8 presenta los aminogramas obtenidos.

[ 8 Proteína (N x 6.25)

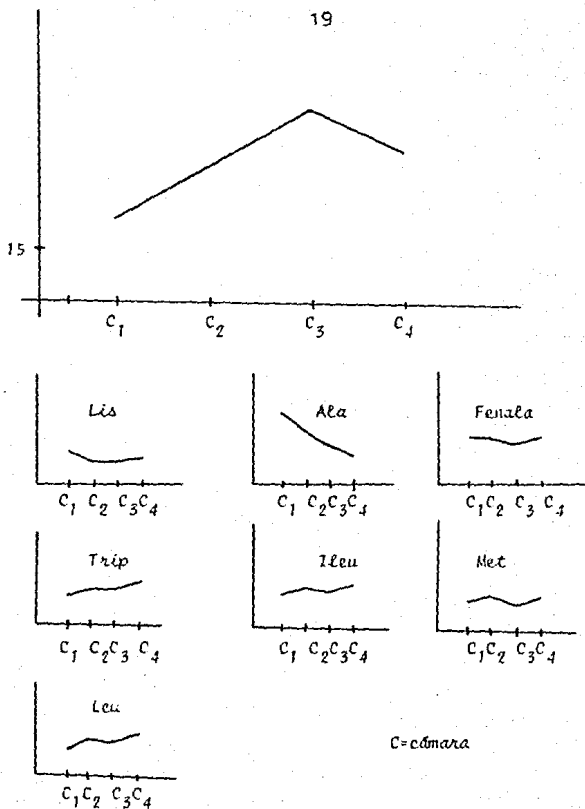


Fig. 2. Contenido de proteína y aminoácidos de la biomasa recolectada para cada una de las cámaras del reactor biológico rotatorio.

CUADRO 8  
 CONTENIDO DE AMINOACIDOS EN MUESTRAS DE BIOMASA  
 SOMETIDA A TRES DIFERENTES METODOS DE SECADO  
 (g/100g DE NITROGENO)

AMINOACIDO	ESTUFA A 60°C	ASPERSION	LIOFILI- ZACION
Lisina	4.1	4.3	4.5
Leucina	6.3	6.6	6.0
Isoleucina	4.0	3.9	3.8
Tenilalanina	8.7	5.9	4.9
<sup>a</sup> Metionina	1.8	1.9	1.8
Treonina	4.9	5.4	4.8
Valina	5.6	5.8	5.5
Tirosina	3.7	3.3	3.3
Alanina	6.8	7.0	7.4
Glicina	4.7	5.6	4.7
Prolina	4.5	4.8	5.0
Serina	4.1	4.5	3.8
Arginina	4.6	4.8	4.3
Histidina	1.6	1.4	1.8
Ac. glutámico	11.6	11.8	11.8
Ac. aspártico	8.7	9.3	8.1

<sup>a</sup> Destrucción parcial durante la hidrólisis.  
 Análisis realizados por CIMMYT, El Batán, México.

La fig. 3 muestra la comparación de los métodos de secado estudiados para los aminoácidos esenciales de animales monogástricos.

con grupos de 12 animales en cada lote. La diferencia entre los pesos de los lotes no fue mayor de 5 g, utilizándose el método de culebra para la selección de los pesos de los animales de cada lote (La descripción del método puede verse en el Apéndice). Posteriormente, la colocación de los animales por dieta se hizo al azar. El alimento consumido y los animales de experimentación se pesaron cada tercer día procurando que fuera más o menos a la misma hora. Las condiciones ambientales del biotério fueron: temperatura 17-17-7°C, humedad relativa 30-65%, iluminación 12 h y obscuridad 12 hrs.

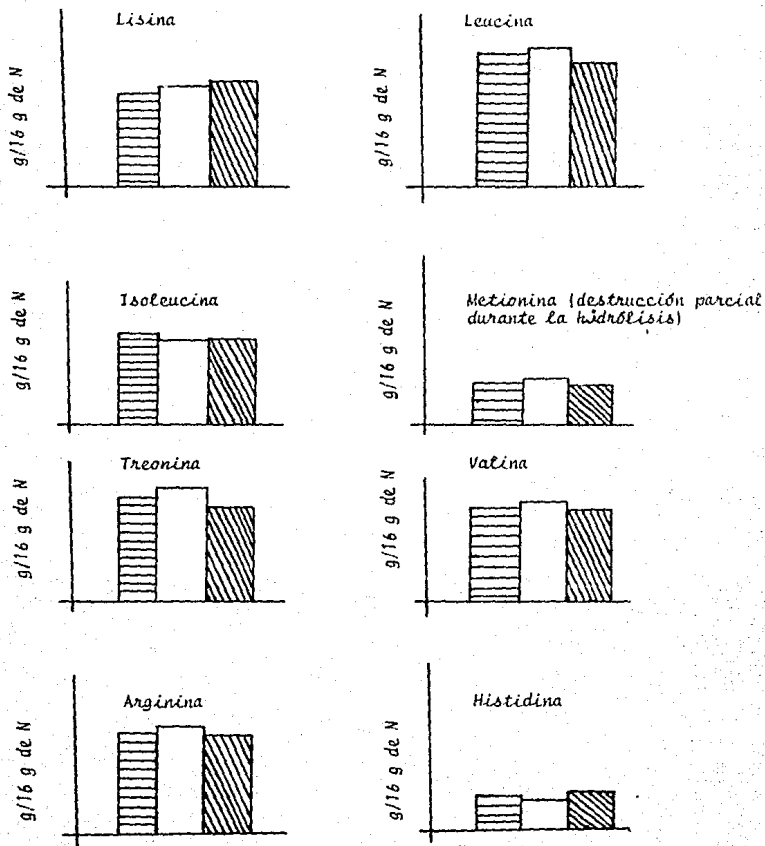
Para este estudio se utilizaron ratas Wistar, machos recién destetados de 21 días de nacidos, cuyo peso oscilaba entre 39-57 g., se obtuvieron de la colonia del biotério del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

Las dietas se prepararon con base en los requerimientos necesarios para obtener una dieta isoproteica e isocalórica (Cuadro 9) que proporciona los requerimientos y las cantidades apropiadas para el buen desarrollo y funcionamiento del organismo del animal. Se trabajó con un porcentaje de proteína del 10% de acuerdo a lo propuesto por Osborne, Mendel y Ferry (1919).



Fig. 3. Comparación de aminoácidos esenciales por diferentes métodos de secado.

Estufa a 60°C ▨    Aspersión □    Liofilización ▩



## 2.0 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GENERAL

*Evaluar la calidad nutritiva de la biomasa microbiana generada durante el tratamiento aerobio de efluentes de la industria de la nixtamalización.*

### 2.2 OBJETIVOS INMEDIATOS

- 2.2.1 *Determinar la composición química de la biomasa microbiana.*
- 2.2.2 *Identificar la presencia de microorganismos patógenos como Salmonella sp., Bacillus cereus y Staphylococcus aureus.*
- 2.2.3 *Determinar la presencia de posibles sustancias tóxicas, en particular aflatoxinas y ácidos nucleicos.*
- 2.2.4 *Realizar pruebas "in vivo" en ratas de laboratorio.*
  - a) *Determinación de la Relación de Eficiencia Proteica.*
  - b) *Determinación de la "digestibilidad aparente".*
- 2.2.5 *Evaluar mediante pruebas histopatológicas, el efecto de la biomasa microbiana sobre las ratas de laboratorio alimentadas durante veintiocho días.*

### 3.0 MATERIALES Y METODOS

#### 3.1 MATERIA PRIMA

La biomasa recolectada en el sedimentador al final del tratamiento aerobio se centrifugó durante 15 min. a 4500 rpm y a 4°C en una centrifuga 6-6 refrigerada marca Heraeus-Christ. Era necesario secar lo más rápido posible la biomasa para evitar condiciones de anaerobiosis que pudieran deteriorar la calidad nutricia por efecto de la proteólisis y que se generaran olores desagradables. Siendo el costo un factor importante en el proceso de secado y puesto que hubo semejanza en cuanto a composición química general (aminogramas) de las biomásas secadas por los métodos de liofilización, aspersión y estufa a baja temperatura, se optó por utilizar la estufa ya que es el método menos costoso de los propuestos. Posteriormente la biomasa seca fue tratada térmicamente a 121°C durante 90 min, posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente para luego incubarla a 23°C durante 24 hrs. con el objeto de permitir el crecimiento de los microorganismos que no fueron eliminados (principalmente esporas). Pasado este tiempo se dió un segundo tratamiento térmico en las condiciones antes señaladas para eliminar a los microorganismos que se hubieran desarrollado durante el período de incubación y estar seguros de su total inocuidad.

#### 3.2 ANALISIS QUIMICO

##### 3.2.1 Análisis Proximal

Este análisis se realizó siguiendo las técnicas establecidas por la A.D.A.C. (1975)

### 3.2.2 Digestibilidad "in vitro".

Se determinó usando pepsina y HCl al 10% (Aklson y Stahmann, 1964), midiendo el contenido de proteína por microkjeldahl (A.O.A.C., 1975) (Apéndice).

### 3.2.3 Determinación de Calcio

El calcio se estimó por una titulación permanganométrica, según la A.O.A.C. (1975) (Apéndice).

### 3.2.4 Determinación de Fósforo

Esta cuantificación se hizo vía ceniza húmeda y posterior determinación colorimétrica (A.O.A.C., 1975). La curva estándar de fósforo se encuentra en el Apéndice.

### 3.2.5 Determinación de aflatoxinas y ácidos nucleicos.

Las aflatoxinas se determinaron por extracción, purificación e identificación mediante cromatografía en capa fina y los ácidos nucleicos mediante ruptura mecánica de la pared celular y extracción con solventes. Los métodos se encuentran descritos en el Apéndice.

## 3.3 ANALISIS MICROBIOLÓGICO

Con el objeto de investigar la presencia de microorganismos patógenos se realizaron análisis específicos para microorganismos enteropatógenos tales como: Salmonella sp., Bacillus cereus y Staphylococcus aureus, así como cuenta total de hongos y levaduras. Para tal efecto se siguieron las técnicas establecidas por el National College of Food Technology. Estos análisis fueron hechos en la biomasa antes del primer tratamiento térmico y después del segundo, para verificar que no hubiera presencia de microorganismos patógenos que afectarían negativamente los resultados de las pruebas bioló-

gicas.

La importancia de estas determinaciones radica en el hecho de que los microorganismos citados puedan generar toxinas que al ser ingeridas por los animales de experimentación pueda producirles graves trastornos, incluso la muerte dependiendo de la concentración a la que se encuentren.

La descripción de las técnicas se encuentra en el Apéndice.

### 3.4 PRUEBAS BIOLÓGICAS

La evaluación de la proteína de un alimento comprende la realización de pruebas biológicas, primero en animales experimentales y, cuando es necesario, en humanos.

La mayoría de los métodos comunes de bioensayo para determinar la calidad de una proteína, se basan en mediciones directas o indirectas de la retención de nitrógeno en el organismo. Estas se pueden agrupar en dos formas:

a) Métodos de crecimiento como: Relación de Eficiencia Proteica (REP), Relación Neta de Proteína (RNP).

b) Métodos de balance de nitrógeno: Digestibilidad aparente (DA), Digestibilidad Verdadera (DV), Utilización Neta de Proteína (UNP) y Valor Biológico (VB).

Relación de eficiencia proteica (REP).- La determinación de la REP (Cambell, 1963) fue propuesto por Osborne en 1919 y está definido como el método que determina la ganancia en peso del animal por gramo de proteína consumida. Se ha encontrado que la edad inicial del animal, el nivel de

proteína de la dieta, el tiempo del experimento, la raza de los animales y el sexo influyen en los resultados. El método parte del hecho de que la proteína ingerida no es para mantenimiento sino para crecimiento, por ello las pruebas se realizan con un nivel de proteína del 10%, para asegurarse de que parte de la proteína no se destine a otro uso que no sea de producción de tejidos. El método también supone que el incremento del peso corporal puede ser no sólo a la síntesis de proteína, sino a la deposición de grasa y otros nutrientes en los tejidos del animal, por lo tanto las proteínas que no promueven crecimiento no pueden ser evaluadas por este método.

