

#### 4.7.2 Tasa de crecimiento

Los resultados del bioensayo de crecimiento se presentan en la fig.37, donde se muestran el peso de los camarones a través de las siete semanas de evaluación.

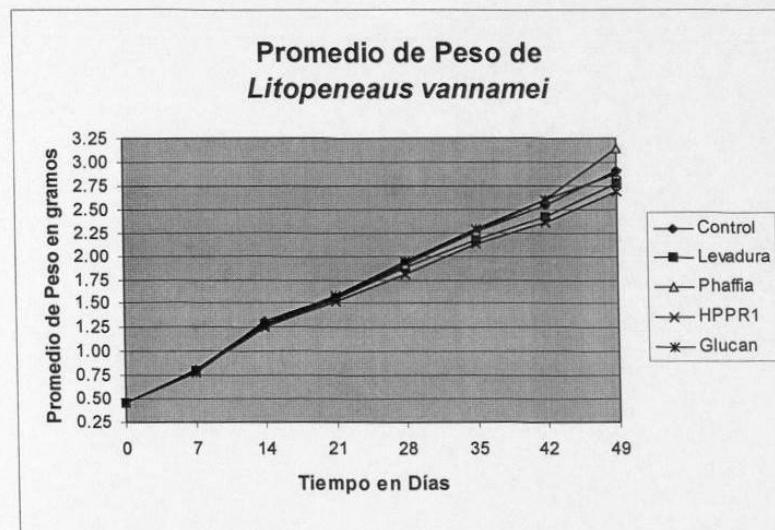


Figura 37.- Promedio de peso de *Litopeneaus vannamei*.

Los análisis estadísticos en los diferentes tratamientos no muestran diferencias significativas ( $P=0.196$ ) en el peso de los camarones después de siete semanas. La biomasa total, por otro lado, fue significativamente afectada ( $P=0.043$ ); los animales con tratamiento de *Phaffia* mostraron más alta biomasa después de las siete semanas del tratamiento que aquellos alimentados con  $\beta$ -glucano, pero no cuando se compararon con los de control y con los otros dos tratamientos (fig. 38).

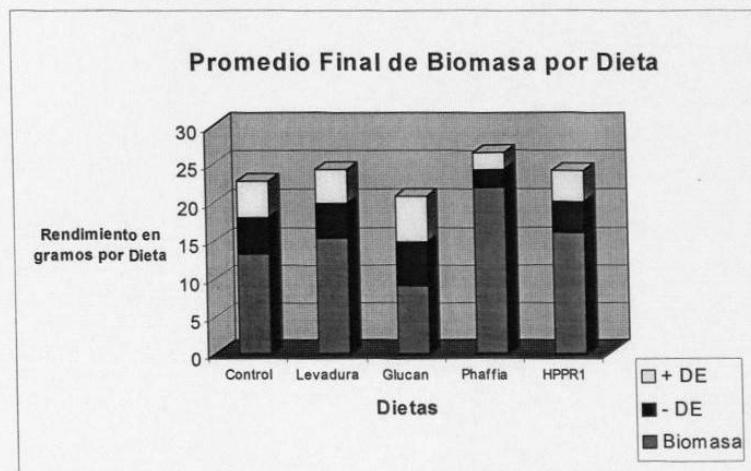


Figura 38.- Promedio final de biomasa de cada dieta.

#### 4.7.3 Tasa de conversión alimenticia

No se encontraron diferencias significativas ( $P=0.233$ ) entre las dietas en cuanto a la tasa de conversión; aún así, la mejor corresponde a la *Phaffia*, la siguen la HPPR1, Control, la *Saccharomyces* y por último la de  $\beta$ -glucano (fig. 39).

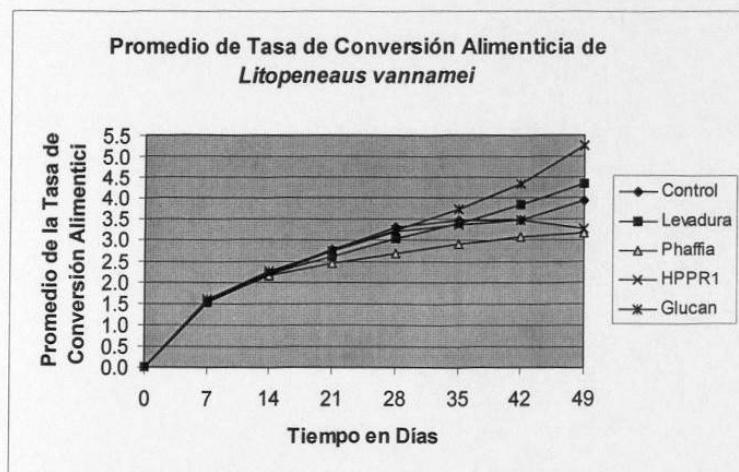


Figura 39.- Promedio de tasa de conversión alimenticia *L.vannamei*

#### 4.7.4 Tasa de sobrevivencia

La sobrevivencia fue significativamente afectada ( $P=0.049$ ), en los *Litopenaeus vannamei* alimentados con la dieta que contenía *Saccharomyces cerevisiae*, *Phaffia rhodozyma* y la biomasa pigmentada HPPR1, con tasas mayores (71.25%, 77.5% y 76.7% respectivamente), que los camarones alimentados con la dieta que contenía  $\beta$ -glucano (47.5%), pero no a comparación de los animales alimentados con la dieta control (56.25%) (fig. 40).

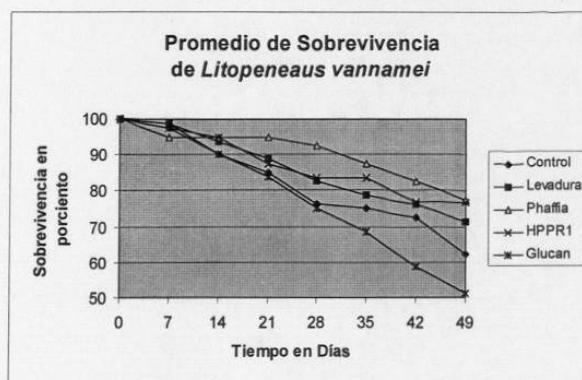


Figura 40.- Promedio de sobrevivencia de *L. vannamei*

#### 4.7.5 Actividad de la fenoloxidasa

Grandes variaciones se han encontrado para la actividad de la fenoloxidasa de los animales en todas sus dietas excepto para los animales alimentados con la dieta de *Phaffia*, la cual tuvo los valores más bajos y uniformes que todos, con valores significativamente más bajos ( $P=0.003$ ) que los de la dieta control, así como las dietas con *Saccharomyces cerevisiae* y la dieta con biomasa pigmentada HPPR1, pero no los de la dieta con  $\beta$ -glucano.

Los valores para la dieta de  $\beta$ -glucano aunque también eran generalmente superiores como los de la dieta de la *Phaffia*, pero no a un nivel estadísticamente significativo, principalmente debido a la gran variedad de las lecturas individuales.

Los resultados de la actividad de la fenoloxidasa, para los *Litopenaeus vannamei*, se muestran en la fig. 41.

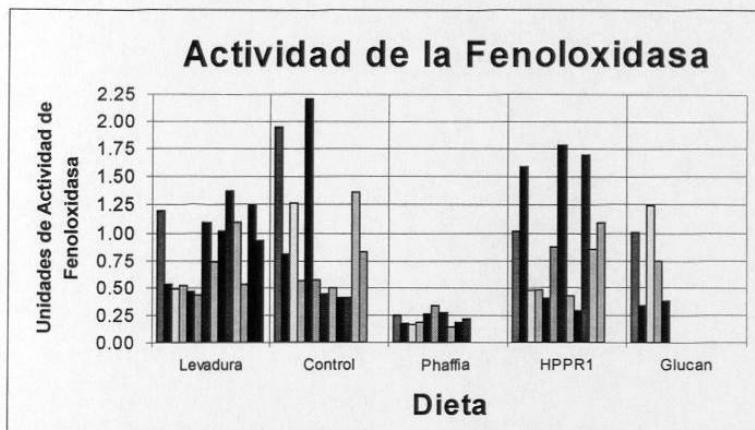


Figura 41.- Actividad de la fenoloxidasa en *L. vannamei*

#### 4.7.6 Eliminación bacterial

La gráfica muestra los resultados de la eliminación de bacterias de la hemolinfa de los camarones después de estimularlos con el patógeno *V. harveyi* cepa BP05, de cuatro

replicados de diez camarones. Los resultados son variables y difieren entre animales individuales utilizando el mismo tratamiento, pero hay una tendencia a reducir el número a través del tiempo para todos los tratamientos, baja el nivel base de 0 a  $10^2$  UFC/ml en la hemolinfa, detectadas en los camarones control no estimulados (fig. 42).

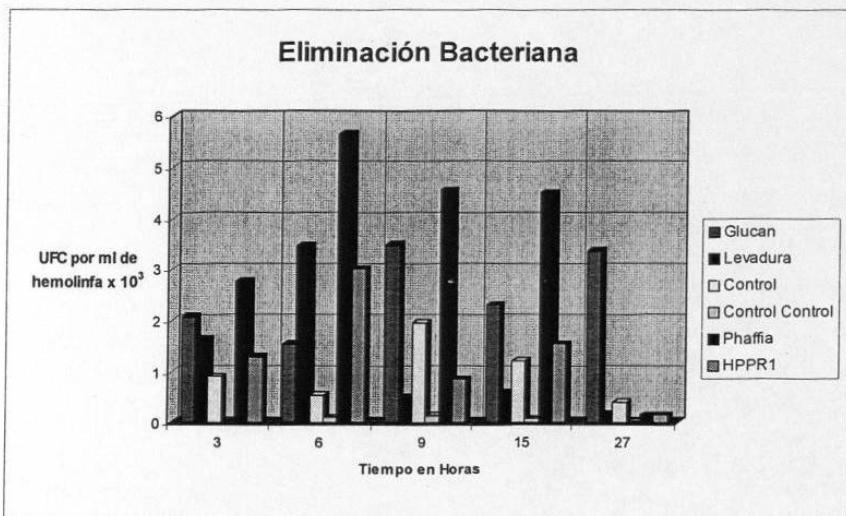


Figura 42.- Eliminación bacterial en *L. vannamei*

Después de 15h de la inmersión no se encontraron diferencias significativas para cualquiera de las dietas ( $P=0.346$ ), cuando se compararon los camarones con la dieta control o los de control-control no estimulados.

Ánálisis estadísticos de los datos no fueron posibles a las 27 h después de la inmersión, debido a varias muertes ocurridas a los camarones con el tratamiento de b-glucano, quedando únicamente dos camarones del tratamiento para muestra.

---

## **V. DISCUSIÓN**

### ***Etapa I - Producción de biomasa pigmentada***

Un proceso de fermentación comprende, además de las reacciones bioquímicas efectuadas por un microorganismo y/o por enzimas, las características físicas y de operación del recipiente donde se va a realizar el proceso y las operaciones que se efectúan antes y después de la fermentación.

La determinación de la demanda de oxígeno,  $N_a$ , se efectúa para conocer la capacidad del bioreactor; para satisfacer la demanda biológica de oxígeno a través de un sistema de agitación y aereación, se debe realizar antes de la fase estacionaria donde existe la máxima cantidad de células y corresponde al coeficiente de transferencia de oxígeno,  $K_{la}$ , el cual se mide a distintos tiempos y flujos de alimentación (Taguchi, *et al.*, 1966). Ambos datos son básicos para efectuar su escalamiento y aumentar la producción de biomasa (Wang, 1979).

La viscosidad del medio varía con la forma de la levadura, ya sea oval o micelar (líquido no newtoniano), esta última aumentará la demanda de oxígeno (Aiba, 1973b).

La temperatura, el pH, además de la presión del aire y la velocidad de agitación del fermentador aeróbico darán la concentración de oxígeno disuelto necesario (Nagai, 1978). También el uso de antiespumantes, el diseño del reactor, su capacidad, el tipo, número y posición de propelas deben de ser considerados (Lee, 1992).

Los procesos de fermentación se desarrollan con tres diferentes técnicas; uno es el cultivo en lote (batch), el cual utiliza un reactor hasta que los micronutrientes se agotan; otro es el cultivo semi-continuo, en el cual se agregan nutrientes al reactor durante el proceso, previa eliminación de una parte del medio de cultivo; y por último el cultivo continuo, en el cual antes de la fase estacionaria (al llegar al 80% de la fase exponencial), se agregan nutrientes al reactor y a la misma velocidad se elimina la cantidad añadida.

El cultivo continuo aeróbico, permite mantener la población de microorganismos en constante crecimiento exponencial por largos períodos (Crueger, 1990a); por ello, durante el proceso existen diversas variables que son importantes de controlar; el flujo constante de nutrientes es una de estas variables, ya que su concentración en el medio de cultivo será proporcional a la velocidad de crecimiento de los microorganismos.

---

Los microorganismos involucrados se identificaron y caracterizaron por la MC Jovita Martínez Cruz (CINVESTAV-IPN). El basidiomiceto *Phaffia rhodozyma* es un hongo levaduriforme productor de pigmentos en especial la astaxantina está se puede producir en más de un 90% de los de carotenos totales. Johnson y Ar, 1991 reportan en cepas cultivadas de 3000 a 8000 ppm. Por su dimorfismo se puede pensar en un hongo filamentoso del género *Penicillium* o bien en una levadura del grupo de los ascomicetos en particular el género *Saccharomyces*. El primero se diferenció por la producción de conidióforos y el segundo por las ascosporas.

El hongo filamentoso *Penicillium sp.* y la bacteria *Pseudomonas sp.* crecen a pH ácidos de 3 a 5 al igual que las levaduras. En los productos comerciales de *Phaffia rhodozyma* de las empresas Igene, Merck o Red Star reportan en su análisis microbiológico la presencia de hongos, levaduras y bacterias. Estos pueden estar presentes como contaminantes del producto terminado, ó bien forman parte del cultivo mixto, pues todos tienen la capacidad de producir pigmentos o bien sus precursores, ya que la asociación entre los miembros de este cultivo es de tipo positiva y/o beneficiosa, y puede ser mutualista, en la cual todas las especies resultan beneficiados con esa asociación, o comensalista, en la cual alguna o algunas de las especies se benefician y las otras simplemente no se ven afectadas.

Un proceso de fermentación comprende, además de las reacciones bioquímicas efectuadas por un microorganismo y/o por enzimas, las características físicas y de operación del recipiente donde se va a realizar el proceso y las operaciones que se efectúan antes y después de la fermentación.

La preparación de la semilla o inóculo fue de importancia vital, para asegurar que el cultivo microbiano en el momento de inocular el reactor, contenga una fisiología microbiana cuando menos al 80% de la fase exponencial, esto se alcanzó primero en un medio enriquecido y posteriormente traspasado a I medio mineral hasta obtener pigmentación aproximadamente 50 h; completándose en ambos pasos un total de 70 a 90 h (Crueger, 1990b).

El acetato de amonio utilizado como reactivador de las cepas participó en la biosíntesis de los productos intermedios principalmente en el mevalonato, este constituye la primera reacción para la ramificación del isopreno, que pasa a el farnesil pirofosfato, antecesor del geranigeranil pirofosfato (GGPP) y dos moléculas de este forman el fitoeno, es un compuesto que fluoresce al UV y que forma parte de todas las moléculas C40 de los organismos carotenogénicos (Meyer, 1994).

La optimización del medio de cultivo a través del método Simplex modificado con una plantilla de 8 experimentos demostró en general un proceso estable y las condiciones que se establecieron cubrieron las necesidades de la fisiología de los microorganismos involucrados en la producción de pigmentos. Ya que el diseño de Plackett- Burmann permitió observar ligeros o no efectos sobre las respuestas de los factores probados.

---

Meyer y col. (1993) han trabajado sobre el desarrollo de medios químicamente definidos que soporten una rápida y extensiva formación de pigmento en microorganismos tales como *Phaffia rhodozyma*, *Monascus sp.* y el alga azul verde *Haematococcus pluvialis*, debido a los problemas de Regulación de Pigmentos que se han presentado en la mayoría de estos estudios, se requiere de un medio de cultivo que proporcione de una base para el estudio de la biosíntesis de pigmentos y su regulación.

Las cinéticas de crecimiento obtenidas de la primera plantilla mostraron alrededor de las 50 h un equilibrio y con valores de densidad óptica a la mitad del inicio del cultivo, debido a alta tasa de dilución, que en nuestro estudio fue el de mayor influencia directa en la producción de biomasa seguida de la de pigmentos.

Por otra parte la calidad y cantidad de los ingredientes afecta de manera significativa todo el comportamiento de los microorganismos (crecimiento, rendimiento, productividad, formación de metabolitos), sin olvidar que afecta los costos de producción también. Por lo tanto, las compañías que se dedican a procesos de fermentación están continuamente tratando de mejorar las formulaciones de sus medios de cultivo, debido a que las cepas y las mutantes, que también se están introduciendo continuamente, podrían requerir sus propios medios de crecimiento (Lin, 1993).

Un gran número de autores ha sugerido medios de cultivos para una producción alta de carotenoides microbianos. Generalmente, los medios proporcionan la fuente de C, a partir de carbohidratos: dextrosa, celobiosa, sacarosa, maltosa y jugo de frutas, pero con estos se pueden presentar el efecto Crabtree, de inhibición por altas concentración. En el presente trabajo se utilizó el alcohol etílico sintético por ser una fuente de carbono económica y de composición estable (Simpson, 1990).

La fuente de nitrógeno tiene mayor efecto sobre la producción de pigmento que la fuente de carbono. La proporción C/N de 5:1 se mantuvo durante el proceso aún y cuando se eliminó el cloruro de amonio participaron las de fuente de nitrógeno orgánico presente en las levaduras, aminoácidos y la previa formación del acetato de amonio (Crueger 1990b).

La biosíntesis de pigmentos se observó a través de las cinéticas de crecimiento desde el inicio del cultivo continuo (15 h) por la formación de precursores, tales como, aldheidas beta- inona por la percepción de aromas frutales y de acetatos por la formación de ácido acético y en consecuencia la demanda de adicción del hidróxido de sodio . Sin embargo la pigmentación se obtuvo en la fase exponencial, entre las 70- 100 h de haber iniciado el cultivo intermitente (0 h) y este correspondió a un metabolito secundario

Los elementos traza son estimulantes para el crecimiento y la formación de pigmento debido a que las enzimas que intervienen en su biosíntesis requieren estos iones divalentes para su activación. El mecanismo sugerido es que estos iones rompen el enlace del geranil-geranil pirofosfato para convertirlo en fitoeno . Además, se han reportado trabajos realizados

---

con *Monascus* (Lin, 1991) en donde concentraciones muy bajas (alrededor de 0.09 mM), incrementan la producción de pigmento. Por esto a pesar de eliminar los minerales no se observaron efectos debido a que a nivel trazas están presentes en las sales del medio mineral.

En los tratamientos 3, 9, 10, 11 y 13 se obtuvieron la mayor pigmentación y también la formación de micelio debido a que la biosíntesis es inducida por el estrés por trabajar en rangos cercanos a la  $\mu_{max}$  de 0.16. Los valores de  $\mu$  (velocidad específica de crecimiento) o bien la tasa de dilución ( $D$ ) al iniciar el cultivo continuo tienen un rango de trabajo óptimo de 0.05 - 0.15. Así para los tratamientos más cercanos a 0.15 propician la formación de pigmento, y entre más se alejen del valor de 0.15, la probabilidad de presentar pigmentación disminuye considerablemente hasta no presentarse en absoluto, esto se debe a que se origina el lavado celular en el reactor (Aiba, 1973b).

En los tratamientos 3, 10 y 13 la pigmentación se presentó únicamente sobre la superficie de la espuma, por la falta de oxígeno disuelto y/o bien la presencia de acetaldehido, acumulado probablemente por la inhibición de enzimas del metabolismo del alcohol etílico. Por otra parte podría ser indicativo de que se requiere aumentar los tiempos de estancia disminuyendo el flujo de alimentación.

Además es de interés hacer notar que la adicción del LRM contribuyó en gran parte de los principales precursores del mevalonato como son glucosa, acetato, leucina. Puesto que la ruta metabólica se inicia con la glucosa formando, piruvato por medio de glucólisis, y a partir de este se forma el Acetil coenzima A, para después iniciar con la ruta metabólica de los terpenos. Por otra parte la presencia de fitoeno, beta-carotenos, zeaxantina y otros carotenos no identificados a reducirían el proceso.

La determinación de la demanda de oxígeno,  $N_d$ , se efectúa para conocer la capacidad del bioreactor; para satisfacer la demanda biológica de oxígeno a través de un sistema de agitación y acreación, se debe realizar antes de la fase estacionaria donde existe la máxima cantidad de células y corresponde al coeficiente de transferencia de oxígeno,  $K_La$ , el cual se mide a distintos tiempos y flujos de alimentación (Taguchi, *et al.*, 1966). Ambos datos son básicos para efectuar su escalamiento y aumentar la producción de biomasa (Wang, 1979). El mejor coeficiente de transferencia de oxígeno  $K_La$ , correspondió al tratamiento once.

La viscosidad del medio varía con la forma de la levadura, ya sea oval o micelar (líquido no newtoniano), esta última aumentará la demanda de oxígeno (Aiba, 1973b).

La temperatura, el pH, además de la presión del aire y la velocidad de agitación en el fermentador darán la concentración de oxígeno disuelto necesario (Nagai, 1978). También

---

el uso de antiespumantes, el diseño del reactor, su capacidad, el tipo, número y posición de propelas deben de ser considerados (Lee, 1992).

Los procesos de fermentación se desarrollan con tres diferentes técnicas; una es el cultivo en lote o intermitente (batch en inglés), el cual utiliza un reactor hasta que los micronutrientes se agotan; dos es el cultivo semi-continuo, en el cual se agregan nutrientes al reactor durante el proceso, previa eliminación de una parte del medio de cultivo; y tres el cultivo continuo, en el cual antes de la fase estacionaria (al llegar al 80% de la fase exponencial), se agregan nutrientes al reactor y a la misma velocidad se elimina la cantidad añadida.

El cultivo continuo, permite mantener la población de microorganismos en crecimiento exponencial constante por largos períodos (Crueger, 1990a); por ello, durante el proceso existen diversas variables que son importantes de controlar; el flujo constante de nutrientes es una de estas variables, ya que su concentración en el medio de cultivo será proporcional a la velocidad de crecimiento de los microorganismos.

#### ***Caracterización bioquímica***

Los valores de proteína de la biomasa HPPR1 son comparables a los descritos en la literatura consultada; el contenido de proteína reportado para la levadura *Saccharomyces exigua* es de 50-52% (Galán, 1991), para el hongo *Phaffia rhodozyma* es de 20-30% (Lewis, 1990) y para la *Saccharomyces cerevisiae* es de 50% (Aguirre, 1993; Cuzón, 1941).

La calidad de la proteína se puede considerar buena por su composición aminoacídica, esto fue posible conocer a través del cromatograma observándose pocas diferencias comparadas con las comerciales, siendo mejor en aminoácidos esenciales (His, Ile, Leu, Lys, Met, Cys, Phe, Tyr, Thr, y Val). y los datos obtenidos serán útiles para corregir la prueba de digestibilidad de la proteína –PDCAAS, por sus siglas en inglés de Protein Digestibility Corrected Aminoacid Scoring- (Henley, 1994).

Los colores que presentaron fue debido a diferentes mezclas de carotenos; los pigmentos para la biomasa HPPR1 fueron solubles en diclorometano, dimetilsulfóxido y hexano. La cromatografía líquida de alta resolución solo identificó β-caroteno, luteína, zeaxantina y en menor proporción astaxantina.

---

## ***Etapa II - Evaluación Nutricional***

### ***Evaluación biológica***

Los parámetros de control de calidad de agua no presentaron problemas, debido al diseño del sistema que permite reciclar el agua 9 veces al día, además del mantenimiento y supervisión en general con que cuenta la sala de zooteconomía durante los bioensayos de crecimiento, pigmentación, digestibilidad e inmunoestimulación.

En cuanto los ingredientes utilizados para elaborar los alimentos experimentales basados en la formulación Mixit con un porcentaje aproximado de 30 %, se cubrieron los requisitos nutricionales con todas las dietas experimentales isoproteicas, isolipídicas, e isocaloricas (Akiyama, 1991).

La estabilidad de las dietas cubrió las necesidades del camarón, la prueba de lexiviación tuvieron poca pérdida de materia seca y permitiendo mantenerse en el agua suficiente tiempo sin sufrir deterioro, no en el caso de la HPPR1 agregó un factor atractante y una gran palatibilidad de tal manera no se presentaron residuos.