*Relación neta de proteína (RNP).*- Este método es una modificación al método de la REP. Se trabaja con dos grupos de cuatro animales cada uno; un grupo es alimentado con la proteína de prueba con un nivel de 10% y el otro grupo es alimentado con una dieta libre de nitrógeno. Al término de siete o diez días de alimentación, los animales son pesados y se cuantifica la proteína ingerida.

$$RNP = \frac{\text{Ganancia en peso de grupo alimentado con la proteína de prueba} - \text{Pérdida del peso del grupo alimentado con dieta libre de nitrógeno.}}{\text{Peso de proteína consumida}}$$

Esta expresión mide la proteína usada para crecimiento y para mantenimiento. El uso de este método no es muy común, debido a que la diferencia entre la REP y la RNP no es muy grande.

*Digestibilidad aparente (DA).*- La digestibilidad de una proteína depende de un número de factores que incluyen: (a) la naturaleza de la proteína en sí misma, (b) la can-

tividad de proteína que se ha suministrado durante un tiempo dado, (c) cualquier tratamiento por calor o cualquier otra manipulación a la que haya sido sometida la proteína, (d) la naturaleza del resto de la ración y (e) factores biológicos, tales como la especie y la edad del animal en cuestión. Existen al menos tres factores que determinan el efecto del calor sobre la digestibilidad, estos factores son: 1) si el calor es húmedo o seco, 2) duración del tiempo de calentamiento y 3) temperatura alcanzada. Usualmente pero no invariablemente, el tratamiento con calor húmedo de una proteína es menos destructivo que el calor seco. Con tiempos de calor prolongados a temperaturas fijas y elevadas la digestibilidad de una proteína tiende a disminuir.

La digestibilidad aparente se define como aquella porción del alimento o nutrimento consumido que no es excretado en las heces y el cual es, por tanto, absorbido por el animal. La digestibilidad aparente es comúnmente expresada como un porcentaje en términos de coeficiente de digestibilidad.

$$\text{Digestibilidad aparente de la proteína} = \frac{N \text{ alimento} - N \text{ heces}}{N \text{ alimento}} \times 100$$

Digestibilidad verdadera.- No todas las heces representan residuos de alimento no digerido. Parte del material fecal está compuesto por enzimas y otras sustancias secretadas dentro del intestino y no absorbidas, por ejemplo el material celular de descamación del mismo intestino y bacterias intestinales.

$$\text{Digestibilidad verdadera} = \frac{N \text{ alimento} - (N \text{ fecal} - N \text{ fecal metabólico})}{N \text{ alimento}} \times 100$$

Si un animal es alimentado con una dieta libre de nitrógeno, la excreción de nitrógeno es continua en las heces. Puesto que este nitrógeno es derivado del cuerpo y no directamente del alimento se conoce así el nitrógeno fecal metabólico.

*Utilización Neta de Proteína.*- Este método mide el cambio de nitrógeno corporal y proporciona datos que dan un criterio más amplio para calificar a una proteína. La utilización neta de proteína consiste en medir la proporción de la proteína ingerida, que son incorporadas al organismo y determina la relación entre la cantidad de nitrógeno retenido y la cantidad de nitrógeno ingerido en forma porcentual.

*Utilización*

$$\text{Utilización neta de Proteína} = \frac{N \text{ retenido (g)}}{N \text{ ingerido (g)}} \times 100$$

$$N \text{ retenido} = N \text{ total de la rata problema} - N \text{ total de la rata blanco}$$

$$N \text{ ingerido} = \frac{g \text{ de dieta} \times \% \text{ de N en la dieta}}{100}$$

El procedimiento consiste en medir el nitrógeno que se ha depositado en las heces del animal por el consumo de la dieta en estudio, con un 10% de proteína por 10 días y es necesario corregir por el nitrógeno endógeno que se mide en otro grupo que consume una dieta libre de nitrógeno.

Este método no es recomendable para efectuar análisis de rutina ya que la determinación de nitrógeno en las heces del animal toma demasiado tiempo y además, resulta tedioso el hecho de tener que secar, moler y homogenizar una rata



entera, por ello se ha propuesto usar la pierna trasera del animal con el objeto de simplificar en cuanto a tiempo y esfuerzo. Lo anterior se basa en el hecho de que la pierna trasera es representativa del contenido de nitrógeno del resto del cuerpo del animal.

*Valor Biológico.*- El valor biológico de una proteína es definido como el porcentaje de nitrógeno absorbido retenido en el cuerpo del animal. El concepto de valor biológico fue introducido por Thomas en 1909 y redefinido por Mitchel y Allison en 1955. Es estimado a partir de las mediciones de nitrógeno ingerido, fecal, metabólico, urinario y endógeno. Todo esto puede expresarse en la siguiente ecuación:

$$\text{Valor Biológico} = \frac{N^{\text{Ingerido}} - (N^{\text{fecal}} - N^{\text{metabólico}}) - (N^{\text{urinario}} - N^{\text{endógeno}})}{N^{\text{Ingerido}} - (N^{\text{fecal}} - N^{\text{metabólico}})} \times 100$$

El método ha sido fuertemente criticado debido al enorme trabajo que se debe realizar para cada una de las determinaciones de nitrógeno.

De los métodos de bioensayo existentes para evaluar una proteína se seleccionó el de la relación de eficiencia proteica y el de la digestibilidad aparente debido a su relativa simplicidad y reproducibilidad en condiciones controladas.

#### 3.4.1 Relación de Eficiencia Proteica (REP)

Se estudiaron dos dietas con la misma fuente de proteína, siendo la diferencia entre una y otra la adición de saborizante artificial a pollo, esto, debido a que la biomasa microbiana tenía sabor y olor desagradable. Se experimentó

CUADRO 9  
COMPOSICION DE LAS DIETAS EN EL ESTUDIO

MATERIALES	PORCENTAJES
Mezcla de vitaminas <sup>1</sup>	1.0
Mezcla de minerales <sup>2</sup>	4.0
Accite de maíz <sup>3</sup>	4.19
Fibra cruda (celulosa) <sup>4</sup>	1.12
Biomasa microbiana	59.62
Sacarosa	10.01
Almidón de maíz	20.06

- 1 La mezcla de vitaminas (Tekland Test, Madison, WI) proporciona las vitaminas activas necesarias cuando se añaden en una proporción del 1% (Cuadro 15 del Apéndice).
- 2 La mezcla de minerales Regens-Harper, proporciona las sales minerales necesarias (Cuadro 16 del Apéndice).
- 3 Ajustado para que en la dieta se tenga 5% de grasa.
- 4 Ajustado para que en la dieta se tenga 2% de fibra cruda.

#### 3.4.2 Digestibilidad aparente (DA)

La digestibilidad de la proteína de las dietas fue medida por el método del óxido crómico (Schorch, 1950), como marcador indigerible. El óxido crómico ( $Cr_2O_3$ ) se administró en forma de polvo en una proporción del 1% en relación al peso de las dietas, las cuales adquieren al final un color verde claro. La digestibilidad de la proteína se calculó en base a las determinaciones de óxido crómico y proteína en las dietas y heces.

### 3.4.3 Pruebas histopatológicas

Las pruebas histopatológicas ayudan a determinar la causa de enfermedad o muerte de los animales mediante un estudio de los órganos internos (pulmones, corazón, sistema digestivo, hígado, riñón). Para tal efecto se realizan cortes muy finos de dichos órganos, los cuales se fijan sobre una placa de vidrio que teñida con colorantes específicos es observada al microscopio. De esta forma se determinan anomalías en las células de cada uno de los órganos. Los estudios histopatológicos de las ratas empleadas fueron realizados por el departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

## 4.0 RESULTADOS Y DISCUSION

## 4.1 DETERMINACIONES QUIMICAS

En el Cuadro 10 se presentan los resultados del análisis proximal efectuado en la biomasa microbiana obtenida del tratamiento aerobio del nejayote.

CUADRO 10  
ANALISIS PROXIMAL DE LA BIOMASA MICROBIANA

PARAMETRO	%
Proteína cruda	15.98
Grasa cruda	1.35
Fibra cruda	4.62
Cenizas	54.35
Humedad	4.37
Carbohidratos	19.31
(Calculados por diferencia)	

La biomasa presentó un contenido de proteína menor que el informado para biomasas de otras fuentes, por ejemplo *Hydrogenomonas eutropha* 76.26% de proteína, *Pseudomonas methanica* 71% y *Thermomonospora fusca* 30% de proteína respectivamente.

Análisis anteriores realizados a la biomasa microbiana de un sistema de biodiscos de 10 cámaras para el tratamiento del nejayote, demuestra un gradiente de contenido proteico

que va de 31.44% a 9.75% dependiendo de la cámara del reactor, esto es, en las primeras cámaras el contenido proteico de la biomasa es mayor que en las últimas, bajo condiciones limitantes de alimento, alcanza su nivel más bajo.

El análisis aquí realizado, corresponde a la mezcla de biomosas que crecen en el sistema de tratamiento, donde los sustratos presentes a degradar son los contenidos en el nejayote sin adición de ningún tipo de nutrimento. Hay que considerar que como sustrato, el nejayote es deficiente en fósforo y nitrógeno, lo cual no permite el adecuado desarrollo microbiano, de ahí la consecuente baja composición proteica.

Los factores fisicoquímicos como pH y temperatura (8 y 9.7-10.3°C respectivamente) pueden también afectar la producción de proteína ya que el pH del sistema no es el adecuado para el crecimiento de bacterias. Se hace la consideración de que la biomasa microbiana que creció en el sistema está formada en su mayoría por bacterias (el pH óptimo se encuentra entre 6.5-7.5).

Por otro lado, se presenta un elevado contenido de materia inorgánica cuantificada como porcentaje de cenizas. En estas se encuentra representado el calcio ya que se adiciona en exceso durante el proceso de nixtamalización del maíz. Este exceso de calcio es arrastrado en las aguas de lavado y cocimiento (nejayote). Durante la formación del flóculo, que se integra por la producción de mucilago de los microorganismos, los cristales de calcio se ocluyen en ella, lo que hace que el contenido de cenizas aumente considerablemente y que la proporción de otros componentes disminuya en relación.

El contenido de fibra cruda también fue alto respecto

a otras biomásas de origen microbiano cuyo contenido fluctúa entre 0.44 y 0.6%. Es probable que en licor de tratamiento se arrastren celulosas y hemicelulosas, provenientes de la hidrólisis del pericarpio del maíz, y estos formen parte del sedimento recolectado al final del tratamiento.

La humedad y el contenido de carbohidratos son normales con relación a otras biomásas secas; 10-17% para algas, 25-30% para bacterias, en cuanto a carbohidratos se refiere.

El contenido de grasa informado para otras biomásas es variable (desde 2% para bacterias, hasta 12-14% para algas). El obtenido de la biomasa a partir del nejayote es similar al de otras biomásas bacterianas (Jones, 1974).

#### 4.1.2 Digestibilidad "in vitro" de la biomasa microbiana

El Cuadro 11 contiene los resultados de la digestibilidad "in vitro" así como las determinaciones de calcio y fósforo. También se presenta la relación Ca/P.

La cuantificación de la digestibilidad "in vitro" fue muy baja si se compara con algunos alimentos convencionales como huevo, trigo, arroz, carne y pescado que tienen una digestibilidad "in vitro" de 97, 89, 84 y 97 respectivamente.

CUADRO 11  
DIGESTIBILIDAD "IN VITRO", CALCIO, FOSFORO  
Y LA RELACION CALCIO/FOSFORO DE LA BIOMASA  
MICROBIANA

PARAMETRO	
Digestibilidad "in vitro"	38.32%
Calcio	19.24%
Fósforo	3.36%
*Relación Ca/P	5.73

\* La relación Ca/P óptima para un adecuado desarrollo de la rata es de 1.1-1.5

En biomasa proveniente de microorganismos, el problema de la baja digestibilidad se puede deber a:

- Que la pared celular de los microorganismos se caracteriza por tener una gran rigidez.

- Que los tejidos que tienen funciones de protección (pared celular), tienden a ser menos digeribles.

- Manipulaciones que se hayan hecho antes de ser evaluada, como es tratamientos térmicos, tiempo de exposición, tipo de calor empleado, ya que pueden ocurrir cambios químicos creando resistencia al ataque de enzimas (en este caso pepsina).

En el caso particular de la biomasa microbiana obtenida a partir del tratamiento aerobio del nejayote puede haber un efecto negativo sobre la pepsina por el alto contenido de calcio, inhibiendo su actividad y obteniéndose por tanto

una baja digestibilidad.

Algunos informes indican que la digestibilidad para algas está entre 50-70% y para levaduras de 80-95% previo tratamiento, ya sea autólisis, plasmólisis, hidrólisis (en la hidrólisis se tiene el problema de que hay destrucción del triptófano y se reduce el contenido de otros aminoácidos) y desintegración mecánica dejando un tamaño de partícula muy fino haciendo así más disponible los aminoácidos de la pared celular.

#### 4.1.3 Ácidos nucleicos y aflatoxinas

Los resultados de las determinaciones de posibles tóxicos como aflatoxinas y ácidos nucleicos se presentan en el Cuadro 12.

CUADRO 12  
AFLATOXINAS Y ACIDOS NUCLEICOS DE  
LA BIOMASA MICROBIANA

TOXICO	CONCENTRACION
Aflatoxinas	-
Ácidos nucleicos	8.05%

Según algunos informes, los microorganismos tienen entre 8 y 25 g. de ácidos nucleicos por cada 100 g de proteína por lo que la concentración encontrada se considera normal y la salud de los animales sujetos a investigación no se ve afectada por estos factores (Kihlberg, 1972).



## 4.2 DETERMINACIONES MICROBIOLÓGICAS

El Cuadro 13 presenta los resultados de las determinaciones microbiológicas realizadas antes y después de tratar térmicamente a la biomasa microbiana.

La presencia de microorganismos patógenos en la biomasa antes de tratarla térmicamente indica que hay contaminación en algún paso de la obtención de la biomasa. Los posibles orígenes de la contaminación pueden ser: contaminación del nejayote; contaminación ambiental por tratarse de un sistema abierto por partículas de polvo o por el aire que circula; o contaminación de origen humano por mal manejo del nejayote y biomasa. Otro factor a considerar es la temperatura deseada (60°C) y el prolongado tiempo de exposición, estos dos factores son especialmente favorables para la esporulación de microorganismos como B. cereus.

CUADRO 13  
MICROORGANISMOS PATÓGENOS EN LA  
BIOMASA MICROBIANA ANTES Y DESPUES  
DE TRATARLA TÉRMICAMENTE

ANTES DE TRATAR TÉRMICAMENTE	MICROORGANISMOS POR GRAMO DE -- BIOMASA
<u>Salmonella</u> sp	470 x 10 <sup>6</sup>
<u>Bacillus cereus</u>	570 x 10 <sup>6</sup>
<u>Staphylococcus aureus</u>	negativo
Cuenta total de hongos y levaduras	11 x 10 <sup>3</sup>
DESPUES DEL SEGUNDO TRATAMIENTO TÉRMIICO	MICROORGANISMOS POR GRAMO DE -- BIOMASA
<u>Salmonella</u> sp	negativo
<u>Bacillus cereus</u>	negativo
<u>Staphylococcus aureus</u>	negativo
Cuenta total de hongos	negativo

*El análisis microbiológico realizado después del segundo tratamiento térmico muestra que se eliminaron los microorganismos patógenos que pudieran crear algún trastorno a los animales de experimentación. No obstante, no se descarta la posibilidad de que se hayan producido toxinas que no se eliminen durante los tratamientos térmicos.*

#### *4.3 PRUEBAS BIOLÓGICAS*

##### *4.3.1 Relación de eficiencia proteica (REP)*

*La ganancia en peso y alimento consumido obtenidos para las dietas ensayadas se presentan en el Cuadro 14. El comportamiento de los animales durante el tiempo de experimentación se puede ver en las Figuras 4, 5 y 6.*

Fig. 4. Comportamiento de los animales alimentados con biomasa microbiana sin saborizante (cada gráfica representa a un animal).

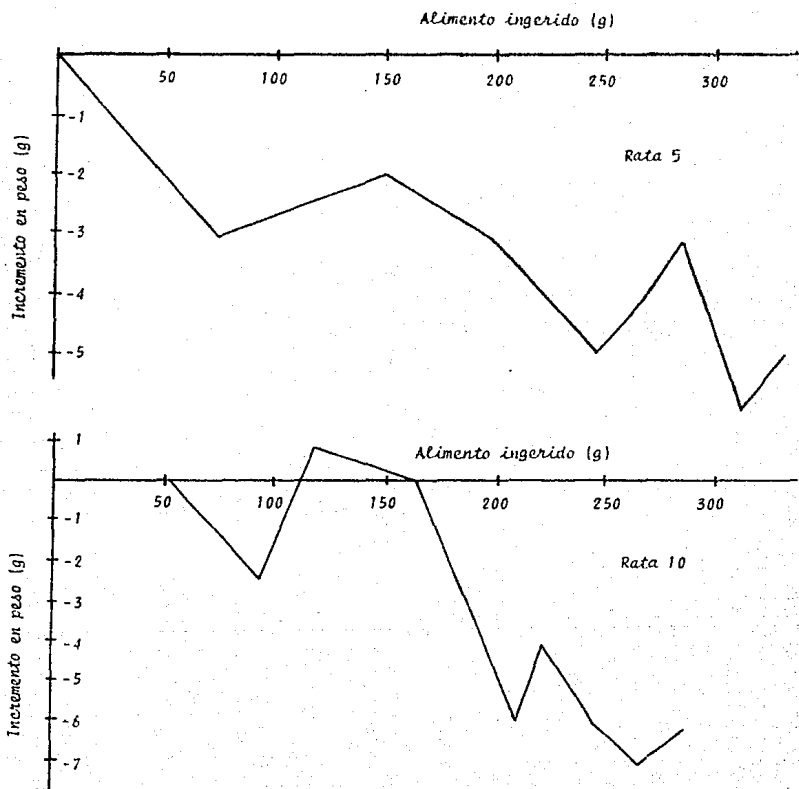


Fig. 5. Comportamiento de los animales alimentados con biomasa microbiana con saberizante (cada gráfica representa a distintos animales).

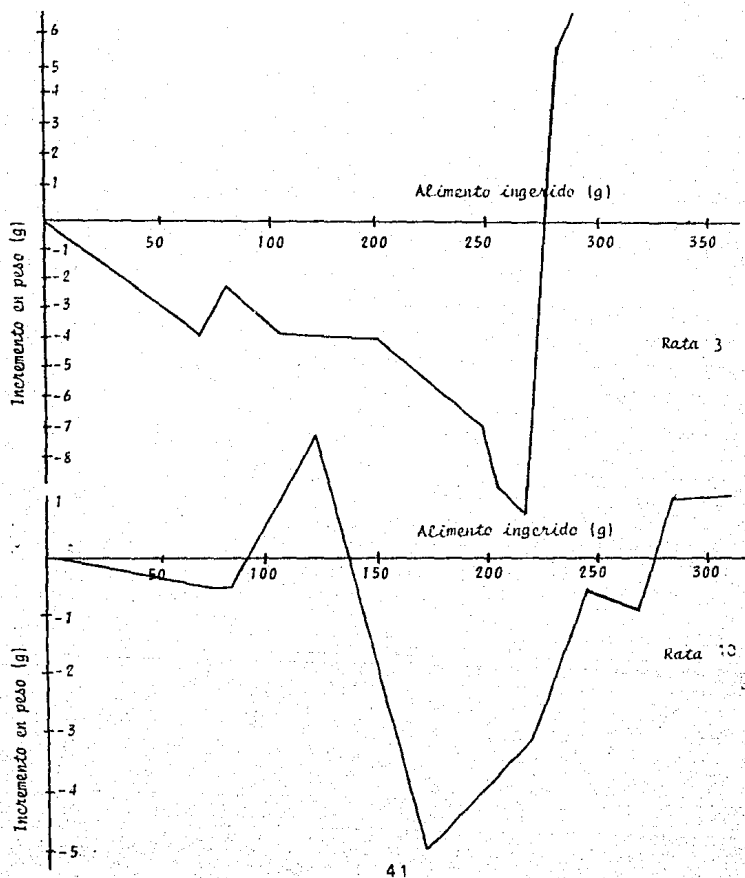
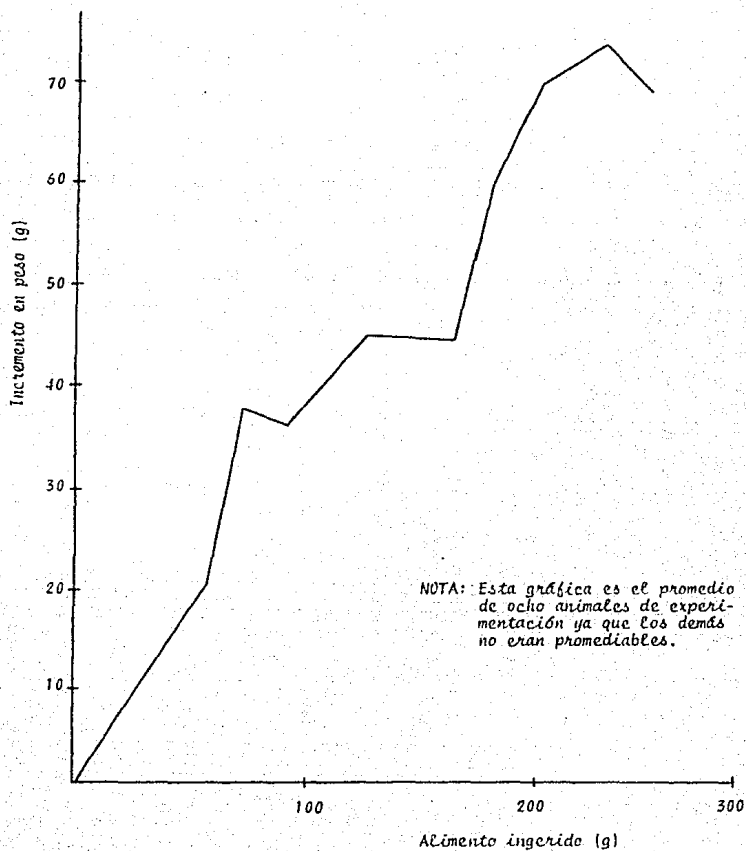


Fig. 6. Comportamiento de los animales alimentados con caseína.



CUADRO 14  
 PESO GANADO, ALIMENTO INGERIDO, Y RELACION DE EFICIENCIA PROTEICA (REP) DE LAS RATAS ALIMENTADAS CON BIOMASA MICROBIANA Y CASEINA (AMBAS DIETAS CON UN NIVEL DE PROTEINA DEL 10%)

DIETA	GANANCIA EN PESO (g)	ALIMENTO INGERIDO (g)	REP (exp.)
<sup>1</sup> Biomasa sin saborizante	-5.5 ± 0.5	306 ± 23	-0.1819 ± 0.03
<sup>2</sup> Biomasa con saborizante	3.5 ± 2.5	306.6 ± 8	0.1418 ± 0.109
<sup>3</sup> Caseína	75.75 ± 9.1	205.56 ± 33	2.95 ± 0.23

<sup>1</sup> y <sup>2</sup> Solamente dos animales resistieron la alimentación con biomasa microbiana, el resto murieron durante el transcurso del experimento.

<sup>3</sup> De este lote murieron dos animales al principio del experimento.

Los registros de los datos para la REP de las ratas alimentadas con las dietas ensayadas y la de referencia se presentan en los Cuadros 17-52 de Apéndice.

Se observó que para la dieta de biomasa sin saborizante el consumo de alimento fue ligeramente superior al de la biomasa con saborizante y ambos superiores al alimento consumido por las ratas alimentadas con caseína. Al analizar

estadísticamente los datos de consumo de alimento de biomasa microbiana, no se encontró diferencia significativa entre el lote alimentado con dieta adicionada con saborizante u el que no lo contenía (Cuadro 54 del Apéndice).

La ganancia en peso de los animales alimentados con dieta de biomasa sin saborizante fue negativa a pesar de que fue el lote de mayor consumo de alimento. En el lote alimentado con biomasa con saborizante se observó un ligero incremento en peso.

Por otra parte, se realizaron determinaciones de proteína en heces de las ratas alimentadas con biomasa microbiana y se encontró que fue superior al porcentaje de proteína que se había adicionado inicialmente a la dieta. Aunque estos resultados no son muy exactos debido a que hay que restar el nitrógeno endógeno, el nitrógeno correspondiente a la descomposición intestinal, el nitrógeno eliminado en orina, así como el correspondiente a la flora intestinal, indican que la asimilación proteica fue casi nula, lo cual corrobora los resultados de la digestibilidad "in vitro".