Para los cuatro bioensayos se realizaron un total de 13 dietas las cuales se elaboraron previo a su uso y se conservaron en refrigeración durante el bioensayo: 1) Crecimiento 2 dietas, sustituida la harina de pescado al 10%, con HPPR1 y un Control, 2) Pigmentación 3 dietas, sustituida la harina de pescado al 10% con HPPR1, Phaffia y Control, 3) Digestibilidad (70:30) 3 dietas (HPPR1, Phaffia y Control); 4) Inmunoestimulante 1% con 5 dietas aplicación externa de: (1) levadura experimental (HPPR1), (2) *Phaffia rhodozyma*, (3) *Saccharomyces cerevisiae* (4) beta-glucano, extraído del *Saccharomyces cerevisiae* al 0.1% y (5) una dieta control.

### ***Tasas de crecimiento, sobrevivencia y de conversión alimenticia***

Todos los camarones crecieron bien con un aumento hasta 6 veces su peso, en promedio de 0.45 a 2.85 en peso, y en las dietas de HPPR1, Phaffia y *Saccharomyces* al 1 y 10 % de sustitución de la HP se observó una tendencia en aumento de peso en el bioensayo de crecimiento, pero por el contrario una disminución para las dietas HPPR1 y Phaffia del bioensayo de pigmentación. Las tasas de conversión alimenticia fueron altas debido a un alto consumo de las dietas y además en el bioensayo de pigmentación no incrementaron en peso. Sin embargo hubo un efecto positivo de todas las dietas en la tasa de sobrevivencia con excepción de la dieta al 1% con glucano.

Es interesante observar que los camarones con dieta de *Phaffia* mostraron mayor número de *Vibrio harveyi* en la hemolinfa hasta las 27 h después de la inmersión, donde los números

---

regresaron al nivel base la cual se detectó en los camarones no estimulados, mientras que los camarones con la dieta de glucano no parecieron seguir la tendencia general de reducir el número al pasar el tiempo.

Por lo tanto parece que los camarones tratados con  $\beta$ -glucano fueron menos efectivos en limpiar la *Vibrio harveyi* de la hemolinfa, así como puede también verse en las mortalidades ya que en este tratamiento fueron los únicos en ser registrados.

Se recomienda sustituciones de la harina de pescado a razón de un 10, 20 y 30% de la levadura comercial *Saccharomyces cerevisiae* en bioensayos con *Litopenaeus vannamei*, para obtener un aumento en las tasas de crecimiento y sobrevivencia. (Cuzón, 1994, Brown, 1987).

También se ha utilizado *Saccharomyces exiguis*, como fuente de proteína y probiótico en camarones *Litopenaeus vannamei*, a un nivel de 15 y 30% se observó una tasa de crecimiento superior a la dieta control, a pesar de la deficiente estabilidad de las dietas ocasionada por un problema técnico por la humedad que poseía la dieta (Espinoza 1992).

No se encontraron reportes de sustitución de harina de pescado por *Phaffia rhodozyma*, solo existen como aditivo o bien estimulante en cantidades de ppm y sobre todo un período corto precosecha. En estudios de biodisponibilidad de astaxantina es necesario agregar enzimas que liberen los pigmentos.

Es posible que los efectos negativos en la sobrevivencia de la *Litopenaeus vannamei*, encontrados por  $\beta$ -glucanos en este estudio, podrían ser debido a las dosis administradas, especialmente cuando se tomaron en cantidades que la dieta control dio relativa mejor sobrevivencia, aunque no a un nivel significativo. Estos hallazgos sugieren que hay una necesidad de tener cuidado al administrar el  $\beta$ -glucano por períodos largos y/o en dosis altas.

Dehasque, *et al.*, (1995a), reporta que el salmón antártico, alimentado con una dieta que contenía levadura de pan al 2%, mostró una mejor sobrevivencia que los alimentados con la dieta control cuando eran estimulados con *Vibrio anguillarum*, mientras el seabass europeo juvenil mostraba resultados similares cuando se alimentó con una dieta que contenía la biomasa pigmentada HPPR1 tratada al 1% (Dehasque, *et al.*, 1995b).

Dehasque, *et al.*, (1995a), más tarde encontró que la levadura del pan químicamente tratada para aumentar su digestibilidad y para incrementar el acceso a los glucanos en la superficie de la levadura, dan mejor sobrevivencia que la levadura fresca. Puede por lo tanto, ser posible un aumento posterior de la performance de las levaduras tratadas mediante tratamiento químico.

---

### **Pigmentación**

A diferencia del bioensayo de crecimiento para la dieta HPPR1 B y Phaffia se obtuvieron menores incrementos en peso y tasas de crecimiento significativamente comparados con los controles. Sin embargo la pigmentación y la relación hepatosomática no fueron significativas, se observó una tendencia en aumento; esto se deduce de la concentración de astaxantina en HPPR1 de 280ppm y en Phaffia de 8000ppm. y a pesar de la gran diferencia en concentración para la dieta HPPR1 se muestra una mayor biodisponibilidad por encontrarse los pigmentos distribuidos a lo largo de la pared celular del micelio, cuyo grosor es menor como se observó en el microscopio electrónico (Farkas, 1979).

Por otra parte la actividad antioxidante se correlaciona con la atrofia del hepatopancreas (Lee, 1977; Ricque *et al* 1994).

### **Digestibilidad**

La digestibilidad mayor fue para la biomasa HPPR1 con gran formación de heces a consecuencia de su alto consumo. El óxido de cromo para ciertas especies o con niveles de inclusión elevados se observarían una alta velocidad de tránsito; pero no en nuestro caso pues la concentración utilizada fue del 1% Akiyama (1988), Tacon and Rodríguez, 1984 citado por Mendoza, 1993 señalan la importancia de que la disminución de la digestibilidad causaría una contaminación por excesiva excreción de elementos no digeridos. En Chile, se ha observado que al suministrar alimentos comerciales en cultivos para salmónidos con baja digestibilidad, menores de 63%, se excretan hasta 133% más sólidos fecales por tonelada de alimento, lo que repercutiría de manera negativa en la calidad del agua; cosa que no ocurriría si se administraran dietas de una digestibilidad adecuada, mayor al 90% (Ponce, 1990).

La IAFMM (1970) reporta que dentro de las causas más probables que se encuentra al origen de la falta de disponibilidad de los aminoácidos, es la digestión incompleta; por lo tanto, resulta esencial determinar la calidad proteica (Akiyama, *et al.*, 1991), adicionalmente el conocimiento de la digestibilidad de las materias primas permite realizar una formulación más precisa de la dieta, pudiendo disminuir la cantidad de proteína o bien se podrían utilizar fuentes de proteína de menor costo reduciendo así sustancialmente el precio del alimento (Akiyama, 1986; Brown, 1987; Mendoza, 1993).

---

Hajen, et al., (1993 a), mencionan que la determinación de la digestibilidad es esencial no solo para formular dietas a bajo costo, sino que además es muy útil para la investigación

#### **Actividad inmunoestimulante**

El  $\beta$ -1,3 glucano, encontrado en las paredes de las células de las bacterias y hongos, dirige la melanización de la hemolinfa al activar la profenoloxidasa en los hemocitos de los crustáceos (Söderhäll, 1981), sirviendo como señal para avisar sobre la presencia de bacterias y hongos potencialmente patógenos Söderhäll et al., (1985), los que resultaron en una reacción específica más alta. El  $\beta$ -1,3 glucano de hongos y bacterias se une a la proteína de unión glucano en el plasma, por lo que se modifica el sistema de profenoloxidasa a su forma activa. Al parecer el micelio en la biomasa HPPR1 propicia esta actividad inmunoestimulante (Unestam, 1977).

La proteína de unión glucano puede también actuar como una opsonina, estimulando la fagocitosis de las partículas de levadura por las células sanguíneas aisladas (Cerenius et al., 1994). Los  $\beta$ -1,3 glucanos han sido utilizados exitosamente como inmunoestimulantes a que aumentan el sistema de defensa no específico de una gran variedad de animales, como los cerdos y los camarones entre otros. Se han encontrado dosis tan bajas como 10<sup>-7</sup>g/cangrejo para disminuir efectivamente la cuenta de células en *Carcinus maenas* (Smith et al., 1984).

Sung et al. (1994) estudiaron los efectos del  $\beta$ -glucano extraído de la *Saccharomyces cerevisiae* en postlarvas de *Pennaeus monodon* por inmersión y concluyeron que las concentraciones de 0.5 y 1 mg/ml, dieron una protección de corto término con una duración de 18 días cuando se estimularon con *Vibrio vulnificus*.

Robertson et al., (1990), mostraron que, aunque se use el  $\beta$ -glucano de la pared celular de la *Saccharomyces cerevisiae* se aumentó la resistencia del *Salmo salar* contra el agente causante de la enfermedad entérica de boca roja y vibriosis, el método de la preparación de  $\beta$ -glucano fue de gran importancia en alcanzar este efecto y que el desarrollo irregular de los diferentes glucanos puede ser debido a diferentes enlaces glicosídicos.

Matsuo y Miyazono (1993), demostraron que a los 56 días, la alimentación de péptidoglucano, un tipo de  $\beta$ -glucano, para la trucha arcoiris, resultan en niveles inferiores de protección que a los 28 días. Parece que los compuestos como el  $\beta$ -glucano diseñados como inmunoestimulantes, no siguen una relación lineal de dosis/respuesta (Bliznakov y Adler, 1972, citada en Raa, 1996), pero que un número distinto máximo puede frecuentemente ser observado en una concentración intermedia con concentraciones superiores frecuentemente dan una ausencia de los efectos o una toxicidad. (Floch et al., 1987, citada en Raa, 1996).superiores frecuentemente dan una ausencia de los efectos o una toxicidad. (Floch, et al., 1987; citada en Raa, 1996).

---

## **VI. CONCLUSIONES**

### **6.1 Producción de biomasa pigmentada**

En la biomasa HPPR1-A y la presencia de *Penicillium sp* y *Pseudomon sp*. En la biomasa HPPR2, además de estos tres se identificó al ascomiceto *Saccharomyces exiguis*.

Para la biomasa HPPR1-A el tratamiento No. 3 presentó pigmentación de color rojo, en una concentración de 2800 ppm de las cuales sólo el 10% correspondió a la astaxantina, pero sólo en la parte superior del reactor sobre la superficie de la espuma del medio de cultivo y la producción de biomasa de 2.034 a 6.958 gramos por litro.

Para la biomasa HPPR1-A las variables que favorecieron la pigmentación fueron el VVM de 1, la presencia del segundo inóculo y los minerales.

Para la biomasa HPPR1-B los tratamientos Nos. 9, 10, 11 y 13 pigmentaron rosa, rosa, naranja y morado con concentraciones de 2800, 2800, 1800 y 8000 ppm respectivamente los cuales correspondieron al beta-caroteno, la trans-luteína, la zeaxantina y otros no identificados.

Para la biomasa HPPR1-B la producción de biomasa en general fue menor de 1.09 a 4.987 gramos por litro, a pesar que en la cinética D.O/tiempo fueron más altos debido a la mayor cantidad de micelio pero no su peso seco.

Para la biomasa HPPR1-B las variables óptimas de trabajo que favorecerán la pigmentación fueron la agitación, la presencia del LRM y 2 propelas.

La producción de pigmentos en las condiciones establecidas en la presente investigación con excepción del tratamiento No. 13 fueron inversamente proporcional a la producción de biomasa y posterior a la formación de micelio el cual lo propiciaron las altas tasas de dilución. El mejor K<sub>la</sub> fue para el tratamiento No. 11.

La fuente de carbono de primera elección fueron los carbohidratos y no el etanol etílico. La presencia de precursores como aminoácidos, acetatos, fitoeno y zeaxantina favorecen la producción de carotenoides.

La caracterización de la biomasa mostró valores moderados de proteínas 35-49%, con un alto contenido de aminoácidos principalmente [ácido glutámico, alanina [ácido aspártico, lisina y leucina. El valor de digestibilidad in vitro para las dietas HPPR1 de 51.56 y para HPPR2 de 97.35 % y en cuanto al perfil de carotenos ambas dietas presentan gran cantidad de fitoeno, beta-carotenos, luteína, zeaxantina y otros no identificados y sólo en la dieta HPPR1-A se determinó astaxantina con una concentración de 280 ppm, concentración que la considera una cepa silvestre de *Phaffia rhodozyma*.

---

## 6.2 Evaluación Nutricional

La biomasa pigmentada HPPR1, *Phaffia rhodozyma*, incluidas al 1% o al 10% en la dieta, tuvieron un efecto positivo en el peso, la biomasa final y la sobrevivencia del *Litopenaeus vannamei* juvenil. A pesar de que la digestibilidad de la proteína de HPPR1 y de la Phaffia fue igual a la de la harina de pescado, al incluirse en la dieta en un mayor porcentaje como en el bioensayo de pigmentación, la tasa de crecimiento fueron menores. Por otra parte la pigmentación la inclusión fue del 20%, mostró una tendencia a ser mayor para Phaffia y HPPR1, pero este efecto se debe a una tasa de dilución, puesto que la biomasa final fue menor en porcentaje. No fue significativo, pues el control pigmento por la presencia de precursores y otros carotenos en la dieta. En cuanto la actividad de la fenoloxidasa, con la HPPR1 fue variable y para Phaffia, que se esperaba fuera la más alta para estos animales, se encontró que tenían la actividad menor y la más uniforme. Los animales a prueba para la actividad de fenoloxidasa, que no fueron estimulados con algún patógeno anterior al muestreo y en los tratamientos fueron al final administrados 20 horas antes de tomar muestras de la hemolinfa. Esto podría indicar que con la Phaffia, la activación del sistema inmunológico es una respuesta rápida la cual podría haber vuelto al nivel base al momento del muestreo (Raa, 1996), por lo que habría camarones más fortalecidos contra los patógenos potenciales.

El efecto positivo en general de la HPPR1 y la *Phaffia*, podría ser atribuido a la presencia de los carotenos; en particular la astaxantina, la diferencia la da las concentraciones de ésta de 280 y 8000 ppm respectivamente. En años recientes, los pigmentos de carotenos han recibido un aumento en la atención en la nutrición del camarón y la evidencia se está volviendo más fuerte al apoyar el rol vital de los pigmentos de carotenos en los crustáceos e indicando que ellos no pueden ser ya considerados únicamente como pigmentos. (Menasveta, et al., 1993), Juegan un papel importante en la fisiología y en general toda la salud del animal (Torrisen, 1990). De hecho, se ha propuesto clasificar los carotenos como una vitamina liposoluble.

El glucano, por otra parte, ha dado una reducción en la sobrevivencia y los animales con esta dieta se observaron ser mucho más propensos al estrés (mortalidad causada por su manejo, etc.), que otros animales. La *S. cerevisiae*, dio un incremento en la sobrevivencia como con los camarones tratados con la *Phaffia*. La biomasa pigmentada HPPR1 también dio resultados variables. La sobrevivencia se incrementó, pero el crecimiento y la biomasa se redujo, aunque no significativamente.

El comportamiento de incremento en sobrevivencia de las tres levaduras probadas, especialmente la *Phaffia rhodozyma* y el cultivo mixto (HPPR1) dio opción para su uso potencial como un probiótico e inmunoestimulante, pero se requieren estudios sobre la dosis, así como con diferentes proporciones de concentraciones celulares de cada uno; mientras que para el uso del β-glucano, se requieren más estudios para entender los efectos y el modo de acción de estos inmunoestimulantes potenciales.

## LITERATURA CITADA

- A.O.A.C., 1990.** Determination of Physical and Chemical properties on Fish and Fish products, 15Th Ed. Association of Official Analytical Chemist. Joel M Padmore Ed. of chapter Kenneth Helrich Ed.; Washington, D.C., p. 69-83.
- A.T.T.C., 1990.** Catalogue of Yeast , 18 Ed. American type Culture Collection S.C. Jang and M.J. Edwards Rockville; Maryland, p. 1-167.
- Abdo de la P, Cruz S., L.E. y M. Dennis Rieque, 1993.** Especificaciones de harinas y aceites de pescado para nutrición animal acuícola. Memorias del Primer Simposium Internacional de Nutrición y Tecnología de Alimentos para Acuacultura. Ed. Asoc. Americana de Soya-, F.C.B. U. A. N. L.; Mty., N.I.; Méx., p. 243-256.
- Adler, L., 1994.** Response of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to salt stress. 3rd International Marine Biotechnology Conference, Program Abstracts. International Advisory Comm. of the Int. Marine Biotechnology Conference 1994; Tromsoe, Norway, p. 46.
- Aguirre Guzmán, G., 1993.** Aplicación de probióticos en la acuacultura. Memorias del Primer Simposium Internacional de Nutrición y Tecnología de Alimentos para Acuacultura; Ed. Asoc. Americana de Soya-Programa de Maricultura, F.C.B. U. A. N. L.; Mty., N.L. Méx., p. 321-328.
- Aiba S., 1973a.** Characteristic of Biological Material. Biochemical Engineering 2 Ed. Academic Press, p.18-55.
- Aiba S., 1973b.** Continuous Cultivation. Biochemical Engineering 2 Ed. Academic Press, p.128-162.
- Akiyama, D.M., 1993.** Futuras Consideraciones para la Industria Alimentaria Acuícola. Memorias del Primer Simposium Internacional de Nutrición y Tecnología de Alimentos para Acuacultura. Ed. Asoc. Americana de Soya-Programa de Maricultura, F.C.B. U. A. N. L.; Mty., N.L. Méx., p. 25-34.
- Akiyama, D.M., S. Cohelo, A.L. Lawrence and E.H. Robinson., 1998.** Apparent Digestibility of Feestuffs by the Marine Shrimp.
- Akiyama, D.M., Dominy W.G. and A. Lawrence., 1991.** Penaeid Shrimp Nutrition for The Comercial Feed Industry: Revised\* Proceedings The Aquaculture Feed Proceeding And Nutrition Workshop. American Soybean Association, p.80-98.
- Akiyama, D.M. y Cho Wang, L.N., 1993a.** Requerimientos nutricionales del camarón y manejo del alimento. Primer Simposium Internacional de Nutrición y Tecnología de Alimentos para Acuacultura. Ed. Asoc. Americana de Soya- Programa de Maricultura, F.C.B. U. A. N. L. Mty., N.L. Méx., p. 479-491.
- Akiyama, D.M., Dominy, W.G., and Lawrence, A., 1993b.** Nutrición de los camarones peneidos para la industria de alimentos comerciales. Memorias del Primer Simposium Internacional de Nutrición y Tecnología de Alimentos para Acuacultura de Soya-Programa de Maricultura, F.C.B. U. A. N. L.; Mty., N.L. Méx., p. 43-79.
- Alanís, G.G. y L. Garefa-Díaz, 1993.** Manual de Análisis de Alimentos. Técnicas utilizadas en control de calidad. Lab. Ciencias de los alimentos, F.C.B. U. A. N. L.; Mty., N.L. Méx., p. 10-38.
- Alexopoulos, C.J., 1956.** Introductory Mycology. Ed. John Wiley & Sons, p. 339-352.
- Álvarez, M.M., Garefa, D.G., y col., 1994a.** (No publicado) Experiencias de Cultivo y Determinación de Parámetros Cinéticos de una Comunidad Biológica compuesta de *Saccharomyces*

- exiguus* y un Hongo Pigmentado. Reporte final del curso de Ingeniería en Bioquímica. F.C.B. U. A. N. L. Mty., N.L.; Méx., p.1-10.
- Álvarez, M.M., García, D.G., y col., 1994b.** Experiencias de Cultivo y Determinación de Parámetros Cinéticos de una Comunidad Biológica compuesta de *Saccharomyces exiguis* y un Hongo Pigmentado. Transferencia, Memorias XXV Reunión de Investigación y Desarrollo Tecnológico del Sistema ITESM Monterrey Tomo I, p. 70-74.
- Ando, S., Osada, K., Hatano, M., 1989.** Comparison of carotenoids in muscle and ovary from four genera of salmonid fishes. Comp. Biochem. Physiol., **93 B**: 503- 508.
- Andrews, A.G., Phaff, H.J. and Storr, M.P., 1976.** Carotenoids of *Phaffia rhodozyma*, a red pigmented Fermenting Yeast. Phytochemistry, **15**:1003-1007.
- Arango, I., 1994.** Importancia de vitaminas y pigmentos astaxantina en la nutrición de camarones. Segundo Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. F.C.B. U. A. N. L. Mty., N.L. Méx., p. 67.
- Badui Dergal, S., 1994.** Química de los Alimentos. 3 Ed. Editorial Alhambra Mexicana, p. 379-385.
- Bailey J. and Ollis, D., 1986.** Biochemical Engineering Fundamental. 2 Ed. Editorial McGraw-Hill, p. 459-463.
- Blanc, P.J., Loret, M.O., Santerre, A.L. et al., 1994.** Pigments of Monascus, Journal of Food Science, **59**: 862-865.
- Bligh, E.G. and Dyer, W.S., 1959.** A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol., **37**: 911-917.
- Bolin, D.W., King, R.P., and E.W. Klostermann, 1952.** A simplified method for the determination of chromic oxide ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ) when used as an index substance. Science, **116**: 634-635.
- Boonyaratpalin, S., 1990.** Shrimp larval diseases. In: New, M.B., de Saram, H., Singh, T. (Eds.), Technical and Economic Aspects of Shrimp Farming. Proceedings of the Aquatech '90 Conference, Kuala Lumpur, Malaysia.
- Borgers, M. 1993.** Morphological aspects of fungal dimorphism in Dimorphic Fungi in Biological and Medicine Ed. H. Vanden Bosche et al Plenum Press, N.Y., p.123-131.
- Bowen et al., 1978.** Chromic Oxid in food Assimilation Studies, Transactions of The American Fisheries Society, **108**: 651-652.
- Bradford, M.M., 1976.** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principles of protein-dye binding. Anal. Bioche. **72**, 248-254.
- Brock, D.T., Smith, D.W. y col. 1987.** Microbiología 4 Ed. Prentice Hall, p. 231-237.
- Brown, R. H. 1987** Alltech's. 3rd. Annual Biootechnology Symposium, Feedstuffs, the weekly News paper for Agri. Bussines E.U.A. **9**: 19-20.
- Casas-Campillo, C., Medrano Roldán, H. y S. Larrea-Reynoso, 1971.** Producción de Proteína de Origen Microbiano Empleando Hidrocarburos de Petróleo. Revista del Instituto Mexicano del Petróleo, **3**: 58-71.
- Castro, E. y Sepúlveda E., C., 1993a.** Curso Regional de Capacitación en Control de Calidad de Insumos y Dietas Acuícolas para Latino América (CRCCCIDALA), Metodologías utilizadas en la determinación de la pigmentación y pigmentos en tejido y pellets. Fundación Chile, FAO Sep. 20-Oct. 8. 15pp.
- Castro, E. y G. Mena, 1993b.** CRCCCIDALA, Pigmentos carotenoides: Rol nutricional en especies salmonideas y fuentes de pigmentación Fundación Chile, FAO Sep. 20-Oct. 8. 45pp.

- Castro, E. y L. Ávila, 1993(c).** CRCCCIDALA, Determinación de la Digestibilidad de la proteína por métodos *in vitro* 1. Torry, 2. AOAC . Fundación Chile, FAO Sep. 20-Oct.8. 20pp.
- Cerenius, L., Liang, Z., Duvic, B., Keyser, P., Hellman, U., Tapiro Palva, E., Iwanaga, S., Söderhäll, K., 1994.** Structural and biological activity of a 1,3- $\beta$ -D-glucan binding protein in crustacean blood. *Biol. Chem.* **269**, 29462-29467.
- Chávez Sánchez, M.C., 1993.** Enfermedades Nutricionales en Acuicultura. Primer Simposium Internacional de Nutrición y Tecnología de Alimentos para Acuacultura. Ed. Asoc. Americana de soya- Programa de Maricultura. F.C.B. U. A. N. L. Mty., N.L. Méx., p.125-140.
- Chien, Y.H. and Jang, S.C., 1992.** Pigmentation of Kuruma Prawn, *Peneaus japonicus* by various pigment sources and levels and feeding regimes. *Aquaculture*, **102**: 333-346.
- Cho, C. and Slinger, S., 1979.** Apparent Digestibility Measurament in Feedstuffs for Rainbow Trout. *Finfish Nutrition and fishfeed Technology*, **2**: 239-247.
- Cortés, C.R., 1993a.** Vitaminas en la nutrición del camarón. Primer Simposium Internacional de Nutrición y Tecnología de Alimentos para Acuacultura. Productos La Roche, S.A.- México.Ed. Asoc. Americana de soya- Programa de Maricultura. F.C.B. U. A. N. L., Mty., N.L., Mex., p. 101-106.
- Cortés, C.R., 1993b.** Aspectos generales de pigmentación de peces y crustáceos. Primer Simposium Internacional de Nutrición y Tecnología de Alimentos para Acuacultura. Ed. Asoc. Americana de soya- Programa de Maricultura. F.C.B. U. A. N. L., Mty., N.L., Mex., p. 345-353.
- Custero, M., 1993.** Consideraciones sobre atrayentes químicos y estimulantes de la alimentación del camarón de cultivo *Penaeus vannamei*. Primer Simposium Internacional de Nutrición y Tecnología de Alimentos para Acuacultura. Ed. Asoc. Americana de soya - Programa de Maricultura. F.C.B. U. A. N. L., Mty., N.L., Mex., p. 355-364.
- Coutteau, P., Lavens, P., Sorgeloos, P., 1990.** Baker's yeast as a potential substitute for live algae in aquaculture diets: *Artemia* as a case study. *J. World Aquacult. Soc.* **21**: 1-9.
- Crueger, W., Crueger, A. 1990a.** A textbook of Industrial Microbiology. 2 Ed. Brock T.D. Sinaver Associates Sunderland, Ma 01375, p. 64-107.
- Crueger, W., Crueger, A. 1990b.** A textbook of Industrial Microbiology. 2 Ed. Brock T.D. Sinaver Associates Sunderland, Ma 01375, p. 192-195.
- Cruz, S.L.E., 1990a.** Fisiología de la digestión de crustáceos y su relación con la composición de los insumos que deben usar en la formulación de alimentos balanceados. Memorias del curso taller: Tópicos sobre Nutrición y Alimentación Acuícola. AMENA, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca Morelos, México, p. 33-42.
- Cruz, S.L.E., 1990b.** Nutrición y alimentación del camarón. Memorias del curso taller: Tópicos sobre Nutrición y Alimentación Acuícola. AMENA, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca Morelos, México, p. 84-96.
- Cruz S.L.E., Rique, D.M., y Martínez V.J.A., 1993.** Evaluación de dos subproductos de camarón en forma de harina como fuente proteica en dietas balanceadas para *Penaeus vannamei*. Primer Simposium Internacional de Nutrición y Tecnología de Alimentos para Acuacultura. Ed. Asoc. Americana de soya-Programa de Maricultura. F.C.B. U.A.N.L Mty. N.L. México, p. 205-234.