Los resultados del porcentaje de proteína en heces de las ratas alimentadas con biomasa microbiana se muestran en el Cuadro 53 del Apéndice.

Con respecto a las ratas alimentadas con caseína se obtuvieron buenos resultados aunque murieron dos animales, debido a que probablemente venían enfermos antes de comenzar la prueba biológica.

#### 4.3.2 Digestibilidad aparente (DA)

La digestibilidad aparente no se pudo determinar

debido a que:

1. Sólo quedaban dos animales por dieta de biomasa microbiana, lo cual no era representativo de cada lote.

2. Dado que las últimas determinaciones patológicas debían realizarse en lo posible en animales vivos fue necesario terminar el experimento a los 26 días y no a los 28 como se tenía proyectado inicialmente, debido a que los animales estaban ya muy débiles.

#### 4.3.3 Pruebas histopatológicas

Las pruebas histopatológicas realizadas en los diferentes órganos internos de las ratas a lo largo del experimento tuvieron como resultado el siguiente diagnóstico:

En todas las ratas predominó la gastritis hemorrágica severa, en menor o mayor grado, dependiendo de los días que llevaba el animal alimentándose con la dieta a base de biomasa microbiana. La posible causa pudo haber sido un agente abrasivo presente en la dieta, que muy probablemente sea el calcio.

Esto explica el que los animales alimentados con biomasa microbiana hayan consumido mayor cantidad de alimento, ya que un padecimiento como la gastritis, genera la necesidad de seguir consumiendo alimento, no obstante el daño que éste seguía causando en la mucosa gástrica del animal. Por otra parte, al tener un alto contenido de calcio en el alimento, además del efecto abrasivo, se inhibe la actividad enzimática de los jugos gástricos, disminuyendo así la digestibilidad del alimento y consecuentemente la absorción intestinal de los nutrimentos. De aquí que la ganancia en peso haya sido negativa.



Se observaron también otras lesiones que se atribuyen a enfermedades que se encuentran comúnmente en animales de experimentación es decir, presencia de micoplasma. Este daño lo presentaron todos los animales incluyendo los que se estudiaron antes de comenzar el experimento. Ello podría explicar la muerte de dos de los animales alimentados con cascina. Cabe señalar que la sobrevivencia de los demás animales se atribuye a la diferente resistencia de cada uno a las enfermedades.

## 5.0 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1 CONCLUSIONES

Durante esta fase del estudio sobre el aprovechamiento de la biomasa microbiana como fuente proteica para uso en la alimentación de animales monogástricos se concluye lo siguiente:

1. El análisis microbiológico realizado en la biomasa microbiana después de los tratamientos térmicos indica que no hubo efecto negativo sobre los animales de experimentación por microorganismos patógenos en la biomasa.

2. Las determinaciones de aflatoxinas y ácidos nucleicos descartan la posibilidad de toxicidad de la biomasa, debido a que en el primer caso no se detectó ninguna toxina y, en el segundo, su concentración se encuentra dentro de los límites que pueden considerarse inócuos.

3. La elevada concentración de calcio en la biomasa microbiana, al parecer influyó de manera determinante en la salud de los animales, ya que al parecer el calcio actuó de forma abrasiva sobre las paredes del sistema digestivo causando gastritis hemorrágica severa. También pudo causar una baja en la digestibilidad de la proteína por su efecto sobre las enzimas presentes en el tracto.

4. Dado que se encontró un contenido de proteína en las heces de las ratas superior a lo que se había adicionado inicialmente a la dieta (10%), se piensa que esta especie de animales podría no contar con el sistema enzimático ade-

cuado para hidrolizar la pared celular de los microorganismos que forman la biomasa microbiana y permitirles un mejor aprovechamiento de los nutrimentos.

5. La baja o casi nula asimilación de la proteína se reflejó claramente en los resultados obtenidos de la REP, ya que a pesar de que dicha proteína cuenta con un patrón de aminoácidos adecuado y el consumo de alimento fue alto los animales disminuyeron de peso. Por ello, se piensa que, con los datos obtenidos en este estudio, la biomasa microbiana sin ningún acondicionamiento previo no puede utilizarse como complemento alimenticio de animales monogástricos como la rata.

## 5.2 RECOMENDACIONES

Los resultados obtenidos impulsan a continuar con este tipo de estudios, ya que no se puede descartar tajantemente la utilización de esta fuente de proteína, por lo que se sugiere lo siguiente:

1. Eliminar la mayor proporción posible de calcio en el rejayete antes de ser alimentado al reactor para evitar el alto contenido de este mineral y su efecto sobre el organismo del animal.

2. Tratar de trabajar en lo posible con animales sanos en las pruebas biológicas, considerando además especies diferentes a las ratas (pollos, peces, etc.) para que de este modo se dé continuidad a la cadena trófica o alimenticia.

3. Someter a la biomasa a un proceso de reducción de tamaño de partícula para favorecer el ataque enzimático y por tanto la disponibilidad de nutrimentos.

4. *Evaluar la factibilidad de mantener una temperatura más elevada en el sistema de tratamiento aerobio para mejorar el crecimiento y producción de biomasa microbiana sin que esto implique un aumento considerable en el costo de operación del sistema de tratamiento.*

## NOTA

Las siguientes referencias: Casey, 1963; Prescott, 1971; Spicer, 1971; Wilson, 1973 y McGinnis y Norris, 1975 fueron tomadas de los artículos consultados cuyos autores son para los cuatro primeros Kihlberg, R. 1972. The microbe as a source of food. Annual Review of Microbiology. 26:247-466 y Rose, H.A., 1979. Economic Microbiology. Vol. 4. Academic Press respectivamente.

APENDICE

1. DIGESTIBILIDAD "IN VITRO", METODO DE AKBSON Y STAHMANN

En un vaso de precipitados de 600 ml colocar un gramo de muestra problema y digerirla de la siguiente manera: añadir 430 ml de agua, 0.5 g de pepsina y 16 ml de HCl al 10%, agitar perfectamente y colocar en una estufa a 38-40°C durante 16 hrs, agitando de vez en cuando. Transcurrido este tiempo añadirle 11 ml de HCl al 10%, agitar y dejar a la misma temperatura durante 8 h, pasadas las cuales se añaden otros 11 ml de HCl al 10%, agitar, y dejar nuevamente durante 16 hrs, en reposo transcurridas las cuales añadir 11 ml de HCl al 10% y dejar por último durante 8 hrs más a 38-40°C. Pasadas las últimas 8 hrs. enfriar el vaso y su contenido, filtrar, lavar con agua caliente el vaso y el residuo en el filtro. Determinar las proteínas por macrokjeldhal y las proteínas totales por microkjeldhal.

Determinación de proteínas por microkjeldhal.

Reactivos: Ac. sulfúrico conc., Óxido de mercurio, sulfato de potasio, ácido bórico con indicadores (+), hidróxido de sodio 1:1. Indicador A: 100 mg de fenoftaleína aforados a 100 ml de etanol. Indicador B: 33 mg de verde de bromo cresol y 66 mg de rojo de metilo aforados a 100 ml de etanol. (+) Se pesan 5 g de ácido bórico y se colocan en matraz aforado de 1 l, se adiciona agua hasta disolver y a continuación se agregan 35 ml de indicador A y 10 ml de indicador B. Se ajusta el color a un tono café rojizo con ácido o base según se requiera y aforar a un litro con agua.

*Determinación:* Pesar de 50 a 100 mg de muestra en un pedazo pequeño de papel delgado, envolver bien para que no se salga la muestra e introducir en el matraz de microkjeldhal; añadir un gramo de sulfato de potasio, 40 mg de óxido mercúrico, 3 ml de ácido sulfúrico conc. y unas perlas de vidrio. Colocar el matraz en el digestor y calentar hasta la total destrucción de la materia orgánica, es decir, hasta que el contenido del matraz esté completamente claro y no contenga residuos de materia orgánica. Dejar enfriar, disolver el residuo en la menor cantidad de agua posible (5-10 ml), pasar esto al matraz de destilación, enjuagar el matraz dos veces con la mínima cantidad de agua posible y añadir estos lavados al aparato de destilación. A la salida del condensador del destilador colocar un vaso de precipitados de 250 ml que contenga 50 ml de ác. bórico. Se añaden 20 ml de NaOH 1:1 a la copa de adición del microdestilador y con mucho cuidado se abre la llave de adición del microdestilador para poder liberar el amoníaco de la mezcla de reacción. Continuar la destilación hasta obtener 50 ml del destilado, por último retirar el vaso del dispositivo y abrir la llave de succión, sacar el residuo de la mezcla de reacción. Pasar el contenido del vaso a un matraz erlenmeyer y titular con una solución valorada de HCl 0.01 N, hasta el virar del color verde a rojo fresa. Hacer un blanco utilizando un pedazo de papel igual al que se usó para la muestra procediendo de la misma manera. La determinación de proteínas por macrokjeldhal se hace igual que para el análisis proximal.

## 2. DETERMINACION DE CALCIO

*Reactivos:* solución saturada de oxalato de amonio, solución de permanganato de potasio 0.05 N.

*Determinación:* Calcinar de 10-50 g de muestra a 500-550°C hasta obtener cenizas blancas. Humedecer con 5-10 ml de HCl<sub>conc.</sub> hervir dos minutos y evaporar a sequedad a baño maría por una hora. Humedecer el residuo con 5 ml de HCl conc., hervir dos minutos, adicionar 50 ml de agua, calentar a baño maría durante 15 minutos y filtrar recibiendo en un matraz aforado de 100 ml, lavar cuantitativamente y aforar (sol. A). Transferir 25 ml de la solución A a un vaso de precipitados de 250 ml, adicionar agua a tener un volumen de 50 ml, calentar a ebullición y adicionar 10 ml de solución saturada de oxalato de amonio y unas gotas de indicador rojo de metilo, adicionar amoniaco gota a gota hasta llegar cerca del punto de neutralización y hervir hasta que precipite el oxalato de calcio enfriar y adicionar HCl hasta color rosa (pH 5) y dejar en reposo aproximadamente 6 hs (de preferencia toda la noche). Filtrar usando un filtro de vidrio poroso, lavar con hidróxido de amonio diluido (1+50) hasta que los últimos 50 ml del filtrado adicionados de 5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1+4) y calentado a ebullición incipiente no decolore una gota de solución 0.05 N de permanganato de potasio. Lavar perfectamente el matraz kitasato y proceder a la disolución del precipitado con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> diluido (10 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 250 ml de agua) caliente, titular en caliente con solución de permanganato de potasio 0.05 N hasta coloración rosa permanente.

Un ml de solución de permanganato de potasio 0.05 N equivale a 1 mg de calcio. Calcular el porciento de calcio en el alimento.

### 3. DETERMINACION DE FOSFORO

*Reactivos:* Fosfato monopotásico, molibdato de amonio, ácido clorhídrico conc, metabisulfito sódico, sulfito

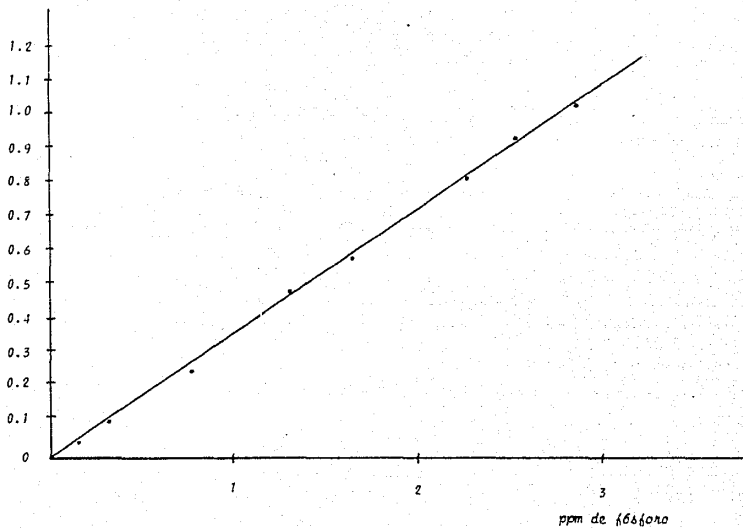


de sodio, ácido 1-amino-nafto-4-sulfónico.

**Soluciones:** Solución patrón de fósforo. Disolver 0.4394 g de fosfato monopotásico en 1 l de agua destilada. Cada ml contiene 0.1 mg de fósforo. Solución 1: disolver 10 g de molibdato de amonio en 100 ml de agua destilada, agregar 170 ml de HCl conc. y almacenar bajo refrigeración. Solución 2: disolver en el siguiente orden en agua destilada 14 g de bisulfito sódico, 0.5 g de sulfito sódico, 0.25 g de ácido 1-amino-2-nafto-4-sulfónico, completar hasta 100 ml con agua destilada. Almacenar bajo refrigeración.

**Determinación:** Preparar la muestra por digestión ácido (+), tomar alícuotas por duplicado de 1 ml del extracto de 50 ml, añadir 10 ml de agua destilada. Preparar al mismo tiempo un blanco de reactivos con agua destilada. Preparar un patrón de 5 ó 2 ppm (testigo). Añadir a cada uno, con pipeta 0.5 ml de solución 1 y 0.5 ml de solución 2, no usar la misma pipeta. Después de una hora de reposo leer a 575 nm. Comparar los resultados con una curva estándar, finalmente, reportar el fósforo como ppm. (+) Ceniza húmeda. **Reactivos:** ácido perclórico al 60%, ácido nítrico conc. **Determinación:** Pesar por triplicado 1 g de muestra y colocarla dentro de un matraz erlenmeyer y agregar unas piedras de ebullición. Adicionar 10 ml de una mezcla de los siguientes ácidos: una parte de ácido perclórico al 60% y cinco de ácido nítrico conc. Dejar reposar los matraces por lo menos durante 12 h. empezar la digestión en el punto mínimo de temperatura sacar de la parrilla los matraces cuando los humos blancos desaparezcan. No digerir en seco, PELIGRO. Lavar los embudos de digestión con agua destilada (tibia de preferencia), lavar las paredes de los matraces y poner a ebullición para disolver las sales. Transferir la solución de los matraces a un matraz volumétrico de 50 ml y afornar con agua destilada

Absorbancia



Curva patrón de fósforo

cuando se haya enfriado. Filtrar la solución con papel filtro Whatman # 1, recoger el filtrado en un recipiente completamente limpio.

#### 4. DETERMINACION DE ACIDOS NUCLEICOS

##### AISLAMIENTO DE DNA

*Material y equipo:* Mortero con pistilo, dos vasos de precipitados de 250 ml, tres pipetas graduadas de 1 ml y tres de cinco ml, dos pipetas pasteur, cuatro tubos de centrifuga de 50 ml, un embudo de filtración, una gradilla, 10 tubos de ensayo de 20 x 20, un trozo de gasa, un matraz con tapón esmerilado y una centrifuga.

*Reactivos:* a) solución amortiguadora de SAS; Tris 0.01 M, Sacarosa 0.3 M, Cloruro de magnesio 0.005 M, b) Solución amortiguadora de TRIS 0.4 M a pH = 5, c) Luamil sulfato de sodio al 4%, d) E.D.T.A. salino pH = 8; E.D.T.A. 0.1 M, NaCl 0.15 M, e) solución amortiguadora de CSC; citrato de sodio 0.15 M, NaCl 1.5 M, f) solución amortiguadora de dsc; dilución de la solución amortiguadora CSC 1:1000, g) etanol frío, h) mezcla de Sevag; cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), i) hielo seco, j) NaCl 4 M.

*Determinación:* antes de empezar, colocar dos vasos de precipitados con 50 ml de etanol cada uno en el congelador. Pesar 5 g de muestra, y molerla con un trocito de hielo seco en un mortero hasta homogenizar el material y quede finamente molido, pasar la muestra a un vaso de precipitados y agregar un trocito de hielo seco y 20 ml de solución amortiguadora SAS, dejar congelar por 10 min y descongelar a chorro de agua. Pasar el homogenizado por una gasa doble y exprimir, centrifugar el filtrado por 5 min a 3000 rpm, dese-

char el sobrenadante y resuspenden la pastilla en 5 ml de solución amortiguadora de TRIS pH 5, añadir 5 ml de lauril sulfato de sodio y homogenizar con la varilla de vidrio, añadir un ml de solución amortiguadora CSC y homogenizar. Verten el contenido del tubo, muy lentamente a un vaso de precipitados que contenga 50 ml de etanol frío. En este paso el DNA precipitado por el alcohol, asciende como una nata blanca, pasar la nata a un matraz y redisolvelo con 20 ml de solución amortiguadora dsc, ayudando a la disolución con una varilla de vidrio. Adicionar 5 ml de NaCl 4 M y añadir igual volumen de mezcla de Sevag y agitar severamente por 8 min. Centrifugar por 5 min a 3000 rpm, en este caso se obtienen tres fases: en la superior el DNA, en la media la proteína y en la inferior la mezcla de Sevag. Finalmente, separar con pipeta la capa superior y verterla lentamente a un vaso de precipitados que contenga 50 ml de etanol frío, en este paso el DNA libre de proteína asciende nuevamente, sacar el DNA con una varilla de vidrio, eliminar el alcohol presionando ligeramente contra la pared del vaso. Pesar.

#### AISLAMIENTO DE RNA

Reactivos: Solución buffer de fosfatos 1 M y pH = 7, Solución de E.D.T.A. 100 mM, Solución de fenol al 90%, Cloroformo, Acetato de potasio 1.5 M y pH = 5, etanol absoluto, solución etanol: agua 3:1, éter.

Determinación: homogenizar la muestra (previamente pesada) en un mortero con 15 ml de buffer de fosfatos y 1.6 ml de E.D.T.A. 100 mM, filtrar el homogenizado a través de gasa y exprimir, agitar el filtrado con 7.5 ml de fenol al 90% y 7.5 ml de cloroformo un minuto a temperatura ambiente, enseguida, enfriar la suspensión en baño de hielo por 5 min y romper la emulsión por centrifugación a no menos de 2500

rpm durante 15 min. Separar la fase acuosa (superior) que contiene el RNA, para quitar las proteínas, agitar con una varilla de vidrio la fase orgánica que quedó en el tubo de centrifuga y volver a centrifugar para obtener más fase acuosa, medir el volumen total de la fase acuosa y agregar un décimo de dicho volumen de acetato de potasio. Precipitar el RNA agregando dos veces el volumen de la fase acuosa de etanol absoluto y enfriar la solución 5 min en hielo y centrifugar 5 min a 2500 rpm. Lavar el precipitado con 5 ml de etanol-agua y volver a centrifugar por dos min a 2500 rpm, finalmente lavar con 5 ml de éter y centrifugar por 2 min dejar secar y pesar.

#### DETERMINACION DE AFLATOXINAS

*Extracción:* Se muele y homogeneiza la muestra (50 g) y se coloca en un matraz de 500 ml, se adicionan 25 ml de agua destilada, tierra diatomas y 250 ml de cloroformo, se agita perfectamente durante 30 min., pasado este tiempo se filtra en papel Whatmann # 4. El filtrado se coloca en un matraz hola de 500 ml para su evaporación en el rotavapor a 60°C con vacío, hasta obtener 10 ml.

*Purificación:* Los 10 ml de muestra extraída se adicionan a una columna de gel de sílice (60-200 mallas).

*Columna:* la columna de vidrio de 30 cm de altura y 2.5 cm de diámetro se acopla con un poco de lana de vidrio en el fondo como soporte y se adicionan 5 g de sulfato de sodio anhidro. Posteriormente se llena de cloroformo y en seguida se añaden 10 g de gel de sílice (60-200 mallas) re-suspendiendo en cloroformo. Se empieza a eluir y al mismo tiempo se adicionan cloroformo con el fin de lavar las paredes de la columna y empaquetar la misma. Por último se adicio-

nan 15 g de sulfato de sodio y se eluye el cloroformo hasta casi el nivel de sulfato. Se adicionan los 10 ml de muestra concentrada y se lava a la máxima velocidad de elución, primero con 150 ml de hexano seguido de 150 ml de éter etílico, ambas fracciones se desechan. Las aflatoxinas se eluyen con 150 ml de metanol: cloroformo (3:97). Esta fracción se colecta hasta que la elución termine, se concentra hasta sequedad y, resuspendiendo en 2 ml de cloroformo y transfiriendo a un frasco vial. El contenido del frasco vial se evapora hasta sequedad con nitrógeno gaseoso. Las aflatoxinas se resuspenden cuantitativamente con 500 ml de cloroformo o benceno-acetonitrilo (98-2) para posterior análisis de cromatografía en capa fina.

**Determinación:** la determinación se efectúa en placas de gel de sílice en capa fina.

**Preparación de placas:** se resuspenden 30 g de gel de sílice (Kiedelgel, Merck) en 65 ml de agua destilada en un matraz de tapón de rosca se agita y aplica a placas de vidrio de 20 x 20 con espesor de 0.25 mm empleándose un aplicador de gel para placas. Se deja secar a temperatura ambiente durante 15 min y se activan en un horno a 110°C por una hora.

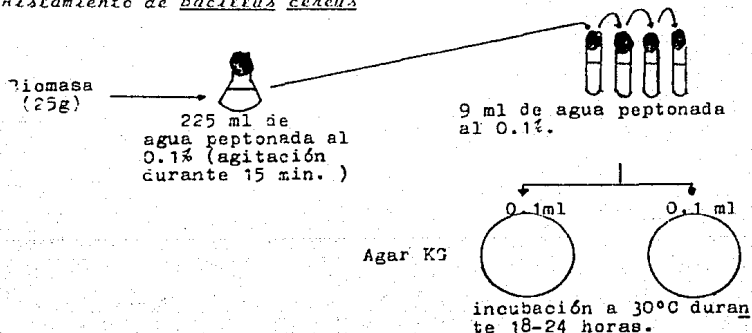
**Aplicación del extracto al cromatograma:** En una placa para cromatografía en capa fina, preparada como se indicó anteriormente, se trazan líneas paralelas imaginarias separadas por dos cm de distancia. Antes de aplicar la muestra se identifica cada división con el número de la muestra y el tipo de estándar que se aplicó en ella. La longitud entre el punto de aplicación y el frente del solvente debe ser de 17 cm. Las muestras se aplican cuantitativamente con ayuda de micro esringa, en una zona circular no mayor de 0.5 cm de

diámetro. El extracto del problema y la solución estándar (aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>) se aplican alternadamente en las placas. Las cantidades aplicadas generalmente son de 5, 10 y 15 l respectivamente. Una vez hecha la aplicación, la placa se deja desarrollar en una cámara cuyos solventes son cloroformo:acetona: agua (85: 15:1.5) para la separación de las aflatoxinas. Una vez secas las placas se observan en una cámara oscura en luz ultravioleta de onda corta y larga. En el sitio donde se encuentran aflatoxinas la placa fluoresce, azul y/o verde al incide la luz ultravioleta. Si el R<sub>f</sub> de las manchas de los estándares y los R<sub>f</sub> de las manchas del problema coinciden, la muestra se considera positiva.

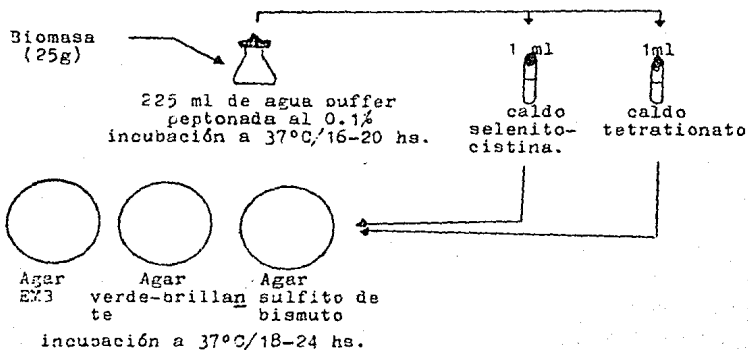
$$R_f = \frac{\text{frente de soluto}}{\text{frente del solvente}}$$

## 5. DETERMINACIONES MICROBIOLÓGICAS

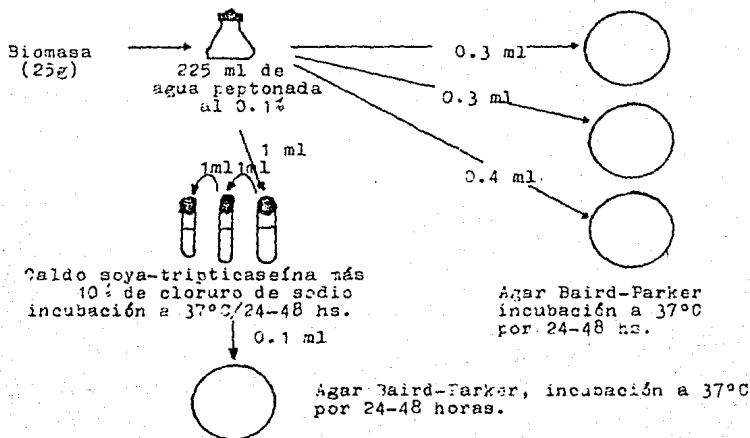
### Aislamiento de *Bacillus cereus*



Aislamiento de Salmonella sp. 61



Aislamiento de Staphylococcus aureus.