- Cuzón, G., 1994.** Utilisation of yeast by peneid shrimps. Segundo Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 7-9 Nov. F. C. B. U. A. N. L., Mty., N.L., México, 5 pp.
- D'Abramo L.R. and D.E. Conklin, 1995.** New Developments in the Understanding of the Nutrition of Penaeid and Caridean species of shrimp. Proceding of the especial session on shrimp farming Acuaculture'95 WAS. Baton Rouge, Louisiana, USA. p. 95-107.
- Diario Oficial de la Federación, 1994.** Proyecto NOM-089-ECOL-1994 mcp de contaminantes en las descargas de aguas residuales provenientes de las actividades de cultivo acuícola. Sept. 20 1994, p. 5-7.
- Debasque, M., Rollin, X., Devresse, B., Duray, A., Sorgeloos, P., 1995a.** Evaluation of different yeast products and immunostimulants to enhance the disease resistance of atlantic salmon (*Salmo salar*) fry. Project Report, INVE Aquaculture Scientific Department, Ref. MDH.IL1095
- Debasque, M., Ooghe, B., Divanach, P., Sorgeloos, P., 1995b.** Evaluation of different yeast products enhance the disease resistance of juvenile european seabass (*Dicentrarchus labrax*). Project Report, INVE Aquaculture Scientific Department, Ref. MDH.IL1094.
- De la Cruz, M.C., Erazo, G.G., y Bautista, M.N., 1989.** Effect of storage temperature on the quality of diets for the prawns *Penaeus monodon*. Aquaculture, **80**: 87-95.
- De la Torre, M., y Flores-Cotera, L.B., 1993.** Proteína unicelular. Biotecnología alimentaria LIMUSA, p. 383-397.
- Denis Rique, M. y Cruz-Suárez, L.E., 1992.** Investigación del Programa Maricultura FCB/UANL. Memorias de la reunión sobre nutrición y biopatología acuícola. Octubre 21-23 1992. CICTUS Hermosillo, Sonora, 5 pp.
- Eisenthal M. and Cornish-Bowden A. 1974.** The direct linear plot. A new graphical procedure for estimating enzim kinetic parameters. J. Biochem, **139**: 715-720.
- Engelhart, G.W. 1990.** Microwave hydrolysis of peptides and proteins for aminoacid analysis. CEM Corporation, American Biotechnology Laboratory, 10 pp.
- Espinoza, R.P., 1992.** Evaluación nutricional de *Saccharomyces cerevisiae*, en dietas balanceadas para el camarón blanco del Pacífico *Penaeus vannamei* Boone(decapoda-Penaidae) Facultad de ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, N.L., México; tesis de licenciatura, 50 pp.
- Ewing, W., Haresign, W., 1989.** Probiotics. U.K. Chalcombe Publications, Great Britain.
- Farkas, V., 1979.** Biosynthesis of cell walls of Fungi Microbiological Reviews, **43**: 117-144.
- Francis, F.J., 1987.** Lesser-Known Food Colorants. Food Technology, p. 62- 68.
- Frankel, E.N., 1993.** In search of better methods to evaluate natural antioxidants and oxidative stability in food lipids. Trends in food science&Technology, **4**: 220-224.
- Frengova, G., 1994.** Formation of carotenoides by *Rhodotorula glutinis* in whey ultrafiltrate lactose assimilation by yeast in mixed culture with *Lactobacillus helveticus*, for carotenoid production. Biotechnol Bioeng., **44**: 888-894.
- Galán-Wong, L. J., 1981.** Obtención de proteína unicelular de *Saccharomyces exiguum* crecida en etanol como principal fuente de carbono y energía. Tesis de maestría en Microbiología Industrial FCB UANL, 51 pp.
- Gardner, H.W., 1979.** Lipid hidroperoxide reactivity with proteine and aminoacids: A review J. Agric. Food.Chem. , **7**: 220-227.

- Gentles, A. and Haard, N., 1990.** Bioavailability of astaxanthin in *Phaffia rhodozyma*. Institute of marine resources, Department of Food Science and Technology, University of California, Davis, CA 95616 USA, p. 373-386.
- Gil, M.L., Casanova, M., Martínez, J.P., 1994.** Changes in the cell wall glycoprotein composition of *Candida albicans* associated to the inhibition of germ tube formation by EDTA. *Archives of Microbiology*, **161**: 489-494.
- Gil-Hwan, et al., 1989.** Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxantin content. *Applied and Environmental Microbiology*, **55**: 116-124.
- Gimeno, C.J., Ljungdhal, P O., Styles, C.A., and Fink, G.R., 1993.** Characterization of *S. cerevisiae* pseudohyphal growth in Dimorphic Fungi in Biological and Medicine Ed. Vanden Bosche et al Plenum Press, N.Y., pp. 83-103.
- Glass, H.N., Mac Donald, R., Moran, and Stark, J.R., 1989.** Digestion of protein in different Marine Species. *Comp. Biochem. Physiol.*, **94 B**: 607-611.
- Goodwin, T.W., 1976.** Chemistry and Biochemistry of plants pigments. Academic press. 2 Ed., p. 38-165.
- Gordon, H.T., and J.C. Bauernfeind, 1983.** Carotenoids as food colorants. In CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition. T.E. Furia CRC Press De. **18**:59.
- Haan, A.R.W., Burke, R.W., Bont, J., 1991.** Inhibition Cartenogenesis. J. Microbial production of food colorants, **56**: 1655-1660.
- Haard, N.F., 1992.** Biochemistry and Chemistry of color and color change in seafoods. Advances in seafood Biochemistry Comparation and Quality Ed, G. Flick, p. 305-360.
- Hardy, J., 1991.** Mixit-2+ Least-Cost Ration Balancy. Agricultural Software Consultants Inc. Second Printing. Kinguille, Tx USA, 336 pp.
- He Haiqui, and A. Lawrence, 1993.** Vit. E requirement of *Penaeus vanammei* Aquaculture, **118**: 245-255.
- Hendrix, C.D., 1980.** Empirical Optimization in Research and Development. Union Carbide Corporation. South Charleston, West Virginia.Chemtech., **10**: 488- 492.
- Henley, E. and J.M. Kuster, 1994.** Protein Quality Evaluation by P.D.-CAAS. Food Thecnology, pp. 74-97.
- Hoyos G. y C. Cruz, 1990.** Uso de lactobacilos en vacas lecheras en Biotecnología en la industria de alimentación animal Ed. Apligen México, D. F., 1:12-25.
- IAFMM, 1970.** International association of fish meal manufactures. Contenido de aminoácidos disponibles de la harina de pescado. The UK Naval House, Mutton Lane Potters Ber. Herts EN6 3AK Boletín técnico No. 1 Octubre pp 7. Citado en las memorias del seminario internacional sobre calidad de harinas de pescado en nutrición animal acuícola y pecuaria vol.1 Nov. 1992 Mty. N.L., México.
- Ilker, R., 1987.** In vitro pigment production: An alternative to color synthesis. Food Technology, p. 70-72.
- Ingemanson, T., Petterson A., and Kaufmann, P., 1993.** Lipid hidrolisis and oxidation related to astaxanthin content in light and dark muscle of frozen stared rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) J. Food Science, **54**: 513-518.
- Itami, T., Takahashi, Y., Tsuchihira, E., Igusa, H. and M. Kondo, 1993.** Enhancement of disease resistance of kuruma prawn, *Penaeus japonicus*, after oral administration of peptidoglycan.

- Aquatic Animal Health and Environment, Abstract of Second Symposium on Disease in Asian Aquaculture, p. 6.
- Johnson, L., 1989.** Recovery of pigments and chitin from pink shrimp peeling wastes. Advances in seafood of biochemistry composition and quality. New Orleans, Louisiana Ed. Flick G.J., p. 123-124.
- Johnson, E.A., An, G.H., 1991.** Astaxanthin from microbial sources. CRC Critical reviews in Biotechnology, 11:297-326.
- Kanner, J., Frankel, E., Granit, R., German B., and J. Kinsella, 1994.** Natural Antioxidants in Grapes and Wines. J. Agric. Food. Chem 42: 64-69.
- Kirsop, B.E., and Kurtzman, C.P., 1988.** Living resources for Biotechnology Yeasts. Ed.Cambridge University Press, p. 74-136.
- Kouman, E.W., Robert, D.G., 1985.** Practical Laboratory Mycology 3ed. Williams & Wikins., p. 21-54.
- Koshio, S., Teshima, S., Kanazawa, A., and T. Watson, 1993.** The effect of dietary protein content on growth, digestion efficiency and nitrogen excretion of juvenile Kuruma prawn, *Penaeus japonicus* Aquaculture, 113: 101-114.
- Kurmaly, K., 1993.** Increase in harvest yield and net benefit using carophill pink in shrimp feed. Aquaculture News, 2:1.
- Latscha, T., 1991.** Carotenoids in aquatic animal nutrition. Proceedings of the Aquaculture Feed Processing and Nutritio Workshop D.M. Akiyama and R.K.H. Tan Eds. American Soybean Association, p. 68-79.
- Larone, D.H., 1987.** Medical important Fungi. A guide to identification. 2 ed. American Society for Microbiolgy Washington D.C., 230 pp.
- Lee, J.M., 1992.** Biochemical Engineering, Prentice Hall Internationals series USA 321 pp
- Lewis, M.J., 1990.** *Phaffia rhodozyma*. A red Yeast with esencial as an animal feed. J.Biotechnology in the Feed Industry, p. 391-403.
- Lightner, D.V., Bell, T.A., Redman, R.M., Mohney, L.L., Natividad, J.N., Rykyani, A. and A. Poernomo, 1992.** A review of some major diseases of economic significance in penaeid prawns / shrimps of the Americas and Indopacific, in: Diseases in Asina Aquaculture I. Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, P. 57-80.
- Lin, T.F., and Demain, A.L., 1991.** Effect of nutrition of *Monascus* spp. on formation of red pigments. Applied microbiology and biotechnology, 36: 70-75.
- Lindsay, S., 1992.** High performance liquid chromatography 2 Ed. analytical chemistry by open learning, 70 pp.
- Longo E., Sierio, C., Velázquez, J.B., Colo, P., Cansado, J., and T.G. Villa, 1992.** Astaxanthin production from *Phaffia rhodozyma* use of grape juice as raw material. Biotech forum Europe, 9: 565-567.
- Madigan M., Martinko J. and J. Parker, 1998.** Crecimiento microbiano. Brock Biología de los microorganismos 8<sup>a</sup> Ed., Editorial Prentice Hall, México D.F: p. 150-177.
- Mandeville, S., Yaylayan, V., Simpson, B., and H. Ramaswamy, 1991.** Isolation and identification of carotenoid pigments lipids and flavor active components from raw comercial shrimp waste J. Food Biotechnol(NY), 5: 185-195.
- Manners, D.J., Masson, A.J., et al., 1974.** The heterogeneity of Glucan, preparations from the walls

- of various Yeast. Journal of General Microbiology, **80**: 411-417.
- Margalith, P.Z., 1992.** Pigment microbiology. Chapman and Hall. 1<sup>st</sup> Ed., pp.32-76.
- Marsili, R., Callahan, D., et al., 1993.** Comparison of liquid solvent Extraction Technique and supercritical fluid Extraction for the determination of *alfa* y *beta* carotenos in vegetables J. of Chromatography Science, **31**: 422-428.
- Matsuo, K., Miyazono, I., et al., 1993.** The influence of long-term administration of peptidoglycan on disease resistance and growth of juvenile rainbow trout. Nippon Suisan Gakkaishi **59**: 1377-1379.
- McDonald P., Edwards R. A. and F. D. Greenhalgh, 1981.** Nutrición Animal 3a.Ed.Zaragoza, España, p. 1-7.
- Medrano, H., 1994.** Comunicación personal. Catedrático del Instituto Tecnológico de Durango. Dgo, Dgo. México.
- Medrano-Roldán, H., Ruiz Herrera, H.J., and I. Magaña-Plaza, 1969.** Producción de *Beta* caroteno por diferentes especies de *Rhodotorula*. Revista Latinoamericana de microbiología, **11**: 45-50.
- Menasveta, P., 1993.** Biological benefits of carotenoids: Astaxanthin food production tomorrow: animal nutrition. Chulalong Korn University Arri, Thailand Victim International. 26th. Oct. 1993, Bangkok-Thailand, 18 pp.
- Menasveta, P., Worowattanamateekul, W., Latscha, T., and Clark, J.S., 1993.** Correction of black tiger Prawn (*Penaeus monodon* Fabricus) coloration by astaxanthin. Aquaculture Engineering, **12**: 203-213.
- Mendoza, A.R., 1993.** Métodos para evaluar la digestibilidad proteína de los alimentos destinados a los organismos acuáticos. Memorias del Primer Simposio Internacional de Nutrición y Tecnología de alimentos para Acuacultura FCB UANL, p.155-202.
- Meyers, S. P., 1986.** Carotenoids are important to aquaculture industries. Feedstuffs, **29**: 22- 23.
- Meyers, S. P., 1994.** Developments in World aquaculture, feed formulations, and the role of carotenoids. Pure & Appl. Chem. **66**: 1069- 1076.
- Meyer, P. S., Du Preez, J. C. and S. G. Kilian, 1993.** Selection and evaluation of astaxanthin-over production mutants of *Phaffia rhodozyma*. World J. Microbiol. Biotechnol. **9**: 514-520.
- Meyers, P. S. and J. C. du Preez, 1994.** Effect of culture conditions on astaxanthin production by mutant of *Phaffia rhodozyma* in batch and chemostat culture. Appl. Micobiol. Biotechnol. **40**: 785- 789.
- Nagai, S., 1978.** Mass and Energy Balances for Microbial Growth Kinetics. Biotechn. Bioeng., p. 49-83.
- Nam, H.S., Cho, S.Y., and J.S. Rhee, 1988.** H.P.L.C. Analysis of Major Carotenoids from *Rhodotorula glutinis*. J. Chromatogr., **448**: 445-447.
- Nash, G.L., 1990.** *Penaeus monodon* grow-out diseases. in: New. M.B., de Saram, H., Singh, T. (Eds.), Technical and Economic Aspects of Shrimp Farming. Proceedings of the Aquatech '90 Conference, Kuala Lumpur, Malaysia.
- Negre-Sadargues, Castillo, R., et al., 1993.** Utilization of Synthetic Carotenoids by the prawn *Penaeus japonicus* Reared Under Laboratory Conditions. Aquacultrue Engineering, **12**: 203- 213.
- Nelis, H.J., and D.E. Leeheer, P., 1989.** Profiling and Quantitation of Bacterial Carotenoids by Liquid Chromatography and Photodiode Array Detection. Applied and Environmental

- Microbiology, 55: 3065-3071.
- Olsen, S. et al., 1992. Pepsin digestibility test (Torry modificado). Citado en las Memorias Seminario Internacional sobre calidad de harinas de pescado en Nutrición Animal Acuícola y Pecuaria. Compilado de técnicas de análisis. F.C.B. U. A. N. L. 16-17 Nov., 2: 1-8.
- Olquia, C., 1993. Optimización de parámetros en cultivo continuo de *Saccharomyces exiguum* utilizando como sustrato etanol sintético. Tesis de lic., 60 pp.
- Polulyakhov, O.V., 1991. Biosynthesis of Torulene and Torularhodin by the yeast *Phaffia rhodozyma*. Applied Biochemistry and Microbiology, 27: 411-414.
- Pelczar M. J. y R.D. Reid 1980. Microbiología 2ed. Ed. Mc Graw Hill, S.A. de C.V. México D.F., p. 116-118.
- Pineda, J.C., 1994. Micronutrientos antioxidantes. Tecnología de alimentos Ed. ATAM, 29: 40-46.
- Ponce, P.T.J., y Soriano, T.J., 1990. La estabilidad en el agua de los alimentos balanceados para crustáceos. Memorias del curso-taller: Topicos sobre alimentación y nutrición acuícola. AMENA, U.A.E.M., Cuernavaca Morelia, Méx., p. 145-159.
- Provenzano, A.J., 1983. Phatobiology. The Biology of Crustacea, 6:114-147.
- Pruder, G.D. 1994. High Health Shrimp Stocks: an Advance, an Opportunity- but not a Panacea. Technical Report. World Aquaculture: 25(3) p26-28.
- Quintero Ramírez, R., 1993. Ingeniería Bioquímica, Teoría y aplicaciones Ed. Alhambra Mexicana, p. 153-173.
- Raa, J., 1996. The use of Immunostimulatory substances in fish and shellfish farming. Rev. Fisheries Science 4(3): 229-288.
- Raa, J., Roerstad, G., Engstad, R., Robertson, B., 1992. The use of immunostimulants to increase resistance of aquatic organisms to microbial infections. In: Sahriff, M., Subasinghe, R.P., Arthur, J.R., (Eds.), Diseases in Asian Aqueculture 1. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, p. 35-50.
- Ricque, D.M., 1990. Problemas zootécnicos y sanitarios ocasionados por el manejo del alimento en estanques de maricultura. Curso-Taller: Tópicos sobre alimentación y nutrición acuícola. AMENA, U.A.E.M., Cuernavaca Morelia, México, p. 110-117.
- Ricque, D.M. y L.E. Cruz-Suárez, 1992. Investigación del Programa Maricultura FCB/UANL. Memorias de la reunión sobre Nutrición y Biopatología Acuícola. Octubre 21-23, CICTUS Hermosillo, Sonora, p.1-5.
- Ricque Dennis, M., Cruz-Suárez, L.E. y Pablo San Martín del Ángel, 1994. Efecto de la rancidez en los alimentos acuícolas. Memorias del Segundo Simposium Internacional de Nutrición Acuicola. 7-9 Nov. F. C. B. U. A. N. L., Mty., N.L., México, 5 pp.
- Robertson, B., Rorstad, G., Engstad, R. and J. Raa, 1990. Enhancement of nonspecific disease resistance in Atlantic salmon *Salmo salar* L., by a glucan from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. J. Fish Dis. 13: 391-400.
- Roitt, I., and Brostoff, J., 1993. Immunology. 3 Ed., MOSBY, 14: 4-22.
- Rosenberry, B., 1994. Shrimp News International March/April Aquaculture Digest, San Diego, p. 19-20.
- Ross, K.I., 1979. Biology of the Fungi Mc Graw Hill Inc., p. 239-241.
- Rousseau, C. 1993 . Inmunología y genética de los camarones: Características del sistema de defensa

- y su posible aplicación para el control de las enfermedades. Acuicultura Tropical, 1: 41-44.
- Salazar Vejar, J., 1993.** Laboratorio práctico de formulación de dietas computarizadas FAO Santiago de Chile 10 Sept.-8 Oct.
- Sanderson ,G.W., Joly, S.O., 1994.** The value of *Phaffia* yeast as feed ingredient for salmonid fish. Aquaculture, 124: 193-200.
- Sedemak, J.J., Weerasinghe, D.K., Jolly, S.O., 1990.** Extraction and quantification of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*. Biotechnol Tech., 4:107-112
- Setsuko, O.J., Skatrud, T.J., 1994.** The Development of Natural Pigmentation Products for Aquaculture. Seminario Internacional « Patología y Nutrición en el desarrollo de la Acuicultura» Puerto Montt, Chile.3- 7 Oct.. Fundación Chile, 11 pp.
- SEPESCA, 1994.** El sector pesquero en México. Programa para promover, extender las inversiones, el comercio en la Pesca y Acuacultura. Secretaría de Pesca, Acuacultura , la Unión Europea y colab. de Fira en Barcelona, 20 pp.
- Sherwin, E.R., 1972 .** Antioxidants for Food Fats and Oils J. A.O.C.S., 49: 468-472.
- Simpson, K. L. Katayama T. and C. O. Chiohester, 1981** Carotenoids in fish feeds. In : Carotenoids as colorants and vitamin A precursors. Editor J. E. Bauernfeind.Academic Press. 4: p. 463
- Slater, J.H., 1981.** Mixed Cultures and Microbial Communities. Mixed Culture Fermentations. Symposium of mixe culture fermentations, London, U.K. p.1-4.
- Smith, V.J., Söderhäll, K., 1986.** Cellular immune mechanisms in the crustacea. In: Lackie, A.M., (Ed.), Immune Mechanisms in Invertebrate Vectors. Zoological Society of London Symposia No.56. Oxford Science Publications. p. 59-79.
- Smith, V.J., Söderhäll, K., 1991.** A Comparison of the phenoloxidase activity in the blood of marine invertebrates. Devl. Comp. Immunol. 15(4): 251-261.
- Smith, V.J., Söderhäll, K. and M. Hamilton, 1984.**  $\beta$  1,3-glucan induced reactions in the shore crab, *Carcinus maenas*. Comp. Biochem. Physiol. 77A: 635-639.
- Söderhäll, K., 1981.** Fungal cell wal  $\beta$ -1,3 glucans induce clotting and phenoloxidase attachment to foreign surfaces of crayfish hemocyte lysate. Dev. Comp. Immunol. 5: 565-573
- Söderhäll, K., 1982.** Prophenoloxydase activating system and melanisation - a recognition mechanism of arthropods? - A review. Dev. Comp. Immunol. 6: 601-611.
- Söderhäll, K., Levin, J. and P.B. Armstrong, 1985.** The effects of  $\beta$ -1,3 glucans on blood coagulation and amebocyte release in the horseshoe crab, *Limulus polyphemus*. Biol. Bull. 169: 661-674.
- Söderhäll, K., Aspan, A. and B. Duvic, 1990.** The ProPo system and associated proteins; role in cellular communication in arthropods. Res. Immunol. 141: 896-907.
- Sommer, T.R., Pott, W.T., 1991.** Utilization of microalgal astaxanthin by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture, 94: 78-88.
- Spanos, G.A., Chen, H. and S.J. Schwartz, 1993.** Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of  $\beta$ - carotene from sweet potatoes. Journal of food science, 58: 817-820.
- Spuor, A.R., 1969.** A low- viscosity epoxyresin embedding medium for electron Microscopy J. of Ultrastructural Research, 26: 31-45.
- Stahl, E., 1967.** A Handbook of Thin Layer Chromatography, p. 259-272.