## 6. METODO DE LA CULEBRA PARA DISTRIBUIR LOS ANIMALES POR PESO

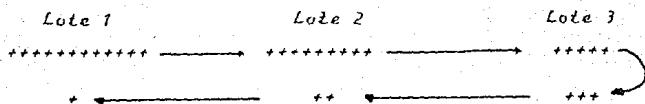
Se pesan todos los animales y se colocan en jaulas individuales registrando su peso. Teniendo todos los pesos, se hace una lista de todos los pesos acomodándolos de mayor a menor o viceversa. Según sea el número de lotes con los que se va a trabajar se hace el número de columnas sobre las cuales se van distribuyendo los pesos de los animales de la siguiente forma: se comienzan a anotar los pesos de izquierda a derecha y se baja al siguiente renglón, se anotan entonces los pesos de derecha a izquierda y se vuelve a repetir como al principio hasta anotar todos los pesos. Ejemplo:

Peso de animales

```

1.  ++++++
2.  ++++++
3.  +++++
4.  +++
5.  ++
6.  +

```



De esta forma se tiene en cada lote animales de todos los pesos.

Cuadro 15. Composición de la mezcla vitamínica  
(Tekland Test, Madison, WI).

Vitaminas	Cantidad	
Ac. p-amino benzoico	110.229 mg/Kg	dieta
Ac. ascórbico	1017.520	"
Biotina	0.441	"
Pantotenato de calcio	66.137	"
Vitamina B <sub>12</sub> (0.1% en manitol)	29.762	"
Citrato de colina	3715.123	"
Ac. fólico	1.984	"
L-inositol	110.229	"
Menadiona	49.603	"
Ac. nicotínico	99.206	"
Clorhidrato de piridoxina	22.045	"
Riboflavina	22.045	"
Clorhidrato de tiamina	22.045	"
Vitamina A seca (500 000 U/g)	1984.1	U.I
Vitamina D seca (500 000 U/G)	220.4	U.I
Acetato de vitamina E	12.12	U.I

Cuadro 16. Mezcla de minerales Rogers-Harper  
(1965).

Minerales	g/100g de mezcla	g/Kg de dieta
$\text{CaCO}_3$	29.29	11.716
$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.43	0.172
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	34.31	17.724
$\text{NaCl}$	25.06	10.024
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	9.98	3.992
$\text{Fe}(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7) \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.623	0.249
$\text{CuSO}_4$	0.156	0.062
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.121	0.048
$\text{ZnCl}_2$	0.020	0.008
$\text{KI}$	0.0005	0.0002
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.0025	0.001
$\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.0015	0.0006

Esta mezcla de sales cuando se adiciona en un 4% en peso de la dieta proporciona esas cantidades de minerales.

REGISTRO DE DATOS PARA LA PRUEBA BIOLÓGICA  
 NUTRICIONAL: Biomasa microbiana  
 INICIO DE LA PRUEBA: 21 de octubre de 1987  
 DIETA: Biomasa sin saborizante

RATA 1 PESO INICIAL 52g												CUADRO 17
TIEMPO (días)	1	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
PESO ANIMAL	52	50.5	49			49		49		44	45	43
INCREMENTO ACUMULATIVO	5	-1.5	-3			-3		-3		-8	-7	-9
ALIMENTO INICIAL	50	54	68.5	36	40		56	48	62	46	40	54
ALIMENTO FINAL		10	18	30	22	26	28	20	32	20	32	30
ALIMENTO INGERIDO		40	36	38.5	14	14	28	28	30	26	8	24
ALIMENTO ACUMULATIVO		40	76	114	128.5	142.5	170	189	228	254	262	286
OBSERVACIONES: quedó muy débil												
TOTAL: peso final 43g, incremento en peso -9g, alimento ingerido 286g.												

RATA 2 PESO INICIAL 47g												CUADRO 18
TIEMPO (días)	1	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
PESO ANIMAL	47		45	43		43		43		40	39	38
INCREMENTO ACUMULATIVO			-2	-4		-4		-4		-7	-8	-9
ALIMENTO INICIAL	50		52	67	36	40	36	52	18	52	36	50
ALIMENTO FINAL		16	22	24	26	30	20	0	28	36	30	32
ALIMENTO INGERIDO		34	30	43	10	10	16	52	10	16	6	18
ALIMENTO ACUMULATIVO		34	64	107	117	127	143	195	205	221	227	245
OBSERVACIONES: quedó muy débil												
TOTAL: peso final 38g, incremento en peso -9g, alimento ingerido 245g.												

RATA 3 PESO INICIAL 52g				CUADRO 19
TIEMPO (días)	1	4	6	8
PESO ANIMAL	44		38	36
INCREMENTO ACUMULATIVO			-6	-8
ALIMENTO INICIAL	50		37	58
ALIMENTO FINAL		1	20	24
ALIMENTO INGERIDO		49	17	34
ALIMENTO ACUMULATIVO		49	66	100
OBSERVACIONES: murió el 30 de octubre				
TOTAL: peso final 36g incremento en peso -8g alimento ingerido 100g				

RATA 4 PESO INICIAL 49g		CUADRO 20
TIEMPO (días)	1	
PESO ANIMAL	49	
INCREMENTO ACUMULATIVO		
ALIMENTO INICIAL	50	
ALIMENTO FINAL		
ALIMENTO INGERIDO		
ALIMENTO ACUMULATIVO		
OBSERVACIONES: murió el 25 de octubre, antes de realizar la primera pesada		

RATA 5 PESO INICIAL 46g												CUADRO 21	
TIEMPO (días)	1	2	5	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26
PESO ANIMAL	46		43	43		44		43		41	42	43	40
INCREMENTO ACUMULATIVO			-3	-2		-2		-3		-5	-4	-3	-6
ALIMENTO INICIAL	50		44	53	24	18	24	42	50	40	30	36	38
ALIMENTO FINAL		0	20	16	12	8	8	10	22	18	20	6	12
ALIMENTO INGERIDO		50	22	47	12	14	16	32	25	22	10	10	25
ALIMENTO ACUMULATIVO		50	72	119	131	145	161	193	221	243	253	283	309
OBSERVACIONES: ninguna													
TOTAL: peso final 41g incremento en peso -6g alimento ingerido 309g													

RATA 6	PESO INICIAL 50g										CUADRO 22	
TIEMPO (días)	1	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	
PESO ANIMAL	50		45	43		42		44		43	38	
INCREMENTO ACUMULATIVO			-4.5	-7		-8		-6		-7	-1.2	
ALIMENTO INICIAL	50		42	47	30	32	36	46	46	22	28	
ALIMENTO FINAL		12	22	20	18	10	22	20	32	12	24	
ALIMENTO INGERIDO		38	20	27	12	14	14	26	14	10	4	
ALIMENTO ACUMULATIVO		38	58	85	97	111	125	151	165	175	179	
OBSERVACIONES: murió el 8 de noviembre												
TOTAL; peso final	38g	incremento en peso										-12g

RATA 7	PESO INICIAL 53g								CUADRO 23			
TIEMPO (días)	1	4	6	8	10	12	14	16				
PESO ANIMAL	53		51	49		48		44				
INCREMENTO ACUMULATIVO			-2	-4		-5		-9				
ALIMENTO INICIAL	50		50	64	38	46	46	54				
ALIMENTO FINAL		18	18	24	30	34	32	36				
ALIMENTO INGERIDO		32	32	45	8	12	14	18				
ALIMENTO ACUMULATIVO		32	64	109	117	129	143	161				
OBSERVACIONES: murió el 2 de noviembre												
TOTAL; peso final	44g	incremento en peso								-9g	alimento ingerido	161g

RATA 8	PESO INICIAL 45g				CUADRO 24		
TIEMPO (días)	1	4	6	8			
PESO ANIMAL	45		42	40			
INCREMENTO ACUMULATIVO			-3	-5			
ALIMENTO INICIAL	50		40	60			
ALIMENTO FINAL		10	18	22			
ALIMENTO INGERIDO		40	22	38			
ALIMENTO ACUMULATIVO		40	62	100			
OBSERVACIONES: murió el 28 de octubre							
TOTAL; peso final	40g	incremento en peso			-5g	alimento ingerido	100g

DATA 9		PESO INICIAL 55g		CUADRO 25	
TIEMPO (días)	1				
PESO ANIMAL	55				
INCREMENTO ACUMULATIVO					
ALIMENTO INICIAL	50				
ALIMENTO FINAL					
ALIMENTO INGERIDO					
ALIMENTO ACUMULATIVO					
OBSERVACIONES: murió el 25 de octubre, antes de realizar la primera pesada.					

DATA 10		PESO INICIAL 47g		CUADRO 26											
TIEMPO	1	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26			
PESO ANIMAL	47	47	44.5		48		47		41	43	41	40			
INCREMENTO ACUMULATIVO		0	-2.5		1		0		-6	-4	-6	-7			
ALIMENTO INICIAL	50	40	69	44	46	48	48	48	46	44	48	48			
ALIMENTO FINAL		14	22	32	36	22	22	26	28	34	24	26			
ALIMENTO INGERIDO		36	18	37	12	12	26	26	22	18	10	24	22		
ALIMENTO ACUMULATIVO		36	54	91	103	115	141	167	198	207	217	241	263		
OBSERVACIONES: Ninguna															
TOTAL: peso final 41g incremento en peso -6g alimento ingerido 263g															

DATA 11		PESO INICIAL 42g		CUADRO 27										
TIEMPO (días)	1	4	6	8	10									
PESO ANIMAL	43		40	39	39									
INCREMENTO ACUMULATIVO			-2	-3	-3									
ALIMENTO INICIAL	50		26	42	36									
ALIMENTO FINAL			2	2	26	28								
ALIMENTO INGERIDO			48	24	16	8								
ALIMENTO ACUMULATIVO			48	72	88	96								
OBSERVACIONES: murió el 30 de octubre														
TOTAL: peso final 39g incremento en peso -3g alimento ingerido 96g														

RATA 12	PESO INICIAL 43g						CUADRO 28
TIEMPO (días)	1	4	6	8	10	12	
PESO ANIMAL	43		38.5	37		35	
INCREMENTO ACUMULATIVO			-4.5	-6		-8	
ALIMENTO INICIAL	50		46	58.5	40	44	
ALIMENTO FINAL		10	20	28	30	32	
ALIMENTO INGERIDO		40	26	30.5	10	12	
ALIMENTO ACUMULATIVO		40	66	96.5	106.5	118.5	
OBSERVACIONES: murió el 31 de octubre							
TOTAL: peso final 53g incremento en peso -8g alimento ingerido 118.5g							

DIETA: Biomasa con saborizante

RATA 1	PESO INICIAL 45g						CUADRO 29
TIEMPO (días)	1	4	6	8			
PESO ANIMAL			42				
INCREMENTO ACUMULATIVO			-3				
ALIMENTO INICIAL	50		44	38			
ALIMENTO FINAL		8	26	32			
ALIMENTO INGERIDO		42	18	6			
ALIMENTO ACUMULATIVO		42	60	66			
OBSERVACIONES: murió el 28 de octubre							
TOTAL: peso final 42g incremento en peso -3g alimento ingerido 66g							



RATA 2	PESO INICIAL 54g						CUADRO 30		
TIEMPO (días)	1	4	6	8	10	12			
PESO ANIMAL			49	45		46.5			
INCREMENTO ACUMULATIVO			-5	-9		-7.5			
ALIMENTO INICIAL	50		41	38		28	32		
ALIMENTO FINAL		6	26	0		20	24		
ALIMENTO INGERIDO		50	15	38		8	6		
ALIMENTO ACUMULATIVO		50	65	103		111	119		
OBSERVACIONES: murió el 31 de octubre									
TOTAL: peso final 46.5g incremento en peso -7.5g alimento ingerido 119g									

RATA 3	PESO INICIAL 48g						CUADRO 31						
TIEMPO (días)	1	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26
PESO ANIMAL			44	46		44		44		41	39	38	54
INCREMENTO ACUMULATIVO			-4	-7		-4		-4		-7	-9	-10	6
ALIMENTO INICIAL	50		54	34	32	38		42	48	54	44	32	44
ALIMENTO FINAL		20	12.5	22	24	26		28	18	24	28	24	30
ALIMENTO INGERIDO		30	41.5	12	8	12		14	30	30	16	18	14
ALIMENTO ACUMULATIVO		30	71.5	83.5	91.5	103.5		117	147	177	193.5	201.5	215.5
OBSERVACIONES: ninguna													
TOTAL: peso final 54g incremento en peso 7g alimento ingerido 227.5g													

RATA 4	PESO INICIAL 42g						CUADRO 32		
TIEMPO (días)	1	4	6	8	10	12			
PESO ANIMAL			41	39		38			
INCREMENTO ACUMULATIVO			-1	-3		-4			
ALIMENTO INICIAL	50		6	32	30	34	40		
ALIMENTO FINAL		6	10	18	24	40			
ALIMENTO INGERIDO		44	22	12	10	0			
ALIMENTO ACUMULATIVO		44	66	78	88	88			
OBSERVACIONES: murió el día 30 de octubre									
TOTAL: peso final 38g incremento en peso -4g alimento ingerido 88g									

RATA 5 PESO INICIAL 49g		CUADRO 33	
TIEMPO (días)			
PESO ANIMAL	49		
INCREMENTO ACUMULATIVO			
ALIMENTO INICIAL	50		
ALIMENTO FINAL			
ALIMENTO INGERIDO			
ALIMENTO ACUMULATIVO			
OBSERVACIONES: murió el 25 de octubre (antes de la primera pesada)			

RATA 6 PESO INICIAL 52 g		CUADRO 34	
TIEMPO (días)	1 4 6 8 10 12		
PESO ANIMAL		46.245	38
INCREMENTO ACUMULATIVO		-5.5 -7	-14
ALIMENTO INICIAL	50	37 40 30 34	
ALIMENTO FINAL		22 30 20 30	
ALIMENTO INGERIDO	43 15 10 10 4		
ALIMENTO ACUMULATIVO	43 58 68 78 82		
OBSERVACIONES: murió el 30 de octubre			
TOTAL: peso final 38g, incremento en peso 82g, alimento ingerido 82g			

RATA 7 PESO INICIAL 44g		CUADRO 35	
TIEMPO (días)	1 4 6 8 10 12		
PESO ANIMAL	44	43 39	38
INCREMENTO ACUMULATIVO		-1 -5	-6
ALIMENTO INICIAL	50	41 36 34 34	
ALIMENTO FINAL		7 18 16 10 21	
ALIMENTO INGERIDO	43 23 20 24 21		
ALIMENTO ACUMULATIVO	43 66 86 110 118		
OBSERVACIONES: murió el 31 de octubre			
TOTAL: peso final 38g, incremento en peso -6g, alimento ingerido 118g			

ATA 8 PESO INICIAL 44g		CUADRO 36	
TIEMPO (días)	1 4 6		
PESO ANIMAL		41	
INCREMENTO ACUMULATIVO		-3	
ALIMENTO INICIAL	50	32	
ALIMENTO FINAL	2	12	
ALIMENTO INGERIDO	48	20	
ALIMENTO ACUMULATIVO	48	50	
OBSERVACIONES: murió el 16 de octubre			
TOTAL: peso final 41g, incremento en peso -3g, alimento ingerido 68g.			

ATA 9 PESO INICIAL 53g		CUADRO 37	
TIEMPO (días)			
PESO ANIMAL	53		
INCREMENTO ACUMULATIVO			
ALIMENTO INICIAL	50		
ALIMENTO FINAL			
ALIMENTO INGERIDO			
ALIMENTO ACUMULATIVO			
OBSERVACIONES: murió el 25 de octubre (antes de la primera pesada)			

ATA 10 PESO INICIAL 53g		CUADRO 38											
TIEMPO (días)	1 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26												
PESO ANIMAL		52.5	52.5		55		48		50	51.5	57	54	
INCREMENTO ACUMULATIVO		40.5	-0.5		2		-5		-3	-0.5	-1	1	
ALIMENTO INICIAL	50	40	22	26	28	32	34	38	26	33	32	44	
ALIMENTO FINAL	8	0	12	10	16	16	0	12	5	8	8	32	
ALIMENTO INGERIDO	42	40	10	16	12	16	34	26	21	25	26	12	
ALIMENTO ACUMULATIVO	42	82	92	108	120	136	170	196	217	242	268	280	
OBSERVACIONES: ninguna													
TOTAL: peso final 54g. incremento en peso 1g, alimento ingerido 280g.													

RATA 11		PESO INICIAL 45g		CUADRO 35	
TIEMPO (días)		4	5	6	8
PESO ANIMAL			40	36	
INCREMENTO ACUMULATIVO			-5	-9	
ALIMENTO INICIAL	50		56	48	
ALIMENTO FINAL		23	24	34	
ALIMENTO INGERIDO		27	32	14	
ALIMENTO ACUMULATIVO		27	56	73	
OBSERVACIONES: murió el 27 de octubre					
TOTAL: peso final 36g, incremento en peso -9g, alimento ingerido 73g.					

RATA 12		PESO INICIAL 46g		CUADRO 40	
TIEMPO (días)		5	8		
PESO ANIMAL			44	43	
INCREMENTO ACUMULATIVO			-2	-3	
ALIMENTO INICIAL	50		56	48	
ALIMENTO FINAL		12	22	32	
ALIMENTO INGERIDO		38	34	2	
ALIMENTO ACUMULATIVO		38	72	74	
OBSERVACIONES: murió el 31 de octubre					
TOTAL: peso final 43g, incremento en peso -3g, alimento ingerido 74g.					

DIETA: Cusefna (de referencia)

RATA 1 PESO INICIAL 50g														CUADRO 41
TIEMPO (dias)	1	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	
PESO ANIMAL		72	83		95		107		117	125	134	140		
INCREMENTO ACUMULATIVO		22	33		45		57		67	75	84	90		
ALIMENTO INICIAL	50	54	30	46	35	46	62	30	46	46	48	50		
ALIMENTO FINAL		30	26	32	20	30	30	16	12	20	10	14		
ALIMENTO INGERIDO		48	24	4	14	12	16	32	14	34	26	38	36	
ALIMENTO ACUMULATIVO		48	72	76	90	102	118	150	164	198	224	262	298	
OBSERVACIONES: ninguna														
TOTAL: peso final 298g, incremento en peso 90g, alimento ingerido 298g.														

RATA 2 PESO INICIAL 92g														CUADRO 42
TIEMPO (dias)	1	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	
PESO ANIMAL		68	75		85		91		96	106	110	117		
INCREMENTO ACUMULATIVO		16	32		33		39		44	54	58	65		
ALIMENTO INICIAL	50	36	36		46		44		64	40	46	46	50	
ALIMENTO FINAL		16	17.5	25	36	24	32	40	28	15	34	22	22	
ALIMENTO INGERIDO		34	19.5	11	10	12	12	24	12	26	12	28	32	
ALIMENTO ACUMULATIVO		34	52.5	63.5	73.5	85.5	97.5	121.5	133.5	159.5	171.5	199	231	
OBSERVACIONES: ninguna														
TOTAL: peso final 117g, incremento en peso 65g, alimento ingerido 231g.														

RATA 3 PESO INICIAL 47g														CUADRO 43
TIEMPO (dias)	1	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	
PESO ANIMAL	47	62	68.7		75		77		82	90	96	102		
INCREMENTO ACUMULATIVO		15	21.7		28		30		35	43	49	55		
ALIMENTO INICIAL	50	44	34	38	28	40	54	35	42	42	46	38		
ALIMENTO FINAL		14	26	24	28	20	32	35	24	18	30	20	10	
ALIMENTO INGERIDO		36	18	10	10	8	8	19	11	24	12	25	28	
ALIMENTO ACUMULATIVO		36	54	64	74	82	90	109	120	144	156	182	210	
OBSERVACIONES: ninguna														
TOTAL: peso final 102g, incremento en peso 55g, alimento ingerido 210g.														

RATA 4 PESO INICIAL 48g				CUADRO 44
TIEMPO (días)	1	4	6	
PESO ANIMAL			40	
INCREMENTO ACUMULATIVO			-8	
ALIMENTO INICIAL	50		56	
ALIMENTO FINAL		30		
ALIMENTO INGERIDO		20		
ALIMENTO ACUMULATIVO		20		
OBSERVACIONES: murió el día 27 de octubre				
TOTAL: peso final 40g, incremento en peso -8g, alimento ingerido 70g.				

RATA 5 PESO INICIAL 45g											CUADRO 45		
TIEMPO (días)	1	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26
PESO ANIMAL			72	81		90		96		104	113	122	124
INCREMENTO ACUMULATIVO			23	32		41		47		55	64	73	85
ALIMENTO INICIAL	50		38	32	28	40	48	52	28	36	36	38	51
ALIMENTO FINAL		4	16	18	20	28	32	28	14	10	22	15	28
ALIMENTO INGERIDO		40	22	14	8	12	16	24	14	16	14	23	23
ALIMENTO ACUMULATIVO		46	38	52	60	72	88	112	126	152	166	189	212
OBSERVACIONES: ninguna													
TOTAL: peso final 124g, incremento en peso 85g, alimento ingerido 212g.													

RATA 6 PESO INICIAL 41g				CUADRO 46
TIEMPO (días)	1	4	6	
PESO ANIMAL			37	
INCREMENTO ACUMULATIVO			-4	
ALIMENTO INICIAL	50		26	
ALIMENTO FINAL		24		
ALIMENTO INGERIDO		24		
ALIMENTO ACUMULATIVO		24		
OBSERVACIONES: murió el 27 de octubre				
TOTAL: peso final 37g, incremento en peso -4g, alimento ingerido 24g.				

RATA 7		PESO INICIAL 66g											CUADRO 47
TIEMPO (días)	1	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26
PESO ANIMAL	46	59	65		73			82		88	95	102	110
INCREMENTO ACUMULATIVO		13	22		27			36		42	49	56	64
ALIMENTO INICIAL	50	46	44	40	42	32	44	22	32	32	38	45	
ALIMENTO FINAL		14	30	34	30	32	22	22	12	10	20	11	24
ALIMENTO INGERIDO		36	16	10	10	10	10	22	10	22	12	27	25
ALIMENTO ACUMULATIVO		36	52	62	70	82	92	114	124	146	158	185	210
OBSERVACIONES: ninguna													
TOTAL: peso final 110g, incremento en peso 64g, alimento ingerido 210g.													

RATA 8		PESO INICIAL 57g											CUADRO 48
TIEMPO (días)	1	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26
PESO ANIMAL	57	78	88		94			104		112	118	128	136
INCREMENTO ACUMULATIVO		21	31		37			47		55	61	71	79
ALIMENTO INICIAL	50	38	38	40	44	42	52	22	30	30	48	66	
ALIMENTO FINAL		2	16	24	28	32	28	22	8	0	28	10	48
ALIMENTO INGERIDO		48	22	14	12	12	14	30	0	38	18	38	18
ALIMENTO ACUMULATIVO		48	70	84	96	108	122	152	166	196	198	236	254
OBSERVACIONES: ninguna													
TOTAL: peso final 136g, incremento en peso 79g, alimento ingerido 254g.													

RATA 9		PESO INICIAL 44g											CUADRO 49
TIEMPO (días)	1	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26
PESO ANIMAL	44	72	82		92			100		110	113	122	126
INCREMENTO ACUMULATIVO		28	38		48			56		66	69	78	83
ALIMENTO INICIAL	50	32	32	38	46	44	56	30	34	50	54	54	
ALIMENTO FINAL		3	10	20	26	34	31	30	16	6	28	34	30
ALIMENTO INGERIDO		47	22	12	12	12	13	26	14	28	6	16	23
ALIMENTO ACUMULATIVO		47	69	81	93	105	118	144	158	186	192	208	228
OBSERVACIONES: ninguna													
TOTAL: peso final 126g, incremento en peso 82g, alimento ingerido 228g.													