- Stanbury, P.F. and Whitaker, 1984.** An introduction to fermentation processes, Microbial growth kinetics and Media for Industrial Fermentations. Principles of fermentation technology. Ed Pergamon Press, p. 1- 90.
- Summerbell, R.C., 1985.** The staining of filamentous Fungi. Mycologia, 77: 587-593.
- Song, Y.L., Sung, H.H., 1990.** Enhancement of growth in tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by bacterin prepared from *Vibrio vulnificus*. Bulletin of the European Association of Fish Pathology 10(4): 98-99.
- Sung, H.H., Song, Y.L. and G.H. Kou, 1994a.** Potential Uses of Bacterin to Prevent Shrimp Vibriosis. Fish Shellfish Immunol. 1: 311-312.
- Sung, H.H., Kou, G.H., and Y.L. Song, 1994b.** Vibriosis Resistance Induced by Glucan Treatment in Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*). Fish Pathology 29(1): 11-17.
- Sung, H.H., Kou, G.H., and Y.L. Song, 1996.** Enhancement of Microbicidal Activity in the Tiger Shrimp *Penaeus monodon* via Innunoestimulation. Journal of Crustacean Biology, 16(2): 278-284.
- Tacon, A., 1987.** The nutrition and feeding of farmed fish and shrimp. A training manual 1. The essential nutrients. Ed. FAO, 1: 117.
- Tafoya, A., Hernández., F.G., 1993.** Colorantes. Biotecnología Alimentaria. Ed. LIMUSA p. 479-500.
- Taguschi, H., and A.E. Humphrey, 1966.** Dynamic Measurement of volumetric Oxygen transfer Coefficient in Fermentation Systems. J. Ferment Technology, 44: 881- 889.
- Torrisen, O.J., 1990.** Biological activities of carotenoids in fishes. The current status of fish nutrition in Aquaculture. In. Takeda, M., Watanabe, T. (Eds.), Proceedings of the Third International Symposium on Feeding and Nutrition in Fish, Tokyo University of Fisheries, Tokyo, Japan, p. 387-399.
- Torrisen, O.J., Hardy, R.W., Shearer, K.D., Scott, T.M., and F.E. Stone, 1990.** Effects of dietary canthaxanthin level and lipid level on apparent digestibility coefficients for canthaxanthin in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture, 88: 351-362.
- Trivedi, N.B., Tesch, W., and G.K. Jacobson, 1986.** Baker's Yeast. Critical Review in Biotechnology, 4(I): 75-109.
- Unestam, T., Söderhäll, K., 1977.** Soluble fragments from fungal cell walls elicit defense reactions in crayfish. Nature, 267: 45-46.
- Vargas, A. F., 1992.** Sistema de defensa del camarón café *Penaeus californiensis*. Universidad Autónoma de México. Tesis Doctoral México, p. 34.
- Viader Salvadó, J.M., 1994.** Determinación de aminoácidos por CLAR. Lab. de Química BioMolecular Depto. de Bioquímica Fac. de Medicina UANL, Mty., N.L., comunicación personal.
- Victorino, C. R. 1995.** Estudio de un proceso Continuo para la producción de Pigmentos para la Industria Alimentaria. Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico de Durango, Durango, Dgo. México.
- Vincent, M., 1988.** Roles and Transformation des Pigments Caroténoides dans les Réseaux Trophiques Marins. La Mer, 26: 139-147.

- Wang, D., et al., 1979.** Translation of Laboratory, Pilot, and Plant Scale Data Fermentation and Enzyme Technology. John Wiley & Sons Ed., 10: 194-212.
- Wu K., Zhang, W., Addis, P.B., Epley, R.J., Salih, A.M., and J. Lehrfeld, 1994.** Antioxidants properties of Wild Rice. *J. Agric. Food. Chem.* 42: 34-57.
- Ya Tu, Simpson, B.K., Romaswamy, H., et al., 1991.** Caroproteins from lobster waste as a potencial feed supplement for cultured salmonids. *Food Biotechnology*, 5: 87-93.
- Yamada, S., Tanaka, Y., Sameshima, M., and Y. Ito, 1990.** Pigmentation of Prawn (*Penaeus japonicum*) with carotenoids. An Effect of Dietary Asthaxanthin,  $\beta$ -caroteno and Cantaxanthin on pigmentation. *Aquaculture*, 87: 323-330
- Zhang, M., Chang, H., and C. Lin, 1982.** Studies on red pigment production by Monascus Culture and fermentation. *Food and Fermentation Industries*, 4: 1-7.

---

# **ANEXOS**

---

# **EXPERIENCIAS DE CULTIVO Y DETERMINACION DE PARAMETROS CINETICOS DE UNA COMUNIDAD BIOLOGICA COMPUESTA POR *Saccharomyces exigus* Y UN HONGO PIGMENTADO**

Mario Moisés Alvarez, Graciela García-Díaz, Clarita Olvera-Carranza, Luis Gerardo Treviño-Quintanilla, Arturo García-Bustamante, Ma. del Carmen Sandoval-Villarreal e Hiram Medrano-Roldán.

Se han realizado experimentos de cultivo intermitente y continuo, de una comunidad integrada por la levadura *Saccharomyces exigus* y un hongo pigmentado de color rojo (HPPR1) hasta ahora no identificado taxonómicamente.

Una operación continua de cultivo fue seguida a lo largo de 183 horas. Durante este periodo de tiempo se observó la respuesta de la comunidad biológica ante cambios de composición del medio de cultivo, patrones de agitación, suministro de aire y flujo volumétrico.

En cultivo intermitente, se evaluó la velocidad específica de crecimiento de cultivos esencialmente dominados por *S. exigus* o HPPR1, en distintas concentraciones de etanol como única fuente de carbono (1, 2, 3 y 4%).

Los resultados muestran que la cepa HPPR1 ve inhibido su crecimiento a concentraciones de etanol cercanas al 3% en volumen. La tasa de crecimiento específico máxima ( $\mu_{max}$ ) de esta cepa en el rango de concentraciones de 1 a 2% de etanol, resulta ser de 0.161 /hr. Este valor es superior a la  $\mu_{max}$  de la levadura *S. exigus*. Los patrones de sucesión de comunidades entre las cepas de HPPR1 y *S. exigus* provocados por cambios de flujo y concentración de etanol durante un cultivo continuo, resultan aplicables en términos de los valores de los parámetros cinéticos de ambas cepas.

Se recomiendan condiciones de tiempo de residencia entre 6.25 y 8.06 horas y concentraciones de etanol menores al 2%, para mantener la dominancia poblacional de HPPR1 sobre *S. exigus*.

**Palabras clave:** Comunidad biológica, dominancia, reactor continuo tipo tanque, tasa específica de crecimiento, pigmento.

## **1. Introducción.**

La complejidad estructural de la mayor parte de los pigmentos, dificulta la posibilidad de que su síntesis química pueda ser realizada a un bajo costo. Por otro lado, cuando el pigmento es obtenido por extracción a partir de tejidos de plantas o animales, existe una dependencia entre el volumen de producto y la disponibilidad regional o temporal del organismo poseedor del pigmento. Una alternativa a los procesos de producción mencionados, es la síntesis vía cultivo celular.

Es conocida la capacidad productora de pigmentos por parte de algunos microorganismos. Ejemplo de ellos son algunas bacterias de los géneros *Sarcina*, *Micrococcus*, *Myxobacterium*, *Corynebacterium* y *Nocardioides*, así como las levaduras del género *Rhodotorula* y los hongos *Cantharellius cinnabarinus*, *Phytophthora nodulans*, *Neurospora crassa* y algunas especies de *Fusarium* y *Phycomyces*. El pigmento denominado azul indigo, empleado ampliamente en la industria textil, actualmente es producido vía fermentación, utilizando una cepa recombinante de *Escherichia coli* [1]. De especial importancia comercial son también algunas levaduras que, al ser incorporadas a la dieta de aves de corral, imparan tonalidades atractivas a los huevos de éstas.

M.C. Mario Moisés Alvarez: Profesor-investigador del Centro de Desarrollo Biotecnológico del ITESM Campus Monterrey, mmalvar.campus.itesm.mx

M.C. Graciela García-Díaz : Profesor de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL.

Biol. Clarita Olvera-Carranza : Asistente de investigación del Centro de Desarrollo Biotecnológico del ITESM.

Q.F.B. Luis Gerardo Treviño-Quintanilla e Ing. Arturo García Bustamante: Estudiantes de posgrado de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL.

Ma. del Carmen Sandoval-Villarreal : Estudiante del ITESM Campus Monterrey.

Dr. Hiram Medrano Roldán, Profesor del Departamento de Ingeniería Química, Tecnológico Regional de Durango.

*microorganismos*

Existen varias razones por las cuales la capacidad productora de un pigmento podría representar una ventaja competitiva para un microorganismo. En las bacterias fotosintéticas, los pigmentos juegan importante papel en el fenómeno de fototaxis. En las bacterias no fotosintéticas el pigmento puede funcionar como fotoprotector, evitando el daño por radiación a ciertos sistemas enzimáticos vitales para la célula [2]. La actividad metabólica de algunos pigmentos ha sido demostrada. Muchas bacterias consumidoras de alcohol metílico poseen la capacidad de producir pigmentos en su fase estacionaria de crecimiento. Esta capacidad ha sido asociada con cierta resistencia al fenómeno de inhibición por sustrato [3] y [4].

Este estudio pretende contribuir a esclarecer cuáles son las condiciones adecuadas de cultivo de un hongo productor de pigmento rojo, hasta ahora no identificado. El atractivo de este microorganismo radica en que, dada su morfología micelial, resultaría fácilmente separable del caldo de cultivo. El pigmento tendría aplicación como colorante en la industria alimentaria de comprobarse su inocuidad. Por otro lado, el hecho de que sea cultivable de forma continua en un medio de bajo costo tal como el alcohol etílico, ofrece ventajas económicas. Adicionalmente, el hecho de que sea un producto natural, garantiza su biodegradabilidad, factor trascendente al evaluar el impacto ambiental que tendría su producción. El crecimiento de este microorganismo fue observado por Medrano [5], en el Instituto Tecnológico de Durango. Un cultivo continuo de *Saccharomyces exigus* fue eventualmente invadido por el hongo rojo mencionado, al que, en lo subsecuente, denominaremos HPPR1. De acuerdo a la información de que se dispone, la contaminación ocurrió mientras se manejaban condiciones de cultivo aparentemente adecuadas para *S. exigus*, desconociéndose hasta el momento tanto el origen de la cepa contaminante, como los factores que propiciaron el éxito de la invasión. Este sistema de cultivo mixto, representa un excelente modelo para el estudio del fenómeno de dominancia de poblaciones durante un cultivo continuo, bajo diferentes condiciones de operación.

## 2. Material y métodos.

### Experimentación en cultivo intermitente.

El inóculo utilizado en este estudio fue provisto por el Dr. Hiram Medrano (Instituto Tecnológico de Durango). Los experimentos de propagación en cultivo intermitente fueron realizados en matraces Erlenmeyer de 100 ml, utilizando 100 ml de medio de cultivo cuya formulación se presenta en el cuadro 1.

Los matraces fueron agitados en una cámara para agitación. Su distribución en ella fue aleatoria. Una segunda propagación se realizó en un reactor New Brunswick de 14 lt, mismo que posteriormente se operaría en forma continua.

0,5

Cuadro 1. Formulación del medio utilizado para el cultivo de HPPR1 y *S. exigus*.  
(Cantidades requeridas para preparar un litro de medio)

#### Componentes fundamentales:

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5.0 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	3.0 g
$\text{MgSO}_4$	0.5 g
$\text{CaCl}_2$	0.1 g
$\text{NaCl}$	0.1 g
Etileno al 96% peso	1% volumen

#### Compuestos traza:

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.0280 mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.0140 mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.0250 mg
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0240 mg
$\text{NaMnO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.0240 mg
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.0840 mg
Biotina	0.0002 mg
Tiamina	0.0400 mg

Se realizaron pruebas de crecimiento intermitente para determinar la sensibilidad de cultivos predominados por *S. exigus* y HPPR1 a distintas concentraciones de etanol como única fuente de carbono. Estos experimentos se realizaron bajo el siguiente protocolo:

Cuatro matraces Erlenmeyer de un litro, con el medio de cultivo descrito en la tabla 1 y 1, 2, 3 y 4% volumen de etanol respectivamente, fueron inoculados con 5 ml de un cultivo donde predominaba *S. exigus*. La absorbancia inicial promedio en estos matraces fue de 0.440 unidades, medidas a 450 nm. Igualmente, cuatro matraces con las citadas concentraciones de etanol, fueron sembrados con un cultivo donde predominaba HPPR1. La absorbancia promedio en estas muestras fue de 0.111 unidades a 450 nm. Muestras de los ocho matraces mencionados fueron tomadas en intervalos de tiempo variables, determinándose en cada caso su absorbancia y realizando medición de unidades Klett.

Cultivo continuo.

Se cultivó en forma continua el binomio *S. exigus*- HPPR1 en un reactor New Brunswick de volumen total de 14 lt y volumen efectivo 10.5 lt (ver figura 1). Las condiciones base de operación fueron: 600 rpm, 1vvm de suministro de aire, 450 ml/hr de flujo de alimentación y 1% volumen de etanol en el medio de cultivo. La formulación presentada en la tabla 1 se vió modificada por la inclusión de 0.1% de sólidos concentrados a partir de líquido de remojo de maíz. Sobre estas condiciones se realizaron modificaciones, observándose el impacto que éstas tendrían sobre la estabilidad del cultivo. Se tomaron muestras en dos sitios del reactor, tanto en la parte superficial del líquido (muestras de salida), como en su fondo (muestras de fondo).

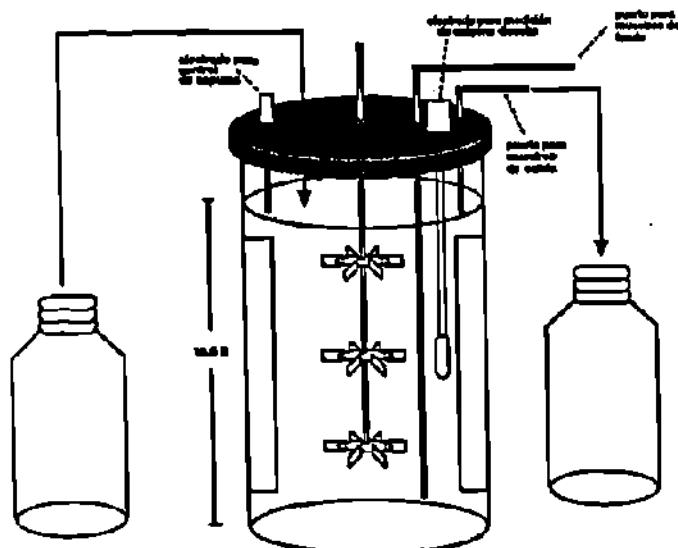


Figura 1. Representación esquemática del reactor tipo tanque utilizado durante el cultivo continuo de *S. exigus* y HPPR1.

Las perturbaciones estudiadas fueron:

- a) Cambio en la fuente de carbono (suplementando con sólidos de remojo de maíz).
- b) Cambio en la fuente de nitrógeno.
- c) Cambio en el flujo volumétrico.
- d) Cambio en las condiciones de agitación (300-700 rpm).
- e) Cambio en el número de impulsores empleados (2 ó 3).
- f) Supresión de vitaminas y elementos traza.
- g) Cambio en la concentración de etanol del medio de cultivo (1,2,3 y 4%).

La ocurrencia de estas perturbaciones fue decidida durante el transcurso del experimento, siguiendo el propósito de estabilizar el cultivo y promover la dominancia de la cepa HPPR1.

□ Estimación de  $k_{fa}$  a distintas condiciones operativas.

Se realizó un análisis comparativo de coeficientes de transferencia de oxígeno a distintos flujos de alimentación. Las determinaciones de  $k_{fa}$  se realizaron a flujos en el rango de 750-3000 ml/hr, y a condición estable de 1 vvm de aireación. Las estimaciones fueron realizadas por el método dinámico [6 y 7], considerando que:

$$\frac{d[O_2]}{dt} = k_{fa} ([O_2]^* - [O_2]) \cdot mx \quad (1)$$

donde:

$d[O_2]/dt$  es el cambio de concentración de oxígeno respecto al tiempo en estado no estacionario. (mg/(lt·seg)).

$k_{fa}$  es el coeficiente de transferencia de oxígeno (1/s).

$[O_2]^*$  es la concentración de saturación de oxígeno en agua, que para la presión barométrica de trabajo tiene un valor de 7.4353 mg/lit.

$m$  es una constante (mg/(lt·seg·unidad de absorbancia)).

$x$  es la biomasa existente en el momento de la determinación (unidad de absorbancia).

### 3. Resultados y discusión.

Posterior a un proceso de resiembra en matraz, y partiendo de un cultivo no puro pero con alta dominancia de HPPR1 sobre *S. exigua* (según observaciones realizadas al microscopio), se inició el cultivo en el reactor de 14 lt, de la comunidad microbiológica descrita. La figura 2 muestra la etapa de arranque del cultivo. A partir del momento de siembra del tanque (tiempo=0), y hasta un tiempo de 10.15 horas, el fermentador se operó de manera intermitente. La disparidad entre las lecturas de absorbancia de muestras tomadas del fondo y de la parte superior del reactor indica que, bajo las condiciones predominantes en ese momento, la biomasa no se encontraba homogéneamente distribuida en el reactor.

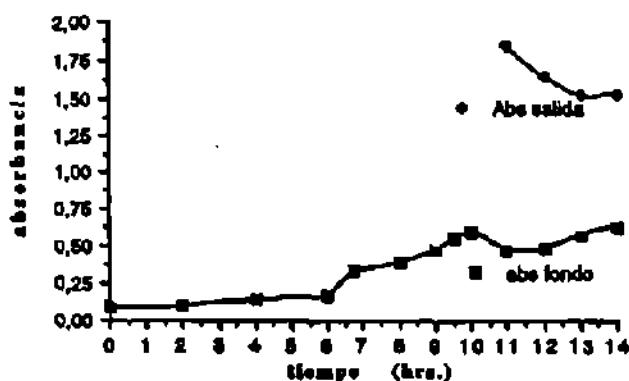


Figura 2. Perfil de concentración celular (expresada como absorbancia a 450 nm) respecto al tiempo, para las primeras 14 horas de operación de un cultivo de HPPR1 y *S. exigua* en un reactor de 14 lt. A t = 10.15 arrancó la operación continua.

Cumplidas las primeras 17 horas de operación del reactor, se varió el flujo de entrada-salida de sustrato, de 490 ml/hr a 390 ml/hr. El efecto de esta perturbación puede observarse en la figura 3. La población celular aumentó por efecto de la disminución de flujo. Este efecto comienza a ser notorio a las trece horas de ocurrido, manifestándose claramente una vez transcurrido un tiempo de residencia

después de la perturbación ( $T_r=26.92$  hrs. a un flujo de 390 ml/hr). Sin embargo, esta mayor densidad poblacional no estuvo asociada con un aumento de la intensidad de pigmentación del cultivo. Observaciones al microscopio revelan que la levadura *S. exigus* (blanca y forma ovalada típica) resultaba dominante en el cultivo sobre la forma micelial de HPPR1 a las 22 horas de operación continua de éste. Precisamente a este tiempo, se modificó el sistema de agitación del reactor incorporando una tercera propela. El efecto de este cambio pareció ser relevante, disminuyendo la disparidad entre las lecturas de absorbancia de la parte inferior y superior del reactor.

Pruebas cromatográficas realizadas sobre muestras a la salida del reactor durante las primeras horas de operación, indican que el porcentaje de alcohol consumido era mínimo, mostrando predilección el cultivo por consumir el carbono proveniente de los sólidos de maíz. A las 49.75 horas de operación se realizó un cambio en la composición del medio de cultivo, retirándose el suministro de líquido de remojo de maíz. El retiro de esta segunda fuente de carbono parece haber modificado sólo ligeramente la densidad poblacional en el reactor (ver tendencia en figura 4 a partir de  $t=49.75$ ).

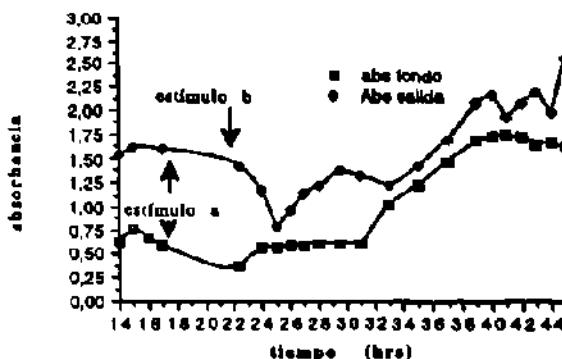


Figura 3. Perfil de concentración celular (expresada como absorbancia a 450 nm) respecto al tiempo, para el intervalo comprendido entre 14 y 44 horas de operación de un cultivo de HPPR1 y *S. exigus* en un reactor de 14 lt. El estímulo a consistió en un cambio de flujo volumétrico desde un valor de 490 hasta 390 ml/hr. El estímulo b consistió en la adición de una tercera propela al sistema de agitación.

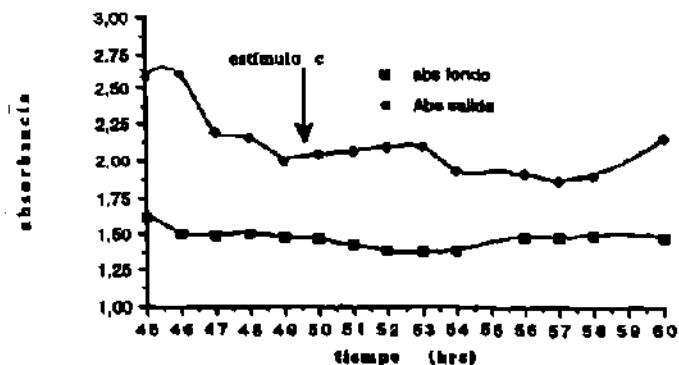


Figura 4. Perfil de concentración celular (expresada como absorbancia a 450 nm) respecto al tiempo, para el intervalo comprendido entre 45 y 60 horas de operación de un cultivo de HPPR1 y *S. exigus* en un reactor de 14 lt. El estímulo c consistió en la modificación del medio de cultivo, retirando los sólidos de remojo de maíz.

Bajo la suposición de que la tasa de crecimiento específica de HPPR1 podría ser superior a la de la levadura *S. exigus*, a las 72.5 hrs. de operación se procedió a incrementar el flujo volumétrico a 750 ml/hr (figura 4). Esta suposición se derivó del antecedente de que el hongo HPPR1 fue capaz de invadir un cultivo de *S. exigus* mantenido en condiciones normales de cultivo continuo [5]. En un reactor continuo, una invasión definitiva bajo ciertas condiciones de cultivo, puede explicarse en términos de una mayor velocidad de crecimiento de la cepa invasora respecto a la cepa original. De ser esta la situación, al incrementar la tasa de dilución, y dado que en un reactor continuo tipo tanque con alimentación estéril:

$$D = \mu \quad (2)^*$$

... la cepa de crecimiento más lento se verá desplazada por la de mayor tasa de crecimiento específica, siempre y cuando la  $D$  sea superior a la tasa de crecimiento máxima de la cepa más lenta, o bien se cumpla que:

$$1 \cdot (Tao)(\mu_{max}) < 0 \quad (3)$$

... [8], donde:

$Tao$  es el tiempo de residencia hidráulico del reactor, igual a  $1/D$ ,

$\mu_{max}$  es la tasa de crecimiento máxima del microorganismo mas lento y

\*Ecuación derivada de un balance de materia en un reactor continuo tipo tanque con alimentación estéril.

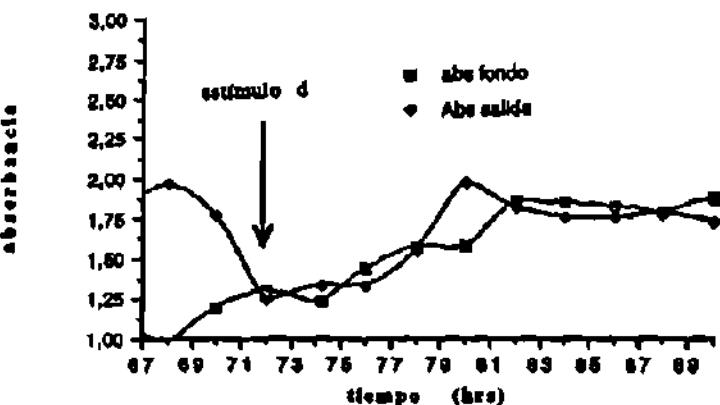


Fig 5 conociendo  
const. de agitación  
300 → 700 rpm

**Figura 5.** Perfil de concentración celular (expresada como absorbancia a 450 nm) respecto al tiempo, para el intervalo comprendido entre 67 y 89 horas de operación de un cultivo de HPPR1 y *S. exigus* en un reactor de 14 lt. El estímulo d consistió en la modificación del flujo volumétrico, desde un valor de 390 ml/hr hasta 750 ml/hr.

Después de un cambio de flujo de 390 a 750 ml/min (estímulo d, figura 6), la pigmentación en el medio de cultivo comenzó a hacerse notoria. Transcurrido un tiempo de residencia en el reactor (14 horas para el flujo de 750 ml/hr), la absorbancia en la muestra fluctuaba en 1.8 unidades, valor superior al que se presentaba antes de la perturbación descrita. Aparentemente, la sucesión de HPPR1 sobre la levadura guarda relación con la disminución de similitud entre las lecturas de absorbancia de la parte superficial del reactor y su seno. Se presupone que *S. exigus* tiene una mayor propensión para ser arrastrada hacia la superficie y alojarse en la espuma superficial.

Concentraciones de 2% y 3% de etanol en volumen, parecen tener efecto significativo en el aumento de la densidad poblacional en el reactor (obsérvense tendencias en la figura 6, a partir de  $t=93$ , tiempo en el cual se incrementa la concentración de etanol al 3%). Obsérvase sin embargo la repercusión negativa de un incremento de concentración de etanol hasta un nivel del 4% ( $t=117.5$ , figura 6).

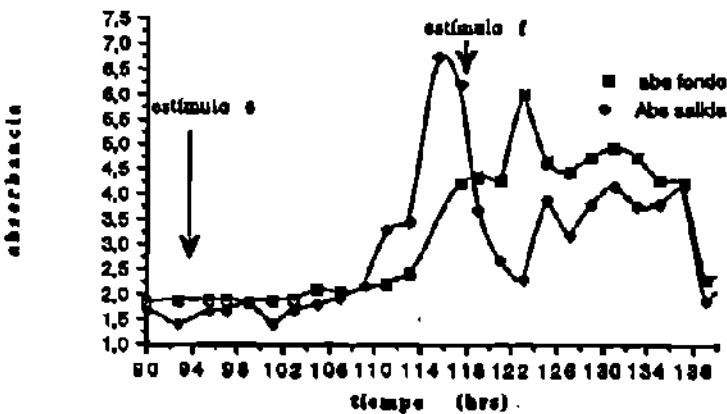


Fig 6 # desembalado

**Figura 6.** Perfil de concentración celular (expresada como absorbancia a 450 nm) respecto al tiempo, para el intervalo comprendido entre 89 y 136 horas de operación de un cultivo de HPPR1 y *S. exigus* en un reactor de 14 lt. Los estímulos e y f consistieron en incrementos en la concentración de etanol en el medio de cultivo hasta un 3% y 4% volumen respectivamente.

I / I

Con la finalidad de establecer la concentración adecuada de etanol en el medio de cultivo para maximizar de esta forma el crecimiento de la cepa pigmentada, se realizaron los experimentos de cultivo intermitente cuyo protocolo ha sido mencionado en la sección de material y métodos. En la figura 7 y 8, se muestra el efecto de distintas concentraciones de etanol en la curva de crecimiento de un cultivo dominado por HPPR1 y *S. exigus* respectivamente.

Los resultados demuestran que mientras el crecimiento de HPPR1 es inhibido por concentraciones volumétricas de etanol superiores a 2%, *S. exigus*, no muestra tal fenómeno de inhibición. Para el caso del cultivo de HPPR1, se demuestra que en concentraciones volumétricas de 2% de etanol, la cepa exhibe mayor tasa específica de crecimiento respecto al resto de las concentraciones manejadas. El crecimiento se ve completamente inhibido a concentraciones alcohólicas de 4%.

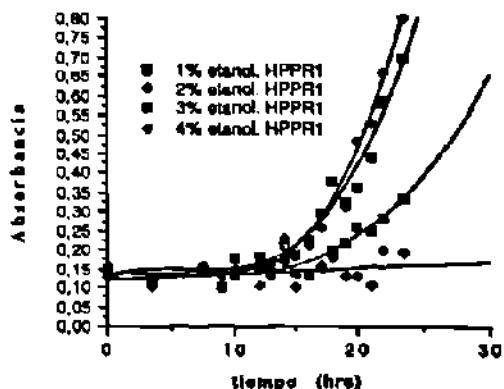


Figura 7. Perfil de concentración celular (expresada como absorbancia a 450 nm) respecto al tiempo, para el cultivo intermitente de HPPR1 en matrices Erlenmeyer de 1 lt, a distintas concentraciones volumétricas de etanol.

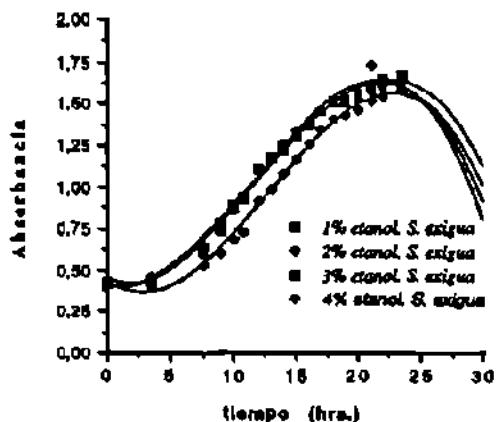


Figura 8. Perfil de concentración celular (expresada como absorbancia a 450 nm) respecto al tiempo, para el cultivo intermitente de *S. exigus* en matrices Erlenmeyer de 1 lt, a distintas concentraciones volumétricas de etanol.

Si los datos presentados en las figura 7 y 8 son analizados asumiendo que el crecimiento celular puede ser representado por la ecuación de Monod, entonces, una gráfica de  $\ln(x/x_0)$  contra  $t$ , para los puntos de fase exponencial, dará información sobre la tasa específica de crecimiento a distintas concentraciones de sustrato (pendiente de la curva mencionada), tanto para HPPR1 como para *S. exigus*, siendo:

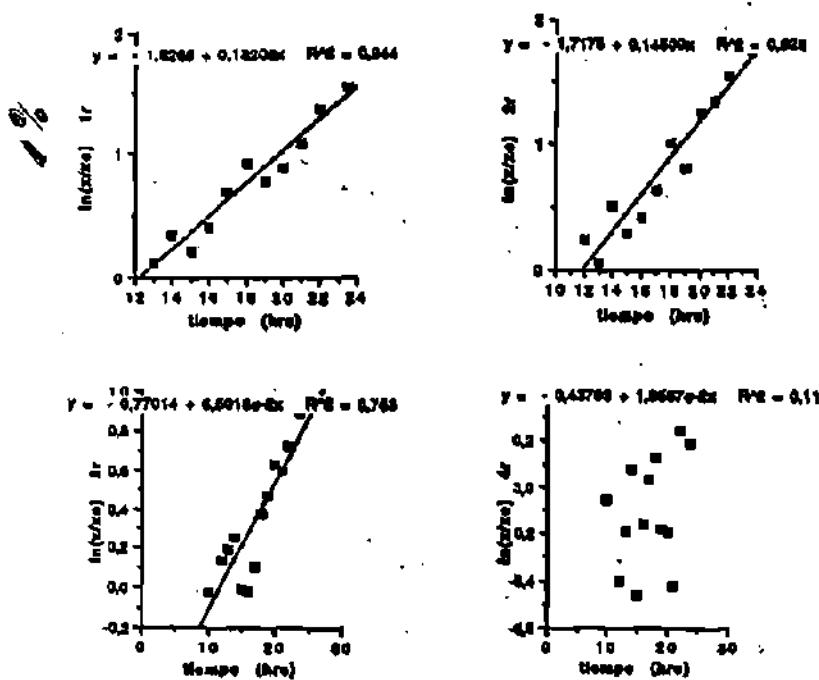
$x$  la absorbancia en un cierto tiempo  
 $x_0$  la absorbancia inicial posterior a la inoculación del medio.  
 $t$  el tiempo de cultivo.

Estas curvas son presentadas en la figura 9 para el caso de un cultivo dominado por cepa HPPR1, y en la figura 10 para el caso de un cultivo dominado por *S. exigus*. El cuadro 2 muestra en forma sintética los resultados de la evaluación de tasas de crecimiento específicas.

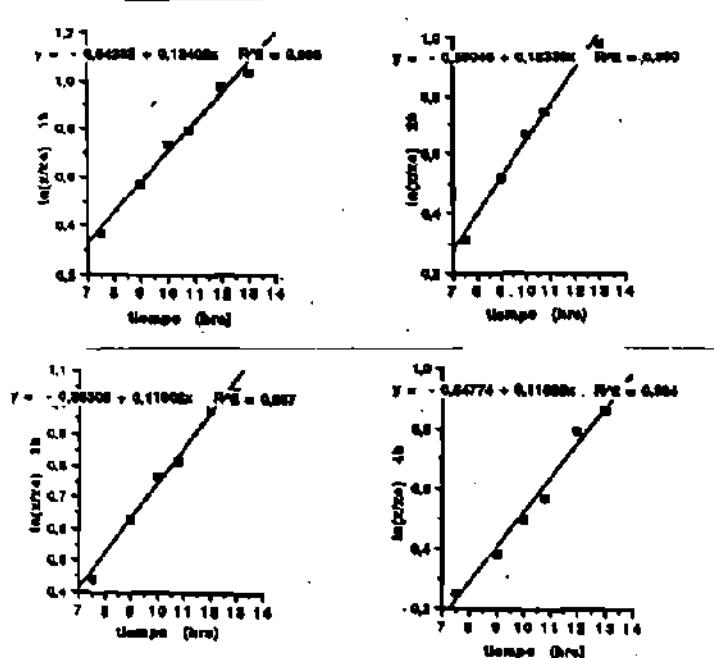
En los cultivos dominados por HPPR1 se observa una tasa de crecimiento más alta para concentraciones de 1 y 2% de etanol, en comparación con aquellos dominados por *S. exigus*.

Este hecho justifica que HPPR1 sea capaz de invadir cultivos de *S. exigus* bajo condiciones de flujos volumétricos altos. De los resultados del cuadro 2, se infiere que  $\mu_{max}$  de *S. exigus* es aproximadamente 0.123, dado que a incrementos en concentración de fuente de carbono, no se observa incremento en la tasa de crecimiento.

De ser esta suposición correcta, tiempos de residencia menores a 8.06 hrs, permiten cumplir la condición expresada para cultivo continuo por la ecuación (3), de forma que asegurarán un progresivo lavado de *S. exigus*, favoreciendo la dominancia de la cepa HPPR1 bajo condiciones de concentración de etanol de 1 y 2%.



**Figura 9.** Determinación de tasas específicas de crecimiento (pendientes de la recta  $\ln(x/x_0) = b + \mu x$ ), para diferentes concentraciones volumétricas de etanol en el medio, de un cultivo dominado por la cepa HPPR1. En la ordenada de cada gráfica se indica la concentración de etanol en porcentaje volumen (1r indica 1%, 2r indica 2%, etc.).



**Figura 10** Determinación de tasas específicas de crecimiento (pendientes de la recta  $\ln(x/x_0) = b + \mu x$ ), para diferentes concentraciones volumétricas de etanol en el medio, de un cultivo dominado por la cepa *S. exigua*. En la ordenada de cada gráfica se indica la concentración de etanol en porcentaje volumen (1b indica 1%, 2b indica 2%, etc.).

Cuadro 2. Tasa de crecimiento específica ( $\mu$ )\* bajo distintas condiciones de concentración de sustrato para cultivos dominados por cepa HPPR1 y *S. exigus*.

% volumen de etanol	cepa	
	HPPR1	<i>S. exigus</i>
1%	0.132	0.124
2%	0.145	0.123
3%	0.065	0.110
4%	0.000	0.116

\*  $\mu$  expresada en hr<sup>-1</sup>.

Leyendo 1/2 hr<sup>-1</sup>

Aplicando la técnica de determinación de parámetros cinéticos para la ecuación de Monod, propuesta por Eisenthal y Cornish-Bowden [9], y considerando solamente los datos de tasa de crecimiento específico de HPPR1 a concentraciones de 1 y 2% de etanol (condiciones donde aún no se presenta inhibición por sustrato), se han encontrado valores para  $\mu_{\text{máx}}$  y  $K_s$  de la cepa HPPR1 de 0.161/hr y 0.22% volumen de etanol respectivamente.

Estos valores son válidos sólo en el rango de concentraciones menores a 2% de etanol. Existe la posibilidad de haber subestimado el valor de  $\mu_{\text{máx}}$ , dado que el cultivo utilizado no es realmente puro, y por tanto, la tasa de crecimiento observada es en realidad una propiedad específica dependiente de las concentraciones de HPPR1 y *S. exigus*. Bajo el entendido de dominancia de HPPR1, los valores reportados resultan una adecuada aproximación. La figura 11 presenta el análisis cinético utilizando la metodología gráfica de Eisenthal y Cornish-Bowden. En esta metodología cada punto ([S],  $\mu_{\text{observada}}$ ), es utilizado para trazar una recta entre los puntos (-[S], 0) y (0,  $\mu_{\text{observada}}$ ). Teniendo tantas rectas como puntos ([S],  $\mu_{\text{observada}}$ ), la intersección entre las rectas corresponderá al punto ( $K_s$ ,  $\mu_{\text{máx}}$ ).

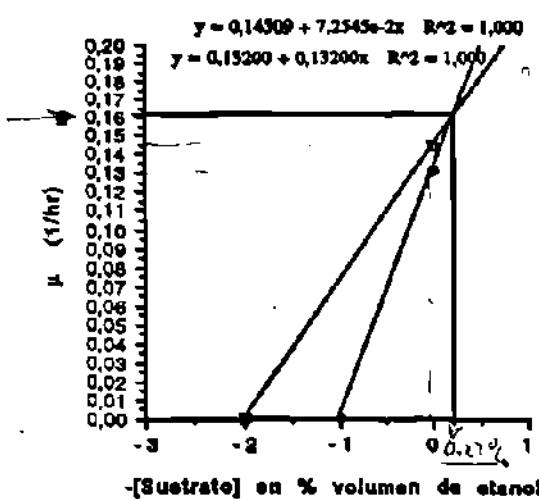


Figura 11. Determinación de los parámetros cinéticos  $K_s$ ,  $\mu_{\text{máx}}$  de la cepa HPPR1, por el método gráfico de Eisenthal y Cornish-Bowden [9].

El cuadro 3 muestra la dependencia del coeficiente de transferencia de oxígeno  $k_f$  y del parámetro  $m$ , respecto a las condiciones de flujo. (Nomenclatura establecida en la sección de material y métodos).

Pendiente ?  $m \cdot g / ft \cdot w g \cdot \text{unidad de g. atm.}$

5/1

**Cuadro 3. Coeficientes de transferencia y términos mx estimados bajo distintas condiciones de flujo durante el cultivo continuo de la cepa HPPR1.**

Flujo (ml/hr)	x (abs)	mx (mg/(lt·seg))	m*	Kls (1/s)
960	2.316	0.0955	0.0412	0.03837
1200	2.325	0.0729	0.0313	0.05531
1500	2.386	0.0725	0.0304	0.07984
1800	2.465	0.0690	0.0280	0.04900
3000	2.136	0.0640	0.0299	0.04081

\* m expresada en (mg/(lt·seg·unidad de absorbancia))

Acorde con estos resultados, la transferencia de oxígeno se ve maximizada alrededor de un flujo de 1500 ml/hr. Este valor de flujo, dado el volumen de trabajo del reactor, propiciaria una tasa de dilución de 0.1428, aún inferior a la  $\mu_{max}$  de la cepa HPPR1, siendo de esta forma improbable el lavado celular.

#### 4. Conclusiones.

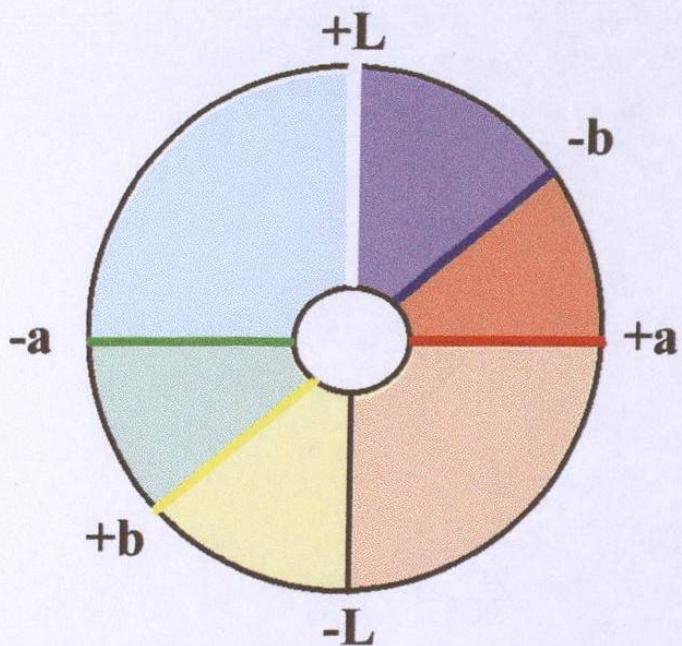
Derivado del trabajo experimental realizado se establece que es posible mantener un cultivo continuo de *S. exigus* exento de problemas de invasión por parte de la cepa HPPR1 o viceversa. Las variables más importantes para controlar un sistema en el que ambas cepas están presentes, son el flujo volumétrico y la concentración de etanol en el medio de cultivo. En un rango de tiempos de residencia de 6.21 a 8.06 hrs y manejando concentraciones de 2% volumen de etanol, el cultivo del hongo productor de pigmento rojo HPPR1, es estable. La razón por la cual a tiempos de residencia altos (vgr. 10-30 hrs) domina *S. exigus* sobre HPPR1, no está plenamente esclarecida, infiriéndose que la afinidad por etanol del primero, es superior a la del segundo.

No hay indicio de que la remoción de elementos traza y vitaminas afecten significativamente el crecimiento de HPPR1.

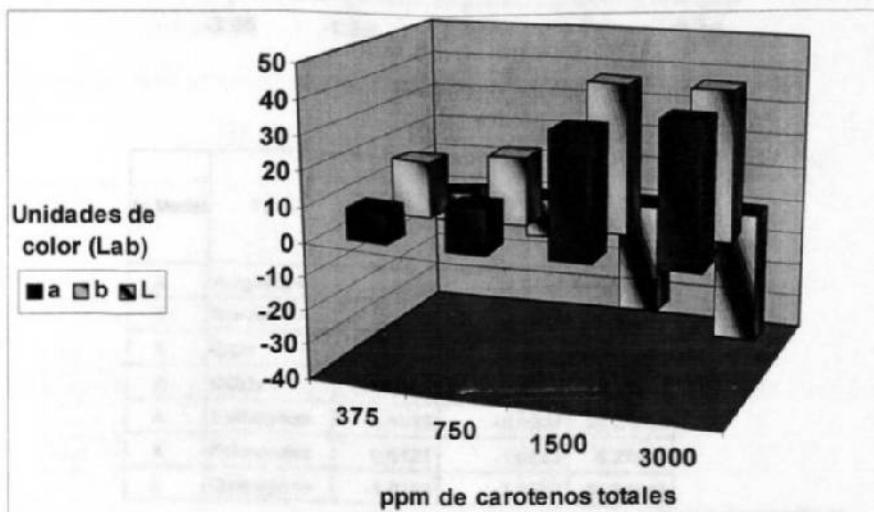
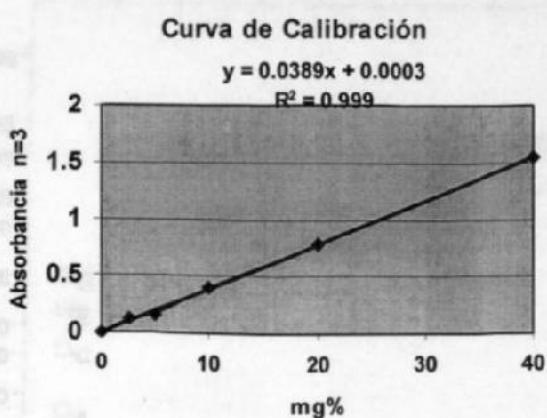
Bajo las condiciones de cultivo en un reactor continuo tipo tanque de 10.5 lt de volumen ocupado, agitado a 600 rpm y con un suministro de aire de 1vvm, la transferencia de oxígeno se ve favorecida por flujos cercanos a los 1500 ml/hr. Esta condición garantiza estabilidad poblacional para la cepa HPPR1. Estudios posteriores para definir los parámetros de rendimiento Y X/S, Y P/S y Y O<sub>2</sub>/S resultan necesarios para evaluar la factibilidad de cultivo de la cepa HPPR1 con fines comerciales.

#### 5. Bibliografía.

- [1] Murdock, D.; Ensley, B.D.; Sardar, C. y M. Thalen. Construction of Metabolic Operons Catalyzing the De Novo Biosynthesis of Indigo in *Escherichia coli*. BioTechnology. 11: 381-386. (1993).
- [2] Downs, J. y D.E.F. Harrison. J. Applied Microbiology. 37: 65. (1974).
- [3] Duysens, L.M.N. . Nature. 168: 548. (1951).
- [4] Merabline, H.; Scott, C.O.B.; Harrison, D.E.F. y S.G. Oliver. The Role of Pigmentation in the Growth and Survival of the Methanol-utilising Bacterium, *Pseudomonas exocorquensis*. 32: 1059-1064. (1982).
- [5] Medrano, H. Comunicación personal. Catedrático del Instituto Tecnológico de Durango, Durango, Dgo. México. (1994).
- [6] Dunn, I.J. y A. Einsele. Oxygen Transfer Coefficients by the Dynamic Method. J. appl. Chem. Biotechnol. 25: 707-720. (1975).
- [7] Tagushi, H. y A. E. Humphrey. "Dynamic Measurement of Volumetric Oxygen Transfer Coefficient in Fermentation Systems". J. Ferment. Technology. 44: 881-889. (1966).
- [8] Lee, J.M. Biochemical Engineering. Prentice Hall International Series. U.S.A. 321 pp. (1992).
- [9] Eisenthal, R. y A. Cornish-Bowden. "The Direct Linear Plot. A new Graphical Procedure for Estimating Enzyme Kinetic Parameters". Biochem J. 139 :715-720. (1974).



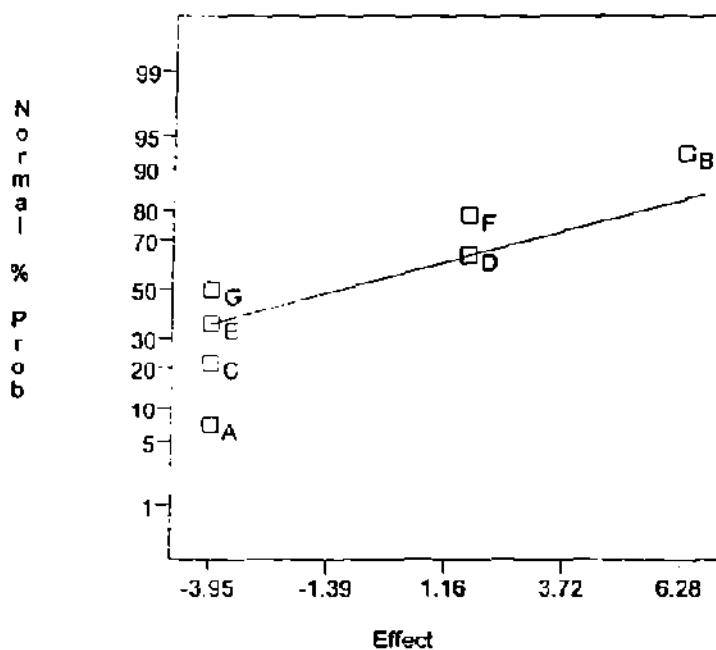
Sistema de valores proporcionados por la Comisión Internacional de Iluminación. Los valores obtenidos se basan en un espacio cromático en coordenadas rectangulares ( $L*a*b$ ) donde  $L$  es la luminosidad;(blanco  $+L$  a negro  $-L$ );  $a$  es la rojizidad (rojo  $+a$  a verde $-a$ ) y  $b$  es la palidez (amarillo  $+b$  a azul  $-b$ ), junto con otras coordenadas cilíndricas ( $L*H*C$ ), estos valores representan respectivamente a la luminosidad o claridad, el tono y la cromaticidad respecto a los colores primarios: rojo, amarillo y azul. El centro blanco corresponde a la mezcla de todos los colores. La ventaja es que se lee directo sin previo tratamiento de la muestra y se elimina la subjetividad del analista. Para su interpretación se utilizan valores tridimensionales a través de un programa computarizado.



Curva patrón de biomasa pigmentada *Phaffia rodozyma*,  
 ppm de carotenos totales/ unidades de color (Lab).