RATA 10	PESO INICIAL 42g												CUADRO 50
TIEMPO (días)	1	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26
PESO ANIMAL	42	63	73		80		91		95	102	112	122	
INCREMENTO ACUMULATIVO			21	31	38		49		53	60	70	80	
ALIMENTO INICIAL	50		35	35	41	37	37	47	23	27	27	43	42
ALIMENTO FINAL		9	14	21	31	27	25	23	11	1	21	16	20
ALIMENTO INGERIDO		41	21	14	10	10	12	24	12	26	6	25	22
ALIMENTO ACUMULATIVO		41	62	76	86	96	108	132	144	170	176	201	223
OBSERVACIONES: ninguna													
TOTAL: peso final 102g, incremento en peso 80g, alimento ingerido 223g.													

RATA 11	PESO INICIAL 54g												CUADRO 51
TIEMPO (días)	1	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26
PESO ANIMAL	54	74	83		89		97		104	110	84	106	
INCREMENTO ACUMULATIVO			20	29	35		43		50	56	30	52	
ALIMENTO INICIAL	50		38	38	38	42	46	56	34	40	40	46	37
ALIMENTO FINAL		8	17	26	30	34	36	34	22	16	30	12	1
ALIMENTO INGERIDO		42	21	12	8	8	10	22	12	24	10	34	31
ALIMENTO ACUMULATIVO		42	63	75	83	91	101	123	135	159	169	103	234
OBSERVACIONES: ninguna													
TOTAL: peso final 106g, incremento en peso 52g, alimento ingerido 234g.													

RATA 12	PESO INICIAL 43g												CUADRO 52
TIEMPO (días)	1	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26
PESO ANIMAL	43	57	63		70		81		86	94	132	108	
INCREMENTO ACUMULATIVO			14	20		27		38		43	51	69	65
ALIMENTO INICIAL	50		49	38	48	38	44	52	32	36	36	46	44
ALIMENTO FINAL		18	28	38	28	34	34	20	12	28	28	20	16
ALIMENTO INGERIDO		32	16	10	10	10	10	20	12	24	8	26	28
ALIMENTO ACUMULATIVO		32	48	58	68	78	86	108	120	144	152	170	206
OBSERVACIONES: ninguna													
TOTAL: peso final 108g, incremento en peso 65g, alimento ingerido 206g.													



Cuadro 53. Contenido de proteína en las heces de las ratas alimentadas con biomasa microbiana.

Dieta	% de proteína
Biomasa sin saborizante	11.2070 $\pm$ 0.1324
Biomasa con saborizante	10.250 $\pm$ 0.7813

Cuadro 54. Análisis de varianza para determinar la diferencia significativa entre el alimento consumido por las ratas para las dietas de biomasa microbiana con y sin saborizante.

	G.L	S.C	S.C.M	F <sub>cal.</sub>	F <sub>teo.</sub>
Muestra	1	0.05311	0.05312	3.40	18.51
Error	2	0.03128	0.01564		
Total	3	0.08440			

F calculada  $\ll$  F teórica  $\therefore$  no hay diferencia significativa en el consumo de alimento con y sin saborizante.

## BIBLIOGRAFIA

- Abrams, J. F. 1974. *Nutrición Animal y Dietética Veterinaria*. Pp. 161-162, 177-180, 192, 195-210. 4a. Edición. Editorial Acribia. Zaragoza, España.
- Alvarez, A.; Escárrega, C.; Lucario, S. S.; Pulido, R. y Durán de Bazúa, C. 1985. Secado de biomasa microbiana obtenida del tratamiento biológico de efluentes de la industria alimentaria para el uso en alimentos balanceados. Presentado en el XVI Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos. 1-4 octubre México, D.F.
- A.O.A.C. 1975. *Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemists*. 12a. Edición. Washington, D.C.
- Bárcano, G. E. 1982. Algunas consideraciones en la producción y uso de proteína unicelular. Pp. 2-23. En Cuadernos de Posgrado. División de Estudios de Posgrado, Departamento de Alimentos. Facultad de Química, UNAM. México, D.F.
- Beaton, H. G. 1974. *Nutrition*. Pp. 129-131, 148-151, 148-151. Vol. 1 Academic Press. New York.
- Bewersdorff, M.; Dostálek, M. 1971. The Use of Methane for Production of Bacterial Protein. *Biotechnology and Bioengineering*. XIII: 49-62.

Brande, I.A. 1984. *Microbiologia Clínica*. Pp. 66, 317-318, 360, 365-367. Editorial Panamericana. México, D.F.

Campbell, J.H. 1963. *Method for Determination of PER and NPU. Evaluation of Protein Quality*. National Academic of Science. National Research Council. Washinton, D.C. Publicatio

Civit, E.; Durán de Bazúa. C.; Engelman, G.; González, S. y Hartmann L. 1984. *Anaerobic treatment of maize processing wastewater (nejayote) in a packed bed reactor cascade*. *Environm. Technol. Letters*, 5(2):48-96.

Clifford, J.A. 1986. *Food Analysis*. Cap. 1 p. 1-30. *The Whole Animal as an Analytical Tool*. (Eds.) Greunwendel, W.D. and Whitaker, R.J. 18a. Edition. Vol. 3. Mariel Dekker. New York.

Cooney, G.L.; Levine, D.W. 1972. *Microbial Utilization of Methanol*. *Adv. Appl. Microbiology*. 15:356-364.

Cowan, S.T.; Steel, K.J. 1979. *Manual para la identificación de bacterias*. Pp. 31, 22-225, 2a. Edición. Editorial Continental S.A. México, D.F.

Crawford, D.L.; McCoy, E.; Harkin, J.M.; Jones, P. 1973. *Production of microbial protein from waste cellulose by Thermoconospora fusca, a thermophilic actinomycete* *Biotechnology and Bioengineering* 15(5):833-843.

- Durán de Bazúa, C.; Hartmann, L. 1980. Produktion and Verwertbarkeit von Biomasse aus Prozessabwasser der Nixtmalizacion. Diss. Abschlussber. Intls. Seminar Forsch. u. Lehre in Chemieingenieurwesen. Pp. 214-232. Universität Karlsruhe, R.F.A.
- Durán de Bazúa, C. 1983. Biologische Reinigung von Prozessabwässern aus der Maisverarbeitung. Zur Erlangung des Akademisches Grades eines Dokton-Ingenieurs der Fakultät für Bauingenieur- und Vermessungswesen. Universität Karlsruhe, RFA.
- Eggum, B.O. 1968. Nutritional evaluation of proteins by laboratory animals. Pp. 117-127. En Evaluation of Novel Protein Products. (Eds.) Bender, A.E.; Kihlberg, R.; Löfqvist, B.; Munch, L. Vol. 14. Pergamon Press, Hungary.
- Eneko, L. 1968. Single-Cell protein. Pp. 93-103. En Evaluation of Novel Protein Products. (Eds.) Bender, A.E.; Kihlberg, R.; Löfqvist, B.; Munch, L. Vol. 14. Pergamon Press, Hungary.
- Entola, R.J; Mazza, L.A. and Balatti, A.P. 1969. Composition of Cell Material and Biological Value of the Cellular Protein of a Micrococcus strain Grown on Hydrocarbon. Biotechnology and Bioengineering. XI:409-476.
- Escárcega, C.A. y Pulido, R. 1986. Modelo cinético para un reactor biológico rotatorio usado en el tratamiento aerobio de efluentes. Tesis Licenciatura. Facultad de Química. UNAM, México, D.F.

- Foster, J.F.; Litchfield, J.H. 1964. A continuous culture apparatus for the microbial utilization of hydrogen produced by electrolysis of water in closed-cycle space systems. *Biotechnology and Bioengineering*, 6:441-456.
- Ginón, M.F. 1972. *La célula. Tópicos acerca de su estudio*. Pp. 16-21. 1a. Edición. Editorial Alhambra Mexicana. México, D.F.
- González, M.S. 1983 *Estudio de la tratabilidad de los desechos líquidos del proceso de nixtamalización. Informe del proyecto 3303. Instituto de Ingeniería. UNAM. México, D.F.*
- Gutiérrez, R.A. y Méndez, C.F. 1980. Aislamiento e identificación de Bacillus cereus en alimentos hidratados. Tesis Licenciatura. Facultad de Química, UNAM. México, D.F.
- Harper, A.H. 1978. *Química Fisiológica*. Pp. 135-145. Editorial, El Manual Moderno. México, D.F.
- Hedenskog, G.; Mogren, H.; Enebo, L. 1969. A method for Obtaining Protein Concentrates from Microorganism. *Biotechnology and Bioengineering*, XII:947-954.
- Herbert, D.; Phipps, P.J.; Strange, R.E. 1971. Chemical Analysis of Microbial Cells. *Methods Microbiol.* 5B:209-344.
- Jawetz, E. 1983. *Microbiología Moderna*. pp. 23, 148, 193-196, 232, 239 10a. Edición. Editorial El Manual Moderno. México, D.F.

- Juy, J.M. *Microbiología Moderna de los Alimentos*. pp. 232-243. Editorial Acribia. Zaragoza, España.
- Jones, A. 1974. *World Protein Resources*. John Wiley & Sons. New York.
- Kihlberg, R. 1972. The microbe as a source of food. *Annual Review of Microbiology*. 26:247-466.
- Lazreaga, R.S. 1976. Possible toxicity of non-traditional protein foods. *Tecnología de Alimentos (Méx.)* 11(5): 230, 232-236.
- Levi, J.D.; Shennan, J.L y Ekton, G.D. 1979. Biomass From Liquid n-alkanes. Cap. 12, pp. 392-401. En *Microbial Biomass*. (Eds.) Rose, A.H. Vol. 4. Academic Press, New York.
- Luna-Palcello, V.M. 1987. Estudio de los protozoarios ciliados presentes en un sistema de tratamiento por medio de "Biodiscos". *Tesis Licenciatura*. Facultad de Ciencias. UNAM. México, D.F.
- Marmolejo, C.; González, S. 1984. Tratamiento de aguas de desecho de la industria nixtamalizadora en un reactor anaerobio empacado. Informe del proyecto 2415. Instituto de Ingeniería UNAM. México, D.F.
- Marmolejo, C. 1984. Estudio de los subproductos del metabolismo anaerobio durante el tratamiento de aguas de desecho de la industria nixtamalizadora. *Tesis Licenciatura*. Facultad de Química, UNAM. México, D.F.

- Miller, D.S. 1963. A procedure for determination of NPU using rats Body. N. Technique. Evaluation of Protein Quality and Research. Council, Washington. D.C. Pub. 1100.
- Montesinos, A.; Durán de Bazúa, C. 1986. Estudio dinámico de un reactor biológico en la producción de proteína microbiana. Presentado en el XVII Congreso de la ATAM. Cholula, Puebla. México,
- Monroy, H.O.; Viniegra, G.G. 1981. Biotecnología para el aprovechamiento de los desperdicios orgánicos. Cap. 3. pp. 177-187. (Eds.) Quinteno, R. AGT Editor. México, D.F.
- National College of Food Technology. 1982. Aislamiento e identificación de bacterias patógenas. Universidad de Reading. U.S.A.
- Pedroza Islas, R. 1985. Estudio de la degradación biológica aerobia de los efluentes de la nixtamalización. Tesis de Maestría. Universidad Iberoamericana. México, D.F.
- Pedroza de Brenes, R. y Durán de Bazúa, C. 1985. Producción de proteína unicelular de desecho (PUCD) a partir de efluentes de la industrialización del maíz para consumo humano. Tecnología de Alimentos (Méx.) 20(6): 3-11.
- Saldana, V. 1987. Comparación química y biológica de mezclas de maíz y sorgo nixtamalizadas y extruidas. Tesis Licenciatura. Facultad de Química, UNAM. México, D.F.

Stevens, C.M.; Hanpen, P.E.; Gigger, P.P. 1951. Occurrence of D-aminoacids in some natural materials. *J. Biol. Chem.* 190:705-710.

Senz, J.C. 1972. *Protein from hydrocarbons*. Academic Press, London.

Tannenbaum, S.R.; Miller, S.A. 1967. Effect of Cell Fragmentation on Nutritive Value of Bacillus magisterium Protein. *Nature*. 214(17):1261-1262.

Wilson, J.B. and Wallace, H.A. 1973. Toxicants occurring naturally in foods. Cap. 18 pp. 372-411. In *Microbial Toxins*. (Eds.) National Academy of Sciences. 2a. Edition. Washington, D.C.