**DESIGN-EASE Analysis**

**Response 1**



In Model	Term	Coefficient	Standardized Effect	Sum of Squares
X	A:agitacion	-1.9753	-3.9507	31.21588
X	B.VVM	3.1386	6.2771	78.80427
X	C:pH	-1.9753	-3.9507	31.21588
X	D:zdo. i	0.8121	1.6243	5.27648
X	E:vitaminas	-1.9753	-3.9507	31.21588
X	F:minerales	0.8121	1.6243	5.27648
X	G:nitrogeno	-1.9753	-3.9507	31.21588

Std	Own Id	Run	Block	agitacion rpm Factor	VVM cc / min Factor	pH iones H Factor	Zdo. i ug/l Factor	vitaminas vg/l Factor	minerales ug/l Factor	nitrogeno ug/l Factor	Response 1 ppm Response	Response 2 gr/l Response
3	3	1	1	500.00	0.50	3.00	0.00	1.00	1.00	1.00	100.00	2.03
6	6	2	1	700.00	0.50	3.00	1.00	1.00	0.00	0.00	100.00	2.16
5	5	3	1	500.00	1.00	3.00	1.00	0.00	1.00	0.00	2600.00	2.01
2	2	4	1	700.00	1.00	3.00	0.00	0.00	0.00	1.00	200.00	2.91
4	4	5	1	500.00	0.50	4.00	1.00	0.00	0.00	1.00	100.00	2.02
5	5	6	1	700.00	0.50	4.00	0.00	0.00	1.00	0.00	100.00	1.82
7	7	7	1	500.00	1.00	4.00	0.00	1.00	0.00	0.00	200.00	2.54
1	1	8	1	700.00	1.00	4.00	1.00	1.00	1.00	1.00	100.00	1.99

**Analysis of Response 1**

SOURCE	SUM OF SQUARES	DF	MEAN SQUARE	F VALUE	PROB > F
MODEL	411250.00	3	411250.0	3.02	0.3510
RESIDUAL	5347500.00	6	891250.0		
COR TOTAL	6256750.00	7			
ROOT MSE	744.06		R-SQUARED	0.15	
DEP MEAN	462.50		ADJ R-SQUARED	0.00	
C.V. %	204.12		PRED R-SQUARED	-0.52	

Predicted Residual Sum of Squares (PRESS) = 750666.7

FACTOR	COEFFICIENT ESTIMATE	DF	STANDARD ERROR	T FOR HO COEFFICIENT=0	PROB >  T
INTERCEPT	462.5000	3	333.7757		
A	-337.5000	1	333.7757	-1.01	0.3510

Final Equation in Terms of Coded Factors

Response 1 =  
 - 462.500  
 - 337.500 \* A

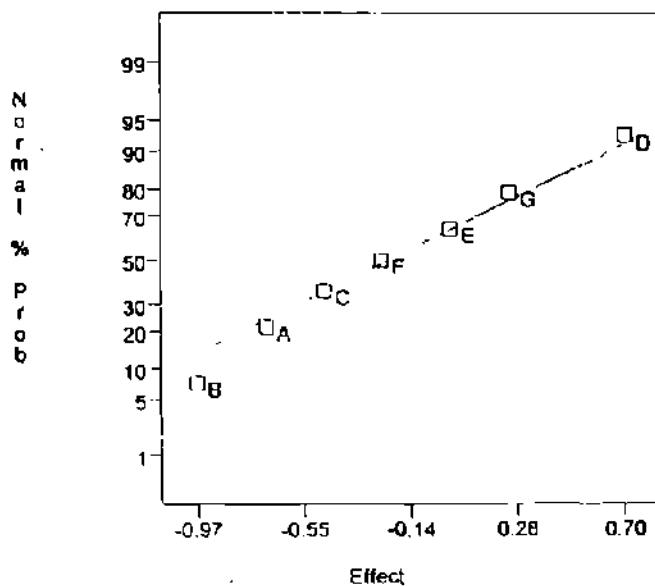
Final Equation in Terms of Uncoded Factors

Response 1 =  
 - 2487.500  
 - 3.375 \* agitacion

OBJS ORD	ACTUAL VALUE	PREDICTED VALUE	RESIDUAL	LEVER	STUDENT DIST	COOK'S DIST	OUTLIER T VALUE	RUN ORD
1	1.00E+02	1.25E+02	-2.50E+01	0.250	-0.031	0.000	-0.028	8
2	2.00E+02	1.25E+02	7.50E+01	0.250	0.032	0.001	0.064	4
3	1.00E+02	8.00E+02	-7.00E+02	0.250	-0.036	0.122	-0.034	3
4	1.00E+02	8.00E+02	-7.00E+02	0.250	-0.036	0.122	-0.034	5
5	1.00E+02	1.25E+02	-2.50E+01	0.250	-0.031	0.000	-0.028	1
6	1.00E+02	1.25E+02	-2.50E+01	0.250	-0.031	0.000	-0.028	2
7	2.00E+02	8.00E+02	-6.00E+02	0.250	-0.734	0.010	-0.702	7
8	2.00E+03	8.00E+02	2.00E+03	0.250	2.446	0.717	43.384	9

**DESIGN-EASE Analysis**

**Response 1**



	Term	Coefficient	Standardized Effect	Sum of Squares
A: Atemp.	-0.34977	-0.69953	0.978694	
B: BpH	-0.45569	-0.97137	1.887134	
C: VVM	-0.23581	-0.47162	0.444847	
D: agitacion	0.34977	0.69953	0.978694	
E: NP	0.01098	0.02196	0.000966	
F: flujo	-0.12494	-0.24988	0.124878	
G: LRM	0.12494	0.24988	0.124878	

Seq	Run	Block	Atemp grados C Factor	BpH pH Factor	VVM cc./min Factor	agitacion rpm Factor	NP propetas Factor	Bufo L/min Factor	LRM LRM Factor	Response 1 ppm Response	Response 2 gr 1 Response	
4	4	1	11	20.00	3.50	1.00	300.00	3.00	600.00	1.00	2800.00	1.19
2	2	2	1	25.00	3.50	1.00	400.00	3.00	400.00	0.00	2800.00	1.38
9	8	3	1	20.00	4.50	1.00	400.00	2.00	600.00	0.00	800.00	1.09
5	5	4	1	25.00	4.50	1.00	300.00	2.00	400.00	1.00	100.00	1.21
3	3	5	1	20.00	3.50	1.50	400.00	2.00	400.00	1.00	6000.00	1.22
6	6	6	1	25.00	3.50	1.50	300.00	2.00	600.00	0.00	100.00	1.23
7	7	7	1	20.00	4.50	1.50	300.00	3.00	400.00	0.00	100.00	1.26
1	1	8	1	25.00	4.50	1.50	400.00	3.00	600.00	1.00	100.00	1.35

-----  
Analysis of pigmento  
-----

SOURCE	SUM OF SQUARES	DF	MEAN SQUARE	F VALUE	PROB > F
MODEL	261.8019	4	66.200	7.24	0.0079
RESIDUAL	27.4424	3	9.147		
COR TOTAL	292.2443	7			
ROOT MSE	3.0243		R-SQUARED	0.91	
DEP MEAN	-1.8205		ADJ R-SQUARED	0.76	
C.V. %	-79.1690		FRED R-SQUARED	0.37	

Predicted Residual sum of Squares (PRESS) = 193.146

FACTOR	COEFFICIENT ESTIMATE	DF	STANDARD ERROR	t FOR FE	PROB >  t
INTERCEPT	-1.820520	1	1.069314		
A	-3.071346	1	1.069314	-2.80	0.0630
B	-3.492303	1	1.069314	-3.27	0.0469
C	3.074346	1	1.069314	2.84	0.0630
D	1.413026	1	1.069314	1.32	0.2781

Final Equation in Terms of Coded Factors

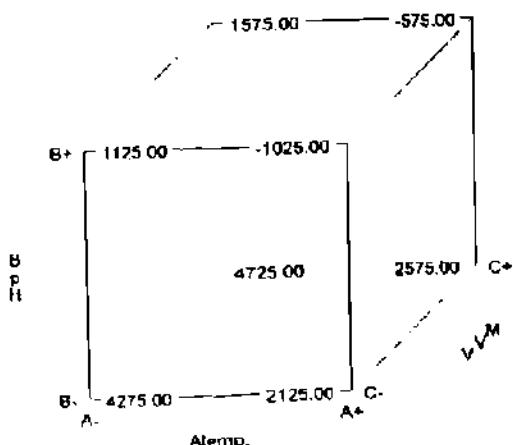
$$\text{Logit(pigmento)} = 1.82052 \\ - 3.07435 \cdot A \\ - 3.49231 \cdot B \\ + 3.07435 \cdot C \\ + 1.41303 \cdot D$$

Final Equation in Terms of Uncoded Factors

$$\text{Logit(pigmento)} = 26.83639 \\ - 1.22974 \cdot \text{temp} \\ - 6.38581 \cdot \text{pwt} \\ + 0.06143 \cdot \text{cyl} \\ + 2.82645 \cdot \text{l1q}$$

OBS	ACTUAL VALUE	PREDICTED VALUE	RESIDUAL	LEVER	STUDENT RESID	COOK'S DIST	OUTLIER T VALUE	RUN ORD
1	-8.97	-7.89	-1.085	0.625	-0.386	0.114	-0.508	6
2	-0.66	-1.74	1.065	0.625	0.586	0.114	0.508	2
3	-2.33	-2.58	0.248	0.625	0.131	0.006	0.110	3
4	-8.97	-8.73	-0.248	0.625	-0.134	0.006	-0.110	7
5	-0.66	1.09	-1.741	0.625	-0.940	0.294	-0.914	1
6	-8.97	-12.05	3.074	0.625	1.660	0.918	4.746	4
7	-8.97	-5.90	-3.074	0.625	-1.660	0.918	-4.746	8
8	8.97	7.23	1.741	0.625	0.940	0.294	0.914	5

DESIGN-EASE Analysis  
Predicted Response 1



Analysis of Response 2

SOURCE	SUM OF SQUARES	DF	MEAN SQUARE	F VALUE	P>F
MODEL	0.004730	1	0.004730	0.07	0.8068
RESIDUAL	0.873336	6	0.145556		
COR TOTAL	0.878066	7			
Root MSE	0.385862		R-SQUARED	0.03	
DEP MEAN	2.193375		ADJ R-SQUARED	-0.15	
C.V. %	17.606203		PRED R-SQUARED	-0.76	

Predicted Residual Sum of Squares (PRESS) = 3.588152

FACTOR	COEFFICIENT ESTIMATE	STANDARD ERROR	T FOR H0 COEFFICIENT=0	P>F
INTERCEPT	2.193375	1 0.136423	0.26	0.8068

Final Equation in Terms of Coded Factors

Response 2 = 2.193375 + 0.036475 \* A

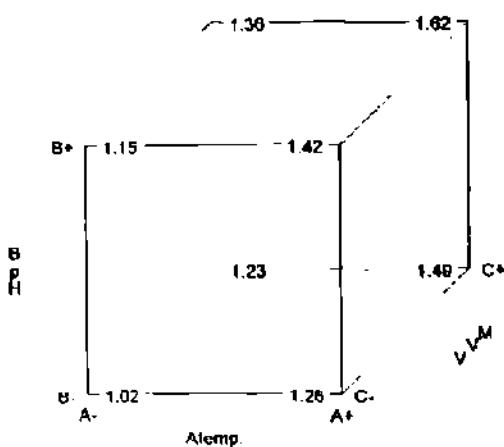
Final Equation in Terms of Uncoded Factors

Response 2 = 1.762325 + 0.000374 \* agitation

DATA ORD	ACTUAL VALUE	PREDICTED VALUE	RESIDUAL	LEVER	STUDENT TCSID	COKER'S DIST	OUTLIER	RUN ORD
1	2.17	2.23	-0.056	0.250	-0.675	0.083	-0.162	8
2	2.15	2.23	-0.087	0.250	-0.555	0.704	3.348	4
3	2.03	2.16	-0.124	0.250	-0.373	0.023	+0.394	1
4	2.02	2.16	-0.130	0.250	-0.420	0.024	-0.370	5
5	1.42	2.23	-0.806	0.250	-1.216	0.246	-1.276	6
6	2.18	2.23	-0.044	0.250	-0.144	0.003	-0.132	2
7	2.14	2.16	0.386	0.250	1.160	0.324	1.202	7
8	2.03	2.16	-0.123	0.250	-0.367	0.022	-0.336	3

DESIGN-EASE Analysis

Predicted Response2 = 2



acuari no.	dietas	x D	x14	incp14	n14	cons14	tc14	tcg14	sob14	n28	x 28	inp28	cons28	tc28	tcg28	sob28			
A8	6	HPPR1	4	10	0.5573	0.5769	0.1218	10	0.2448	21.62	2.01	100	9	0.808	0.25	0.56476	44.931	2.25	90
B9	17	HPPR1	4	10	0.5706	0.8028	0.2322	9	0.5221	40.69	2.25	90	9	1.104	0.53	0.88924	93.440	1.67	90
C2	21	HPPR1	4	10	0.5828	0.7862	0.2034	10	0.2758	34.90	1.38	100	8	0.990	0.41	0.42886	69.912	1.05	80
D1	27	HPPR1	4	10	0.6126	0.7867	0.1741	9	0.5771	28.42	3.31	90	8	0.904	0.29	0.9731	47.547	3.34	80
PR	0.5908	0.7637	0.18	9.50	0.40	31.46	2.23	95.00	8.50	0.95	0.3706	0.7139	63.958	2.0786	85.0				
DE	0.02	0.06	0.05	0.58	0.17	8.15	0.81	5.77	0.58	0.13	0.26	22.63	0.97	5.77					
		2.32	3.05	0.73	38.0				34.0	3.81	1.48	2.86	255.83	8.31					

Biox pigment y antioxidante

acuari no.	dietas	no	x D	x0	x14	incp14	n14	cons14	tc14	tcg14	sob14	n28	x 28	inp28	cons28	tc28	tcg28	sob28	
9A	1	Control	1	10	0.5307	0.7425	0.2118	8	0.3021	39.91	1.43	80	7	0.867	0.34	0.6107	63.369	1.82	70
10B	7	Control	1	10	0.5554	0.6448	0.0894	9	0.0765	16.10	0.86	90	9	0.76	0.20	0.2028	36.874	0.99	90
4C	12	Control	1	7	0.6373	0.8146	0.1773	7	0.2501	27.82	1.41	100	6	0.971	0.33	0.6573	52.314	2.00	60
12B	16	Control	1	10	0.5425	0.6737	0.1312	9	0.1638	24.18	1.25	90	7	0.957	0.41	0.5493	76.7369	1.33	70
9D	20	Control	1	9	0.5287	0.5314	0.0027	9	0.1690	0.51	62.60	100	7	0.602	0.07	0.23994	13.864	4.08	70
				0.05	0.6814	0.1225	8.40	0.1923	21.704	13.509	92.000	7.20	0.831	0.2724	0.4559	48.558	2.0437	72.0	
				0.11	0.08	0.89	0.09	14.63	27.45	8.37	1.10	0.15	0.13	0.20	24.22	1.21	110		
				34.0							29.0								

cuari no.	dieta	iet no	x D	x14	incp14	n14	cons14	tc14	tcg14	sob14	n28	x 28	inp28	cons28	tc28	tcg28	sob28		
A4	11	Phaffia	3	7	2.8562	3.8669	0.45	7	2.3	35.55	5.10	100	7	4.40	1.54	4.76	54.089	3.08	100
A12	6	Phaffia	3	7	2.3000	2.913	0.50	7	2.36	26.65	4.72	100	7	3.63	1.33	5.13	58.020	3.85	100
B5	14	Phaffia	3	7	2.4342	3.15	0.77	6	2.59	29.41	3.36	86	5	3.65	1.22	5.48	49.947	4.49	72
D7	1	Phaffia	3	7	2.7641	3.466	0.87	7	2.39	25.39	2.75	100	7	4.15	1.41	5.34	50.429	3.79	100
PR	2.5881	3.3495	0.6478	6.7500	2.4110	29.252	3.9826	97	6.50	3.9600	1.3759	5.1725	53.1150	3.8017	93				
DE	0.26	0.41	0.20	0.50	0.13	4.52	1.11	7	1.00	0.38	0.14	0.31	3.74	0.58	14				
				27.0							26.0								

cuari no.	dieta	iet no	x D	x14	incp14	n14	cons14	tc14	tcg14	sob14	n28	x 28	inp28	cons28	tc28	tcg28	sob28		
A8	7	HPPR1	2	7	2.4810	2.932	0.4506	6	2.12	18.16	4.71	86	5	3.20	0.72	3.853	28.839	5.38	72
B9	3	HPPR1	2	7	2.7600	3.281	0.5010	7	2.47	18.02	4.93	100	7	3.34	0.58	5.3	20.144	9.46	100
C2	5	HPPR1	2	7	2.7071	3.498	0.7909	7	2.62	29.22	3.31	100	7	4.01	1.30	4.62	48.129	3.55	100
D1	10	HPPR1	2	7	2.9630	3.75	0.8700	7	2.46	3C.21	2.83	100	7	3.96	1.08	4.84	37.500	4.48	100
PR	2.7721	3.3653	0.6551	6.7500	2.4118	23.901	3.9444	97	6.50	3.6268	0.946	4.6533	33.6529	5.7190	44				
DE	0.17	0.21	0.50	0.21	5.72	1.03	7	1.00	0.42	0.34	0.60	1.97	2.61	14.51	26.0				
				27.0							26.0								

cuari no.	dieta	iet no	x D	x14	incp14	n14	cons14	tc14	tcg14	sob14	n28	x 28	inp28	cons28	tc28	tcg28	sob28		
A1	9	Control	1	7	2.8100	3.778	0.9630	6	2.94	34.45	3.04	86	6	4.77	1.95	6.63	69.639	3.39	86
A9	8	Control	1	7	2.5420	3.59	1.0490	6	2.33	41.23	2.22	86	6	4.49	1.94	5.6	76.436	2.88	86
B2	2	Control	1	7	2.4642	3.18	0.7158	7	2.36	29.05	3.30	100	7	3.94	1.50	4.9	59.890	3.27	100
B8	12	Control	1	7	2.1757	2.94	0.7643	6	2.89	35.13	3.78	86	6	3.96	1.78	4.7	52.010	2.63	86
				25.0	2.4930	3.3720	0.8740	6.2500	2.6300	34.963	3.0847	90	625	4.2878	1.7958	5.4575	71.9851	3.0431	84.5
				25.0	0.38	0.16	0.50	0.33	4.98	0.65	7.30	0.50	0.41	0.21	0.87	9.53	0.35	7	

## T-Test

### Group Statistics

TRATAMIE	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
CRECTS24	4	85.0000	3.7733	2.8868
CONTROL	5	72.0000	10.6455	4.8890

### Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						95% Confidence Interval of the Difference	
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower		Upper
CRECTS24	341	.578	2.129	7	.071	13.0000	6.1062	-4.4358	27.4288	
Equal variances assumed			2.268	8.256	.061	13.0000	6.6862	-7.7716	26.7776	

### Group Statistics

TRATAMIE	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
CRECTS24	4	95.0000	5.7715	2.8868
CONTROL	5	92.0000	8.3665	3.7417

### Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						95% Confidence Interval of the Difference	
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower		Upper
CRECTS14	406	.548	8.07	7	.563	3.0000	4.8425	-8.6172	14.6472	
Equal variances assumed			8.33	6.913	.566	3.0000	4.7258	-8.2043	14.2043	
Equal variances not assumed										

2)

## T-Test

### Group Statistics

TRATAMIE	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
CRECTC14	4	31.9575	8.1488	4.0743
CONTROL	5	21.7040	14.6234	6.3408

### Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						95% Confidence Interval of the Difference	
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower		Upper
CRECTC14	.434	.806	1.184	7	.275	9.7535	6.2345	-8.7181	28.2251	
Equal variances assumed			1.086	6.416	.250	9.7535	7.7058	-6.8061	28.3451	
Equal variances not assumed										

### Group Statistics

TRATAMIE	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
CRECTC24	4	63.9575	22.6267	11.3133
CONTROL	5	44.3560	24.2237	10.6341

### Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						95% Confidence Interval of the Difference	
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower		Upper
CRECTC24	.012	.816	.975	7	.362	15.4015	15.8003	-21.8503	52.7633	
Equal variances assumed			.981	8.781	.359	15.4015	15.6643	-21.9054	52.7088	
Equal variances not assumed										

3)

## T-Test

Group Statistics

TRATAMIE	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
CRETCATA	4	2.2323	.8108	.0504
CONTROL	5	13.5100	27.4431	12.2729

Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances			Test for Equality of Means					95% Confidence Interval of the Difference	
	F	Sig.	1	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference		
								Lower	Upper	
CRETCATA	5.222	.058		7	.445	-11.2775	13.9207	-44.1948	21.6368	
Equal variances assumed										
Equal variances not assumed										

Group Statistics

TRATAMIE	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
CRETCATA	4	2.0775	.9728	.4870
CONTROL	5	2.0460	1.2080	.5394

Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances			Test for Equality of Means					95% Confidence Interval of the Difference	
	F	Sig.	1	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference		
								Lower	Upper	
CRETCATA	.044	.833		7	.943	3.350E-02	.7463	-1.7312	1.7382	
Equal variances assumed										
Equal variances not assumed										

H

## T-Test

Group Statistics

TRATAMIE	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
CRECORTA	4	4038	1709	8.947E-02
CONTROL	5	1910	8.665E-02	3.875E-02

Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances			Test for Equality of Means					95% Confidence Interval of the Difference	
	F	Sig.	1	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference		
								Lower	Upper	
CRECORTA	10.182	.013		2.446	.044	.3128	.0495E-02	7.002E-03	.4184	
Equal variances assumed										
Equal variances not assumed										

Group Statistics

TRATAMIE	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
CRECORTA	4	7.125	2.586	.294
CONTROL	5	4.660	2.048	.9.158E-02

Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances			Test for Equality of Means					95% Confidence Interval of the Difference	
	F	Sig.	1	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference		
								Lower	Upper	
CRECORTA	1.034	.343		1.601	.153	.2488	.1832	-.1175	.5105	
Equal variances assumed										
Equal variances not assumed										

## T-Test

### Group Statistics

	TRATAMIE	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
CREINC14	HPPR <sub>1</sub>	4	.1800	4.690E-02	2.345E-02
	CONTROL	5	.1202	7.998E-02	3.577E-02

### Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances			t-test for Equality of Means					
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
CREINC14	Equal variances assumed	1.011	.348	1.315	.230	5.980E-02	4.549E-02	-4.78E-02	,1674
	Equal variances not assumed			1.398	.207	5.980E-02	4.277E-02	-4.271E-02	,1623

### Group Statistics

	TRATAMIE	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
CREINC28	HPPR <sub>1</sub>	4	.3700	.1265	6.325E-02
	CONTROL	5	.2700	.1351	6.042E-02

### Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances				t-test for Equality of Means					
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference		
CREINC28	Equal variances assumed	.044	.840	1.134	.7	.294	1.000E-01	8.820E-02	-,1086	,3086
	Equal variances not assumed			1.143	.292	1.000E-01	8.746E-02	-,1084	,3084	

PCT1514

ANOVA

Oneway

Descriptives

				95% Confidence Interval for Mean			
				Lower Bound		Upper Bound	
				Mean		Minimum Maximum	
PHENYL	N	Mean	Descript.	Sum	95% CI Lower Bound	95% CI Upper Bound	
HPPA	4	36.5000	7.0000	3	35.5000	37.5000	
CONTROL	6	36.5000	7.0000	1	35.5000	37.5000	
Total	12	36.5000	7.0000	2	35.5000	37.5000	

PCT1515

ANOVA

Oneway

Descriptives

				95% Confidence Interval for Mean			
				Lower Bound		Upper Bound	
				Mean		Minimum Maximum	
PHENYL	N	42.5000	7.0000	1	41.5000	43.5000	
HPPA	4	42.5000	7.0000	2	41.5000	43.5000	
CONTROL	6	42.5000	7.0000	3	41.5000	43.5000	
Total	12	42.5000	7.0000	4	41.5000	43.5000	

PCT1516

ANOVA

ANOVA

Descriptives

				95% Confidence Interval for Mean			
				Lower Bound		Upper Bound	
				Mean		Minimum Maximum	
PHENYL	N	36.5000	7.0000	3	35.5000	37.5000	
HPPA	4	36.5000	7.0000	1	35.5000	37.5000	
CONTROL	6	36.5000	7.0000	2	35.5000	37.5000	
Total	12	36.5000	7.0000	4	35.5000	37.5000	

				95% Confidence Interval for Mean			
				Lower Bound		Upper Bound	
				Mean		Minimum Maximum	
PHENYL	N	36.5000	7.0000	3	35.5000	37.5000	
HPPA	4	36.5000	7.0000	1	35.5000	37.5000	
CONTROL	6	36.5000	7.0000	2	35.5000	37.5000	
Total	12	36.5000	7.0000	4	35.5000	37.5000	

a Used Hartree's Median Summation Rule = 4000

				95% Confidence Interval for Mean			
				Lower Bound		Upper Bound	
				Mean		Minimum Maximum	
PHENYL	N	36.5000	7.0000	3	35.5000	37.5000	
HPPA	4	36.5000	7.0000	1	35.5000	37.5000	
CONTROL	6	36.5000	7.0000	2	35.5000	37.5000	
Total	12	36.5000	7.0000	4	35.5000	37.5000	

a Used Hartree's Median Summation Rule = 4000

### One-way

PLC14 Descriptives

PLC14	N	Mean	Std. Deviation	95% Confidence Interval		Lower Bound	Upper Bound	Minimum	Maximum				
				95% Confidence Interval									
				Lower	Upper								
PHARMA	4	20.5200	4.5221	2.2015	22.0287	18.4473	23.39	36.55					
HPPR <sup>1</sup>	4	23.8275	4.7241	3.3600	19.2010	14.9230	18.02	20.21					
CONTROL	4	24.9550	4.9043	2.6912	27.0318	12.1061	20.05	41.23					
Total	12	24.3725	6.5518	22.0132	27.2268	18.02	41.23						

Test of Homogeneity of Variances

PLC14	Levene Statistic	df1		df2		Sig.	
		df1	df2	df1	df2	Sig.	
PLC14	2.599	2	9	2.12	9		

ANOVA

PLC14	Treatment	N	Sum of Squares		df	Mean Square	95% Confidence Interval		Lower Bound	Upper Bound	Minimum	Maximum				
			Sum of Squares				Sum of Squares									
	Between Groups	Within Groups	Between Groups	Within Groups			F	Sig.								
PHARMA	4	24.3725	6.5518	122.424	4.059	31.063	17.771	.001								
HPPR <sup>1</sup>	4	23.8275	4.7241	105.322	1.215	25.825	0.170	.875								
CONTROL	4	24.9550	4.9043	119.825	1.072	29.950	0.077	.933								
Total	12	24.3725	6.5518	221.649	11	20.142										

ANOVA

### One-way

PLC14 Descriptives

PLC14	N	Mean	Std. Deviation	95% Confidence Interval		Lower Bound	Upper Bound	Minimum	Maximum				
				95% Confidence Interval									
				Lower	Upper								
PHARMA	4	23.8275	4.7241	11.8753	14.8811	47.1175	52.2443	49.99	58.50				
HPPR <sup>1</sup>	4	23.8275	4.7241	11.8753	14.8811	42.7062	20.14	48.13					
CONTROL	4	24.9550	4.9043	9.5030	11.6117	41.1617	56.89	42.01					
Total	12	24.3725	6.5518	18.2987	17.2852	44.5398	20.14	42.01					

Test of Homogeneity of Variances

PLC14	Levene Statistic	df1		df2		Sig.	
		df1	df2	df1	df2	Sig.	
PLC14	2.227	2	9	3.94	9		

ANOVA

PLC14	Treatment	N	Sum of Squares		df	Mean Square	95% Confidence Interval		Lower Bound	Upper Bound	Minimum	Maximum				
			Sum of Squares				Sum of Squares									
	Between Groups	Within Groups	Between Groups	Within Groups			F	Sig.								
PHARMA	4	23.8275	4.7241	11.8753	1	11.8753	14.8811	.001								
HPPR <sup>1</sup>	4	23.8275	4.7241	11.8753	1	11.8753	14.8811	.001								
CONTROL	4	24.9550	4.9043	9.5030	1	9.5030	11.6117	.001								
Total	12	24.3725	6.5518	22.0225	11	2.0020	20.912	.001								

PLC14

Notes for group in homogeneity of variances analysis

\* Using Harmonic Mean Sample Size = 4000

### One-way

PICTURE 14

Descriptives

	N	Mean	95% Confidence Interval			Lower Bound	Upper Bound	Minimum	Maximum				
			For Men										
			Lower	Upper									
PHAFFIA	4	3.9875	1.1104	6.6612		1.0231	5.1046	2.9611	6.9669				
HPPR1	4	3.0450	0.5521	5.5231		0.5251	3.2655	4.2422	7.27				
CONTROL	4	3.0190	0.5521	5.5231		0.5251	3.2655	4.2422	7.27				
Total	12	3.1570	0.9630	5.2700		0.8057	4.2036	2.22	3.78				

Test of Homogeneity of Variances

PICTURE 14

ANOVA

Levene's Test

F

p = .59

Sig.

.59

df

2

Sum of Squares

2.062

df

2

Mean Square

1.031

F

1.334

df

2

Significance

.384

df

2

Mean

.59

df

2

Significance

.384

df

2

Mean

.59

df

2

Page 1

### One-way

PICTURE 15

Descriptives

	N	Mean	95% Confidence Interval			Lower Bound	Upper Bound	Minimum	Maximum				
			For Men										
			Lower	Upper									
PHAFFIA	4	6.7175	2.8495	10.5022		1.5732	9.9818	3.85	9.69				
HPPR1	4	6.0425	3.3507	11.54		2.4846	3.0006	2.83	3.36				
CONTROL	4	6.0425	3.3507	11.54		2.4846	3.0006	2.83	3.36				
Total	12	6.4185	1.8319	12.29		3.0225	8.3115	2.83	9.46				

Test of Homogeneity of Variances

PICTURE 15

ANOVA

Levene's Test

F

p = .882

Sig.

.882

df

2

Sum of Squares

15.203

df

2

Mean Square

7.600

F

3.160

df

2

Significance

.056

df

2

Mean

.59

df

2

Significance

.056

df

2

Mean

.59

df

2

Significance

.056

Notes for groups in homogeneity of variances test are displayed

\* Used Harmonic Mean Sample Size = 4 DOF

5

Page 1

Parameter	N	Mean	SD	SE Err.	95% Confidence Interval		
					Lower Bound	Upper Bound	Mean Range
Prepulse抑止	4	5.175	0.770	1.533	3.039	7.310	3.750-7.310
Prepulse抑制	6	0.828	0.684	0.257	0.118	1.535	0.118-1.535
Condition	6	0.673	0.717	0.188	0.048	1.301	0.048-1.301
Total	12	0.892	0.724	0.193	0.099	1.623	0.099-1.623

Between Groups		Components		Sum of Squares		df		Mean Square		Sig.	
		Unadjusted	Adjusted	Total	Within	Treatment	Error	Between	Within	F	Sig. F
With n Groups				2	6.64E-02	1	6.64E-02	6.64E-02	4.98E-02	1.37	.372
Total				1	6.64E-02	1	6.64E-02	6.64E-02	4.98E-02	1.15	.223
Total				1	6.64E-02	1	6.64E-02	6.64E-02	4.98E-02	1.15	.223

Tumor-Size mm <sup>2</sup>	Tissue Name	N	Relative No. Dose
			100
100-150	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	4.625
150-200	SIG.	4	5.125
200-250	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	5.625
250-300	SIG.	4	6.125
300-350	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	6.625
350-400	SIG.	4	7.125
400-450	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	7.625
450-500	SIG.	4	8.125
500-550	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	8.625
550-600	SIG.	4	9.125
600-650	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	9.625
650-700	SIG.	4	10.125
700-750	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	10.625
750-800	SIG.	4	11.125
800-850	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	11.625
850-900	SIG.	4	12.125
900-950	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	12.625
950-1000	SIG.	4	13.125
1000-1050	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	13.625
1050-1100	SIG.	4	14.125
1100-1150	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	14.625
1150-1200	SIG.	4	15.125
1200-1250	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	15.625
1250-1300	SIG.	4	16.125
1300-1350	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	16.625
1350-1400	SIG.	4	17.125
1400-1450	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	17.625
1450-1500	SIG.	4	18.125
1500-1550	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	18.625
1550-1600	SIG.	4	19.125
1600-1650	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	19.625
1650-1700	SIG.	4	20.125
1700-1750	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	20.625
1750-1800	SIG.	4	21.125
1800-1850	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	21.625
1850-1900	SIG.	4	22.125
1900-1950	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	22.625
1950-2000	SIG.	4	23.125
2000-2050	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	23.625
2050-2100	SIG.	4	24.125
2100-2150	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	24.625
2150-2200	SIG.	4	25.125
2200-2250	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	25.625
2250-2300	SIG.	4	26.125
2300-2350	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	26.625
2350-2400	SIG.	4	27.125
2400-2450	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	27.625
2450-2500	SIG.	4	28.125
2500-2550	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	28.625
2550-2600	SIG.	4	29.125
2600-2650	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	29.625
2650-2700	SIG.	4	30.125
2700-2750	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	30.625
2750-2800	SIG.	4	31.125
2800-2850	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	31.625
2850-2900	SIG.	4	32.125
2900-2950	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	32.625
2950-3000	SIG.	4	33.125
3000-3050	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	33.625
3050-3100	SIG.	4	34.125
3100-3150	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	34.625
3150-3200	SIG.	4	35.125
3200-3250	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	35.625
3250-3300	SIG.	4	36.125
3300-3350	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	36.625
3350-3400	SIG.	4	37.125
3400-3450	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	37.625
3450-3500	SIG.	4	38.125
3500-3550	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	38.625
3550-3600	SIG.	4	39.125
3600-3650	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	39.625
3650-3700	SIG.	4	40.125
3700-3750	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	40.625
3750-3800	SIG.	4	41.125
3800-3850	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	41.625
3850-3900	SIG.	4	42.125
3900-3950	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	42.625
3950-4000	SIG.	4	43.125
4000-4050	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	43.625
4050-4100	SIG.	4	44.125
4100-4150	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	44.625
4150-4200	SIG.	4	45.125
4200-4250	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	45.625
4250-4300	SIG.	4	46.125
4300-4350	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	46.625
4350-4400	SIG.	4	47.125
4400-4450	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	47.625
4450-4500	SIG.	4	48.125
4500-4550	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	48.625
4550-4600	SIG.	4	49.125
4600-4650	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	49.625
4650-4700	SIG.	4	50.125
4700-4750	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	50.625
4750-4800	SIG.	4	51.125
4800-4850	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	51.625
4850-4900	SIG.	4	52.125
4900-4950	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	52.625
4950-5000	SIG.	4	53.125
5000-5050	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	53.625
5050-5100	SIG.	4	54.125
5100-5150	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	54.625
5150-5200	SIG.	4	55.125
5200-5250	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	55.625
5250-5300	SIG.	4	56.125
5300-5350	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	56.625
5350-5400	SIG.	4	57.125
5400-5450	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	57.625
5450-5500	SIG.	4	58.125
5500-5550	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	58.625
5550-5600	SIG.	4	59.125
5600-5650	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	59.625
5650-5700	SIG.	4	60.125
5700-5750	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	60.625
5750-5800	SIG.	4	61.125
5800-5850	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	61.625
5850-5900	SIG.	4	62.125
5900-5950	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	62.625
5950-6000	SIG.	4	63.125
6000-6050	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	63.625
6050-6100	SIG.	4	64.125
6100-6150	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	64.625
6150-6200	SIG.	4	65.125
6200-6250	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	65.625
6250-6300	SIG.	4	66.125
6300-6350	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	66.625
6350-6400	SIG.	4	67.125
6400-6450	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	67.625
6450-6500	SIG.	4	68.125
6500-6550	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	68.625
6550-6600	SIG.	4	69.125
6600-6650	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	69.625
6650-6700	SIG.	4	70.125
6700-6750	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	70.625
6750-6800	SIG.	4	71.125
6800-6850	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	71.625
6850-6900	SIG.	4	72.125
6900-6950	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	72.625
6950-7000	SIG.	4	73.125
7000-7050	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	73.625
7050-7100	SIG.	4	74.125
7100-7150	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	74.625
7150-7200	SIG.	4	75.125
7200-7250	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	75.625
7250-7300	SIG.	4	76.125
7300-7350	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	76.625
7350-7400	SIG.	4	77.125
7400-7450	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	77.625
7450-7500	SIG.	4	78.125
7500-7550	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	78.625
7550-7600	SIG.	4	79.125
7600-7650	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	79.625
7650-7700	SIG.	4	80.125
7700-7750	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	80.625
7750-7800	SIG.	4	81.125
7800-7850	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	81.625
7850-7900	SIG.	4	82.125
7900-7950	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	82.625
7950-8000	SIG.	4	83.125
8000-8050	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	83.625
8050-8100	SIG.	4	84.125
8100-8150	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	84.625
8150-8200	SIG.	4	85.125
8200-8250	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	85.625
8250-8300	SIG.	4	86.125
8300-8350	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	86.625
8350-8400	SIG.	4	87.125
8400-8450	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	87.625
8450-8500	SIG.	4	88.125
8500-8550	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	88.625
8550-8600	SIG.	4	89.125
8600-8650	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	89.625
8650-8700	SIG.	4	90.125
8700-8750	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	90.625
8750-8800	SIG.	4	91.125
8800-8850	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	91.625
8850-8900	SIG.	4	92.125
8900-8950	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	92.625
8950-9000	SIG.	4	93.125
9000-9050	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	93.625
9050-9100	SIG.	4	94.125
9100-9150	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	94.625
9150-9200	SIG.	4	95.125
9200-9250	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	95.625
9250-9300	SIG.	4	96.125
9300-9350	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	96.625
9350-9400	SIG.	4	97.125
9400-9450	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	97.625
9450-9500	SIG.	4	98.125
9500-9550	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	98.625
9550-9600	SIG.	4	99.125
9600-9650	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	99.625
9650-9700	SIG.	4	100.125
9700-9750	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	100.625
9750-9800	SIG.	4	101.125
9800-9850	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	101.625
9850-9900	SIG.	4	102.125
9900-9950	PERITONEUM PARENTH. CONTROL	4	102.625
9950-10000	SIG.	4	103.125

TUNING FREQ. KHZ	PULSE PER SECOND	N	SUBJECTS FOR PULSE PER SECOND	
			TRIATANNE	PHAFIA
400	400	4	24100	1
400	24000	4	24100	2
400	400	4	24100	3
400	400	4	24100	4
400	400	4	24100	5
400	24000	4	24100	6
400	400	4	24100	7
400	24000	4	24100	8
400	400	4	24100	9
400	24000	4	24100	10
400	400	4	24100	11
400	24000	4	24100	12
400	400	4	24100	13
400	24000	4	24100	14
400	400	4	24100	15
400	24000	4	24100	16
400	400	4	24100	17
400	24000	4	24100	18
400	400	4	24100	19
400	24000	4	24100	20
400	400	4	24100	21
400	24000	4	24100	22
400	400	4	24100	23
400	24000	4	24100	24
400	400	4	24100	25
400	24000	4	24100	26
400	400	4	24100	27
400	24000	4	24100	28
400	400	4	24100	29
400	24000	4	24100	30
400	400	4	24100	31
400	24000	4	24100	32
400	400	4	24100	33
400	24000	4	24100	34
400	400	4	24100	35
400	24000	4	24100	36
400	400	4	24100	37
400	24000	4	24100	38
400	400	4	24100	39
400	24000	4	24100	40
400	400	4	24100	41
400	24000	4	24100	42
400	400	4	24100	43
400	24000	4	24100	44
400	400	4	24100	45
400	24000	4	24100	46
400	400	4	24100	47
400	24000	4	24100	48
400	400	4	24100	49
400	24000	4	24100	50
400	400	4	24100	51
400	24000	4	24100	52
400	400	4	24100	53
400	24000	4	24100	54
400	400	4	24100	55
400	24000	4	24100	56
400	400	4	24100	57
400	24000	4	24100	58
400	400	4	24100	59
400	24000	4	24100	60
400	400	4	24100	61
400	24000	4	24100	62
400	400	4	24100	63
400	24000	4	24100	64
400	400	4	24100	65
400	24000	4	24100	66
400	400	4	24100	67
400	24000	4	24100	68
400	400	4	24100	69
400	24000	4	24100	70
400	400	4	24100	71
400	24000	4	24100	72
400	400	4	24100	73
400	24000	4	24100	74
400	400	4	24100	75
400	24000	4	24100	76
400	400	4	24100	77
400	24000	4	24100	78
400	400	4	24100	79
400	24000	4	24100	80
400	400	4	24100	81
400	24000	4	24100	82
400	400	4	24100	83
400	24000	4	24100	84
400	400	4	24100	85
400	24000	4	24100	86
400	400	4	24100	87
400	24000	4	24100	88
400	400	4	24100	89
400	24000	4	24100	90
400	400	4	24100	91
400	24000	4	24100	92
400	400	4	24100	93
400	24000	4	24100	94
400	400	4	24100	95
400	24000	4	24100	96
400	400	4	24100	97
400	24000	4	24100	98
400	400	4	24100	99
400	24000	4	24100	100

• यह हमें अपनी जिम्मेदारी का लिया गया विषय है।

■ Diese Hersteller-Namen-Symbole-Sätze = 600

四

3

Lemuel

Онлайн

માર્ગદર્શિકા

દ્વારા

### Oneway

#### P1GNC28 Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		
PHAFIA	4	1.750	1.348	.679E-02	Lower Bound	Upper Bound	Minimum Maximum
HPR1	4	8150	334	162	1.1805	1.695	1.22 1.54
CONTROL	4	1.780	2125	1083	.377	1.4503	1.10 1.32
Total	12	1.3817	4348	1256	1.0054	1.3179	1.50 1.68

#### P1GNC28 Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3.472	2	9	.091

#### P1GNC28 ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	353.3	2	177.5	13.172	.002
Lens Term	1.187	1	1.187	5.987	.037
Within Groups	530.9	9	58.9E-02	20.347	.001
Total	2.079	11			

#### P1GNC28

		Subset or Subsets = 0.95		
		1	2	3
Tukey-HSD <sup>a</sup>	PHAFIA	4	8150	1.3750
PHAFIA	CONTROL	4	1.3750	1.7800
Sig.	Sig.	0.09	0.085	
Duncan <sup>b</sup>	HPR1	4	8150	1.3750
PHAFIA	CONTROL	4	1.7800	1.9000
Sig.	Sig.			

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

b. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

### Oneway

#### P1GNC14 Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		
PHAFIA	4	8475	203	.1022	Lower Bound	Upper Bound	Minimum Maximum
HPR1	4	8525	205	.1043	32.07	9843	45 87
CONTROL	4	8725	184	.8195E-02	6.75	1.125	71 105
Total	12	7742	2062	.5859E-02	5931	3852	45 95

#### P1GNC14 Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.129	2	9	.365

#### P1GNC14 ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	132	2	6.602E-02	17.70	.2225
Lens Term	.101	1	.101	2.713	.134
Within Groups	3.092E-02	9	3.092E-02	8.826	.387
Total	409	11			

#### P1GNC14

		Subset for alpha = .05		
		1	2	3
Tukey-HSD <sup>a</sup>	PHAFIA	4	8475	1.3750
HPR1	CONTROL	4	8525	8725
Sig.	Sig.			
Duncan <sup>b</sup>	PHAFIA	4	8475	8725
PHAFIA	CONTROL	4	8525	8725
Sig.	Sig.			

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

b. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

**Hoja1**

HPPR1	H	camaron E	R Hpsomatica	color Lab
	0.1918	3.6578	5.24359	97.508
	0.1989	3.2939	6.03843	93.827
	0.1674	3.1870	5.25259	65.502
	0.1964	4.3098	4.55706	265.527
	0.2029	3.0058	6.75028	112.544
	0.1877	2.6662	7.03998	
	0.1250	2.6587	4.70155	
	0.2154	3.8514	5.59277	
	0.2150	3.2731	6.56870	
	0.1892	3.0517	6.19982	
	0.2113	3.8366	5.50748	
	0.2380	4.5038	5.28443	
Phaffia		camaron E	R Hpsomatica	
	0.1865	2.7646	6.7460	196.86
	0.2438	3.8471	6.3372	117.496
	0.1667	2.8085	5.9356	141.876
	0.1953	2.8063	6.9593	129.071
	0.1686	3.3129	5.0892	71.906
	0.1805	3.2640	5.5300	
	0.2077	3.0429	6.8257	
	0.1764	2.9396	6.0008	
	0.3044	5.1840	5.8719	
	0.2069	4.4330	4.6673	
	0.2030	3.2362	6.2728	
	0.1390	2.9454	4.7192	
	0.1836	3.3353	5.5048	
	0.2075	3.6016	5.7613	
Control		camaron E	R Hpsomatica	
	0.2104	3.7712	5.5791	58.5
	0.2291	3.6832	6.2201	68.29
	0.1850	3.3201	5.5721	55.551
	0.1418	2.5538	5.5525	113.893
	0.2007	3.3441	6.0016	83.15
	0.1759	3.3170	5.3030	
	0.1685	3.0405	5.5419	
	0.1756	3.5603	4.9322	
	0.2450	4.4005	5.5675	
	0.2072	3.3092	6.2813	
	0.1708	4.2851	3.9869	
	0.1360	2.5412	5.3518	
	0.1173	2.4070	4.8733	
		control cont.		85.66
				125.289
				1781.846
				261.657

---

---

---

**control**

---

2	-2.68	-9.44	2.61	-9.59	-2.08	10.16	58.5
	-2.17	-8.72	-5.07	-8.71	-2.22	10.32	
3	-1.53	-11.38	-0.83	-10.61	-4.32	11.51	68.29
	-1.24	-11.02	-6.4	-10.17	-4.4	12.8	
4	-0.56	-5.96	5.43	-5.6	-2.11	8.08	55.551
	-0.07	-5.49	-3.2	-4.95	-2.37	6.35	113.893
5	1.99	-2.93	-1.68	-1.66	-3.13	3.92	
6	0.22	0.24	1.2	0.3	-0.11	1.21	93.15

---

---

---

**Phaffia**

---

1	0.31	0.36	0.19	0.44	-0.15	0.5	196.86
	-3.95	-8.5	-4.91	-9.31	-1.12	10.58	117.496
2	-0.34	-1.4	-0.2	-1.41	-0.31	1.65	141.876
	1.47	-1.68	-0.96	-0.58	-2.15	2.43	
5	-2.05	-1.63	-4.67	-2.1	1.06	5.36	129.071
	-2.55	-2.46	-1.42	-3.37	1.11	3.82	
6	3.05	-2.77	3.22	-0.87	-4.06	5.23	71.906
	3.89	-1.71	-1.01	0.68	-4.2	4.37	

---

---

---

**HPPR1**

---

2	0.64	-1.73	-0.66	-1.11	-1.47	1.96	97.608
	0.69	-1.67	-0.98	-1.03	-1.48	2.05	
3	1.73	-3.33	-0.98	-1.55	-3.42	3.88	93.627
	1.87	-3.16	-1.85	-1.34	-3.42	4.11	
4	0.18	0.97	6.9	0.93	0.31	6.97	65.502
	0.81	1.86	1.06	2.02	0.21	2.29	
5	-3.3	-1.14	-14.82	-2.7	2.21	15.22	265.527
	-4.88	-3.54	-2.04	-5.56	2.34	6.37	
6	-3.85	-7.18	-5.88	-8.12	-0.69	10.05	112.544
	-4.07	-7.51	-4.34	-8.51	-0.68	9.58	

---

---

---

**Control - Control**

---

2	4	-1.61	1.39	0.87	-4.22	4.53	85.666
	4.23	-1.31	-0.77	1.24	-4.25	4.49	
3	-1.51	0.27	-2.96	-0.45	1.47	3.34	
	-2.25	-2.41	-4.82	-3.27	0.69	5.86	125.289
4	-2.59	-2.9	-1.67	-3.81	0.78	4.23	
	-5.19	-3.84	-10.3	-5.82	2.8	12.15	171.846
5	-6.08	-5.18	-2.99	-7.4	3.02	8.53	
6	-3.74	-2.05	-15.66	-3.57	2.33	16.23	261.657

## Oneway

### Descriptives

RHP

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
HPPR1	12	5.7278	.7947	.2294	5.2229	6.2327	4.56	7.04
CONTROL	13	5.4400	.6065	.1682	5.0735	5.8065	3.98	6.26
PHAFFIA	14	5.8729	.7309	.1953	5.4508	6.2949	4.67	6.96
Total	39	5.6839	.7182	.1150	5.4511	5.9168	3.98	7.04

### Test of Homogeneity of Variances

RHP

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.017	2	36	.372

### ANOVA

RHP

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	(Combined)	1.296	2	.648	1.275	.292
	Linear Term	.136	1	.136	.267	.608
	Unweighted	.173	1	.173	.341	.563
	Weighted Deviation	1.123	1	1.123	2.209	.146
Within Groups		18.306	36	.508		
Total		19.602	38			

### RHP

TRATAMIE	N	Subset for alpha = .05
		1
Tukey HSD <sup>a,b</sup> CONTROL	13	5.4400
	12	5.7278
	14	5.8729
	Sig.	.283
Duncan <sup>a,b</sup> CONTROL	13	5.4400
	12	5.7278
	14	5.8729
	Sig.	.153

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 12.949.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

### Descriptives

COLORLAB

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
HPPR1	5	126.9620	79.3083	35.4677	28.4877	225.4363	65.50	265.53
CONTROL	5	77.8760	24.9804	11.1716	46.8588	108.8932	55.55	113.89
PHAFFIA	5	131.4440	45.0903	20.1650	75.4570	187.4310	71.91	196.86
C CONTROL	4	161.1150	75.7219	37.8610	40.6245	281.6055	85.66	261.66
Total	19	122.4142	62.0974	14.2461	92.4842	152.3442	55.55	265.53

### ANOVA

COLORLAB

			Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	(Combined)		16420.363	3	5473.454	1.549	.243
Linear Term	Unweighted		5470.657	1	5470.657	1.549	.232
	Weighted		4870.842	1	4870.842	1.379	.259
	Deviation		11549.521	2	5774.761	1.635	.228
Within Groups			52989.255	15	3532.617		
Total			69409.618	18			

### COLORLAB

TRATAMIE	N	Subset for alpha = .05
		1
Tukey HSD <sup>a,b</sup>		
CONTROL	5	77.8760
HPPR1	5	126.9620
PHAFFIA	5	131.4440
C.CONTROL	4	161.1150
Sig.		.183
Duncan <sup>a,b</sup>		
CONTROL	5	77.8760
HPPR1	5	126.9620
PHAFFIA	5	131.4440
C.CONTROL	4	161.1150
Sig.		.065

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.706.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

**Hoja1**

**RESULTADOS DE DIGESTIBILIDAD**

**Dieta**

Phaffia	% Cromo	% Cromo	% Proteina	% Proteina	% D.P.D	MEDIA	desvest	% desvest		
	dieta	en heces	heces	dieta				D.M.S.D	MEDIA	desvest
1A	1.000	5.605	24.296	30.232	85.662	86.475	2.719	82.159	82.168	2.243
1B	1.000	5.456	24.178	30.232	85.342			81.672		
2A	1.000	6.889	19.115	30.232	90.822			85.484		
2B	1.000	6.989	19.441	30.232	90.799			85.692		
3A	1.000	5.291	24.085	30.232	84.943			81.100		
3B	1.000	5.080	23.863	30.232	84.462			80.315		
4A	1.000	5.325	23.350	30.232	85.496			81.221		
4B	1.000	4.927	23.427	30.232	84.272			79.704		
<b>CONTROL</b>										
5A	1.000	3.234	24.875	31.442	75.537	85.714	5.515	69.079	81.471	5.578
5B	1.000	4.518	23.884	31.442	83.187			77.866		
6A	1.000	6.046	23.729	31.442	87.518			83.460		
6B	1.000	5.649	24.324	31.442	86.305			82.298		
7A	1.000	5.672	30.879	31.442	82.685			82.370		
7B	1.000	5.541	25.038	31.442	85.629			81.953		
8A	1.000	7.950	18.748	31.442	92.500			87.421		
8B	1.000	7.888	18.959	31.442	92.356			87.323		
<b>HPPR</b>										
9A	1.0000	8.487	19.415	40.080	94.292	90.861	2.730	88.217	83.045	3.252
9B	1.0000	7.741	19.765	40.080	93.630			87.082		
10A	1.0000	5.145	23.760	40.080	88.478			80.564		
10B	1.0000	4.794	25.225	40.080	86.872			79.141		
11A	1.0000	5.832	24.345	40.080	89.585			82.853		
11B	1.0000	5.005	22.209	40.080	88.929			80.020		
12A	1.0000	6.116	17.822	40.080	92.730			83.649		
12B	1.0000	5.826	17.814	40.080	92.371			82.636		

### One-way

#### Descriptives

DMS	N	Mean	Std. Deviation	95% Confidence Interval		Minimum	Maximum
				Lower Bound	Upper Bound		
HPPR1	8	61.2450	3.532	59.323	63.150	55.704	79.14
CNTL	8	61.4525	5.003	54.053	68.314	50.304	80.27
P-HAPP1	5	67.1043	2.740	70.314	84.141	79.10	81.09
Term	24	82.2248	3.870	80.473	83.928	80.01	85.57
Total	57	74.0000	3.842	69.321	78.678	68.67	85.20

Test of Homogeneity of Variances

Z			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
5.50	2	51	.02

### One-way

#### Descriptives

DP	N	Mean	Std. Deviation	95% Confidence Interval		Minimum	Maximum
				Lower Bound	Upper Bound		
HPPR1	6	30.9812	2.154	28.000	33.956	23.119	36.87
CNTL	6	35.4730	2.718	30.713	40.233	30.712	40.82
P-HAPP1	8	35.6137	5.511	1.8823	81.0813	30.286	73.54
Total	24	34.3551	4.3798	28.8110	49.5132	24.20	42.50

Test of Homogeneity of Variances

Z			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.957	2	21	.222

### ANOVA

#### Descriptives

DMS	N	Sum of Squares		df	Mean Square	F	Sig. Df1
		Between Groups	Within Groups				
Treatment	3	81.4825	27.161	2	12.8112	3	.8713
HPPR1	3	82.1862	27.320	2	107.031	1	107.031
Total	9	163.6687	51.481	17.031	3.17031	17.031	1.130

Note: No Groups is homogeneous when Sample Size = 3 Df1

\* Using Levene's Test Sample Size = 9 Df1

### ANOVA

DMS	N	Sum of Squares	df	Mean Square	Sum of Squares		df	Mean Square	F	Sig. Df1
					Between Groups	Within Groups				
Treatment	3	10.050	2	5.025	2.09	7.45	2	0.675	2.99	.22
HPPR1	3	3.009	1	3.009	1.003	1.94	1	1.94	6.72	.03
Total	6	13.059	3	4.353	6.003	4.15	3	1.383	5.27	.02

Note: No Groups is homogeneous when Sample Size = 3 Df1

\* Using Levene's Test Sample Size = 9 Df1

DP	N	Sum of Squares		df	Mean Square	F	Sig. Df1
		Between Groups	Within Groups				
Treatment	3	65.9737	21.991	2	32.9869	3	.8713
HPPR1	3	60.4730	20.157	2	30.235	1	30.235
Total	6	126.4467	52.534	4	31.6116	2	1.5819

Note: No Groups is homogeneous when Sample Size = 3 Df1

\* Using Levene's Test Sample Size = 9 Df1

BIOENSAYO - ACTIVIDAD INMUNOESTIMULANTE

acuario	no.	dieta	dieta	no	x O	n7	x7	incp7	food7	cons 7	tc7	tca7	sob7
A1	1	Control	1	10	0.45	9	0.88	0.43	5.04	0.56	93.23	1.32	90
A9	7	Control	1	10	0.45	10	0.78	0.32	4.88	0.49	70.00	1.51	100
B2	12	Control	1	10	0.45	10	0.81	0.37	5.04	0.50	82.02	1.38	100
B8	16	Control	1	10	0.44	10	0.82	0.37	5.04	0.50	84.62	1.35	100
B12	20	Control	1	10	0.45	10	0.74	0.29	4.99	0.50	62.91	1.75	100
C7	23	Control	1	10	0.45	10	0.77	0.32	5.15	0.52	69.37	1.62	100
D4	28	Control	1	10	0.45	10	0.76	0.30	5.13	0.51	66.08	1.70	100
D6	30	Control	1	10	0.45	9	0.79	0.32	4.93	0.55	70.27	1.69	90
			PRO		0.45	9	0.79	0.34	5.02	0.52	74.81	1.54	97.50
			DE				0.04	0.05	0.09	0.02	10.54	0.17	4.63
acuario	no.	dieta	dieta	no	x O	n7	x7	incp7	food7	cons 7	tc7	tca7	sob7
A2	2	Levadura	2	10	0.45	10	0.81	0.35	4.95	0.50	78.49	1.40	100
A6	4	Levadura	2	10	0.46	10	0.84	0.38	5.10	0.51	82.14	1.35	100
A10	8	Levadura	2	10	0.45	10	0.82	0.38	5.05	0.51	84.34	1.34	100
B3	13	Levadura	2	10	0.46	9	0.75	0.29	4.98	0.55	84.00	1.89	90
B7	15	Levadura	2	10	0.46	10	0.82	0.37	5.10	0.51	80.26	1.39	100
B11	19	Levadura	2	10	0.46	10	0.80	0.34	5.07	0.51	75.22	1.48	100
C12	26	Levadura	2	10	0.46	10	0.73	0.27	5.15	0.52	59.48	1.89	100
D5	29	Levadura	2	10	0.45	10	0.77	0.31	4.71	0.47	69.09	1.50	100
			PRO		0.45	9	0.79	0.34	5.01	0.51	74.13	1.53	98.75
			DE				0.04	0.04	0.14	0.02	9.01	0.23	3.54
acuario	no.	dieta	dieta	no	x O	n7	x7	incp7	food7	cons 7	tc7	tca7	sob7
A4	3	Phaffia	3	10	0.46	10	0.78	0.32	5.15	0.52	69.05	1.61	100
A12	10	Phaffia	3	10	0.46	9	0.85	0.40	5.10	0.57	86.65	1.43	90
B5	14	Phaffia	3	10	0.46	9	0.85	0.39	5.00	0.56	85.51	1.42	90
D7	31	Phaffia	3	10	0.46	10	0.74	0.28	5.02	0.50	62.14	1.77	100
			PRO		0.46	9	0.80	0.35	5.06	0.53	75.99	1.56	95.00
			DE				0.05	0.05	0.07	0.03	12.06	0.16	5.77
acuario	no.	dieta	dieta	no	x O	n7	x7	incp7	food7	cons 7	tc7	tca7	sob7
A8	6	HPPR1	4	10	0.46	10	0.78	0.32	5.15	0.52	68.32	1.62	100
B9	17	HPPR1	4	10	0.46	10	0.86	0.40	5.07	0.51	87.50	1.27	100
C2	21	HPPR1	4	10	0.46	9	0.76	0.30	4.86	0.54	55.45	1.80	90
D1	27	HPPR1	4	10	0.45	10	0.78	0.32	5.11	0.51	70.93	1.59	100
			PRO		0.46	9	0.79	0.33	5.05	0.52	73.05	1.57	97.50
			DE				0.04	0.04	0.13	0.01	9.89	0.22	5.00
							3.17						
acuario	no.	dieta	dieta	no	x O	n7	x7	incp7	food7	cons 7	tc7	tca7	sob7
A7	5	Glucan	5	10	0.45	10	0.83	0.37	5.15	0.52	80.35	1.40	100
A11	9	Glucan	5	10	0.45	9	0.81	0.35	4.99	0.55	78.22	1.57	90
B1	11	Glucan	5	10	0.45	11	0.67	0.22	4.98	0.45	49.83	2.02	110
B10	18	Glucan	5	10	0.46	10	0.80	0.34	5.15	0.52	74.40	1.50	100
C5	22	Glucan	5	10	0.46	9	0.79	0.34	5.07	0.56	73.73	1.68	90
C9	24	Glucan	5	10	0.45	10	0.78	0.33	5.02	0.50	71.74	1.54	100
C11	25	Glucan	5	10	0.46	10	0.79	0.33	5.13	0.51	72.33	1.54	100
D8	32	Glucan	5	10	0.46	10	0.80	0.33	5.01	0.50	71.34	1.51	100
			PRO		0.46	9	0.78	0.33	5.06	0.51	71.49	1.60	98.75
			DE				0.0467	0.0438	0.0734	0.03427	9.3147	0.19	6.4087

BIOENSAYO - ACTIVIDAD INMUNOESTIMULANTE

x14	incp14	n14	food14	cons14	tc14	tca14	sob14	n21	x21	inp21	food21	cons21
1.35	0.90	9	15.3	1.81	196.33	2.02	90	9	1.52	1.17	25.200	2.80
1.42	0.96	8	20.6	2.57	209.24	2.67	80	8	1.58	1.22	29.455	3.68
1.35	0.90	10	16.7	1.67	203.15	1.84	100	10	1.58	1.14	25.730	2.57
1.30	0.86	10	16.6	1.66	194.12	1.93	100	10	1.56	1.11	25.348	2.53
1.28	0.83	9	16.5	1.84	183.54	2.21	90	9	1.55	1.10	25.600	2.84
1.33	0.87	9	16.2	1.80	190.30	2.07	90	9	1.55	1.09	25.005	2.78
1.10	0.64	10	16.5	1.65	140.92	2.55	100	8	1.31	0.86	24.970	3.12
1.35	0.88	7	14.2	2.03	191.28	2.30	70	5	1.65	1.19	21.655	4.33
1.31	0.86	9	16.69	1.88	188.61	2.20	90.00	8	1.56	1.11	25.37	3.08
0.09	0.09		1.75	0.31	20.83	0.29	10.69		0.11	0.11	2.10	0.62
x14	incp14	n14	food14	cons14	tc14	tca14	sob14	n21	x21	inp21	food21	cons21
1.19	0.74	10	16.4	1.64	163.41	2.22	100	10	1.45	0.99	24.720	2.47
1.32	0.87	10	16.9	1.69	188.45	1.95	100	10	1.50	1.04	25.790	2.58
1.37	0.92	9	16.8	1.86	206.49	2.02	90	9	1.71	1.26	25.740	2.86
1.24	0.78	8	16.1	2.01	169.92	2.58	80	8	1.47	1.01	24.760	3.10
1.28	0.83	10	16.9	1.69	181.36	2.05	100	9	1.50	1.05	25.705	2.86
1.30	0.85	9	16.5	1.83	185.82	2.16	90	9	1.61	1.15	25.225	2.80
1.27	0.81	9	16.8	1.86	176.20	2.30	90	9	1.58	1.12	25.520	2.84
1.20	0.75	10	16.2	1.62	165.78	2.15	100	7	1.64	1.18	24.855	3.55
1.27	0.82	9	16.55	1.77	179.68	2.18	93.75	8	1.56	1.10	25.29	2.88
0.06	0.06		0.33	0.14	14.15	0.20	7.44		0.09	0.09	0.46	0.33
x14	incp14	n14	food14	cons14	tc14	tca14	sob14	n21	x21	inp21	food21	cons21
1.22	0.76	10	16.6	1.66	166.38	2.17	100	10	1.53	1.08	25.770	2.58
1.43	0.98	9	16.7	1.86	213.84	1.91	90	9	1.76	1.31	25.525	2.85
1.38	0.92	9	16.2	1.81	201.73	1.96	90	9	1.59	1.23	24.770	2.75
1.08	0.63	10	16.0	1.60	136.76	2.55	100	10	1.29	0.84	24.885	2.49
1.28	0.82	9	16.37	1.73	179.68	2.15	95.00	9	1.57	1.11	25.26	2.67
0.16	0.16		0.33	0.12	34.99	0.29	5.77		0.21	0.21	0.51	0.16
x14	incp14	n14	food14	cons14	tc14	tca14	sob14	n21	x21	inp21	food21	cons21
1.24	0.77	10	16.9	1.69	166.38	2.19	100	9	1.52	1.06	25.995	2.89
1.34	0.89	10	16.8	1.68	194.74	1.90	100	9	1.41	0.96	25.215	2.80
1.23	0.77	8	15.6	1.95	167.47	2.54	80	7	1.71	1.25	24.028	3.43
1.23	0.78	10	16.7	1.67	171.15	2.15	100	10	1.44	0.98	25.725	2.57
1.26	0.80	9	16.52	1.75	174.93	2.20	95.00	8	1.52	1.06	25.24	2.92
0.06	0.06		0.63	0.13	13.36	0.26	10.00		0.14	0.13	0.87	0.36
5.04									6.08			
x14	incp14	n14	food14	cons14	tc14	tca14	sob14	n21	x21	inp21	food21	cons21
1.30	0.85	10	16.3	1.63	184.72	1.92	100	8	1.81	1.35	25.170	3.15
1.32	0.87	9	16.6	1.85	193.02	2.12	90	9	1.56	1.11	25.210	2.80
1.16	0.71	11	16.7	1.52	158.76	2.13	110	11	1.41	0.96	25.515	2.32
1.29	0.83	10	16.9	1.69	180.04	2.04	100	10	1.60	1.14	25.290	2.53
1.21	0.76	8	15.9	1.98	166.17	2.62	80	8	1.46	1.00	24.160	3.02
1.35	0.89	9	16.4	1.82	197.28	2.04	90	8	1.53	1.08	24.790	3.10
1.31	0.85	7	16.1	2.30	184.78	2.71	70	5	1.74	1.28	24.585	4.92
1.29	0.83	8	16.5	2.06	178.58	2.49	80	8	1.57	1.10	25.230	3.15
1.28	0.82	9	16.41	1.86	180.42	2.26	90.00	8	1.58	1.13	24.99	3.12
0.06137	0.06		0.341	0.2532	12.8521789	0.3	13.09		0.1344	0.13194	0.4467082	0.7868

---

BIOENSAYO - ACTIVIDAD INMUNOESTIMULANTE

tc21	tca21	sob21	n28	x 28	inp28	food28	cons28	tc28	tca28	sob28	n35	x 35
255.51	2.40	90	8	2.01	1.55	35.175	4.40	339.69	2.84	80	8	2.27
266.03	3.01	80	8	2.01	1.55	39.205	4.90	336.41	3.17	80	8	2.37
255.28	2.26	100	9	1.94	1.49	35.780	3.98	334.96	2.67	90	9	2.26
252.04	2.28	100	9	1.97	1.53	35.323	3.92	345.20	2.57	90	8	2.24
242.41	2.59	90	9	1.94	1.49	36.025	4.00	328.50	2.69	90	9	2.26
239.17	2.54	90	8	1.94	1.48	34.530	4.32	323.41	2.92	80	8	2.28
187.20	3.65	80	7	1.80	1.34	33.895	4.84	292.94	3.62	70	7	2.11
256.71	3.65	50	3	1.89	1.43	25.630	8.54	309.09	5.98	30	3	2.26
244.29	2.80	85.00	7	1.93	1.48	34.45	4.86	326.28	3.31	76.25	7	2.26
24.56	0.58	16.04		0.07	0.07	3.90	1.53	17.47	1.13	19.96		0.07
tc21	tca21	sob21	n28	x 28	inp28	food28	cons28	tc28	tca28	sob28	n35	x 35
220.40	2.49	100	10	1.60	1.15	33.495	3.35	254.77	2.92	100	10	1.79
225.93	2.49	100	9	1.88	1.42	35.615	3.96	308.62	2.79	90	9	2.14
281.80	2.27	90	9	2.08	1.64	35.715	3.97	365.82	2.43	90	8	2.48
220.14	3.07	80	8	1.85	1.40	33.985	4.25	304.75	3.04	80	7	2.30
229.68	2.73	90	7	1.61	1.15	34.255	4.89	252.44	4.25	70	6	1.83
253.07	2.43	90	9	2.00	1.54	34.675	3.85	338.11	2.50	90	9	2.16
244.23	2.53	90	7	1.99	1.53	35.120	5.02	333.55	3.28	70	7	2.25
261.40	3.00	70	7	2.05	1.60	34.155	4.88	352.22	3.06	70	7	2.44
242.08	2.62	88.75	8	1.88	1.43	34.63	4.27	313.79	3.03	82.50	7	2.17
22.18	0.28	9.91		0.19	0.19	0.80	0.60	42.29	0.57	11.65		0.25
tc21	tca21	sob21	n28	x 28	inp28	food28	cons28	tc28	tca28	sob28	n35	x 35
234.72	2.40	100	10	1.79	1.34	35.145	3.51	291.48	2.63	100	10	2.09
286.94	2.18	90	9	2.12	1.67	35.900	3.99	365.64	2.39	90	9	2.41
268.83	2.24	90	9	2.09	1.64	34.970	3.89	357.82	2.38	90	8	2.54
183.15	2.97	100	9	1.59	1.13	34.485	3.83	247.43	3.39	90	8	2.02
243.41	2.45	95.00	9	1.90	1.44	35.13	3.81	315.59	2.70	92.50	8	2.27
45.64	0.36	5.77		0.26	0.26	0.59	0.20	56.32	0.48	5.00		0.25
tc21	tca21	sob21	n28	x 28	inp28	food28	cons28	tc28	tca28	sob28	n35	x 35
227.59	2.74	90	9	1.80	1.33	35.820	3.98	287.69	2.98	90	9	2.06
209.43	2.93	90										
273.36	2.74	70	7	2.09	1.63	33.103	4.73	355.40	2.91	70	6	2.46
216.74	2.61	100	9	1.52	1.07	35.775	3.98	235.05	3.73	90	10	1.86
231.78	2.76	87.50	8	1.80	1.34	34.90	4.23	292.71	3.20	83.33	8	2.12
28.71	0.13	12.58		0.28	0.28	1.56	0.43	60.33	0.45	11.55		0.31
					5.41							6.37
tc21	tca21	sob21	n28	x 28	inp28	food28	cons28	tc28	tca28	sob28	n35	x 35
295.20	2.33	80	8	2.15	1.69	34.470	4.31	369.43	2.55	80	8	2.49
245.87	2.52	90	9	1.86	1.41	34.510	3.83	312.49	2.71	90	8	2.12
213.02	2.43	110	10	1.63	1.18	35.115	3.51	263.47	2.97	100	8	2.19
247.07	2.22	100	8	2.07	1.61	34.590	4.32	349.02	2.69	80	8	2.43
220.18	3.01	80	7	1.84	1.39	33.460	4.78	303.82	3.45	70	6	2.22
238.02	2.87	80	7	1.82	1.37	33.940	4.85	302.40	3.54	70	7	2.07
279.08	3.84	50	4	2.20	1.74	32.385	8.10	379.85	4.64	40	3	2.69
237.88	2.86	80	7	1.93	1.46	34.155	4.88	315.02	3.34	70	7	2.12
247.04	2.76	83.75	7	1.94	1.48	34.08	4.82	324.44	3.24	75.00	6	2.29
27.752926	0.52029	17.68		0.19	0.18715	0.840998	1.41071	38.8366	0.08136	17.728		0.22222

**BIOENSAYO - ACTIVIDAD INMUNOESTIMULANTE**

inp35	alim35	cons35	tc35	tca35	sob35	n42	x 42	inp42	alim42	cons42	tc42
1.81	45.455	5.68	397.533	3.13	80	8	2.38	1.93	55.455	6.93	422.204
1.91	49.4	6.18	414.674	3.24	80	7	2.69	2.23	59.16	8.45	484.783
1.81	46.38	5.15	407.116	2.84	90	9	2.63	2.19	56.62	6.29	491.011
1.80	45.3625	5.67	406.787	3.15	80	7	2.46	2.02	45.3625	6.48	456.561
1.81	46.925	5.21	398.896	2.89	90	9	2.56	2.10	56.685	6.30	464.386
1.62	44.495	5.56	399.179	3.05	80	8	2.56	2.11	55.295	6.91	460.996
1.65	43.63	6.23	362.019	3.77	70	7	2.44	1.98	43.63	6.23	433.292
1.80	31.485	10.50	389.899	5.83	30	3	2.59	2.13	31.485	10.50	461.328
1.80	44.14	6.27	397.01	3.49	75.00	7	2.54	2.09	50.46	7.26	459.32
0.07	5.40	1.75	16.01	0.99	19.27		0.10	0.10	9.51	1.49	23.14
inp35	alim35	cons35	tc35	tca35	sob35	n42	x 42	inp42	alim42	cons42	tc42
1.34	42.81	4.28	297.339	3.19	100	10	1.98	1.53	52.81	5.28	338.803
1.68	45.885	5.10	365.505	3.04	90	9	2.40	1.94	56.845	6.32	423.360
2.03	46.145	5.77	453.971	2.84	80	8	2.84	2.39	55.569	6.95	534.787
1.85	43.865	6.27	403.119	3.39	70	7	2.41	1.95	54.425	7.78	426.825
1.38	43.36	7.23	301.681	5.25	60	5	2.18	1.72	53.12	10.62	378.070
1.71	44.56	4.95	374.172	2.90	90	9	2.26	1.80	53.36	5.93	394.639
1.79	44.94	6.42	389.262	3.59	70	6	2.51	2.05	53.98	9.00	447.204
1.99	44.12	6.30	438.631	3.17	70	7	2.77	2.32	52.68	7.53	511.479
1.72	44.46	5.79	377.96	3.42	78.75	7	2.42	1.96	54.10	7.42	431.90
0.25	1.17	0.96	56.95	0.78	13.56		0.29	0.29	1.46	1.74	65.69
inp35	alim35	cons35	tc35	tca35	sob35	n42	x 42	inp42	alim42	cons42	tc42
1.64	45.335	4.53	356.987	2.77	100	10	2.33	1.87	45.335	4.53	409.170
1.95	46.34	5.15	428.265	2.54	90	8	2.89	2.44	57.38	7.17	534.320
2.08	45.72	5.72	456.072	2.74	80	7	2.88	2.43	56.28	8.04	531.018
1.56	44.385	5.55	341.740	3.55	80	8	2.32	1.86	55.185	6.90	407.112
1.81	45.45	5.24	395.77	2.93	87.50	8	2.61	2.15	53.55	6.66	470.40
0.25	0.82	0.53	55.12	0.42	9.57		0.33	0.33	5.55	1.50	71.91
inp35	alim35	cons35	tc35	tca35	sob35	n42	x 42	inp42	alim42	cons42	tc42
1.59	46.33	5.15	343.008	3.23	90	9	2.29	1.82	57.21	6.36	393.056
2.00	42.9825	7.16	437.482	3.58	60	5	2.68	2.22	42.9825	8.60	484.279
1.40	46.3	4.63	308.811	3.30	100	9	2.11	1.66	46.3	5.14	365.247
1.67	45.20	5.65	363.10	3.37	83.33	7	2.36	1.90	48.83	6.70	414.19
0.31	1.92	1.34	66.65	0.18	20.82		0.29	0.29	7.44	1.75	62.27
							7.08				
inp35	alim35	cons35	tc35	tca35	sob35	n42	x 42	inp42	alim42	cons42	tc42
2.04	44.11	5.51	444.487	2.71	80	6	3.07	2.61	44.11	7.35	569.942
1.67	44.47	5.56	369.303	3.33	80	7	2.55	2.10	55.35	7.91	464.159
1.74	45.315	5.66	386.637	3.26	80	8	2.54	2.09	56.115	7.01	464.588
1.97	44.48	5.56	426.302	2.83	80	8	2.72	2.25	44.48	5.96	488.937
1.76	42.495	7.08	386.111	4.02	60	5	2.53	2.08	53.055	10.61	455.702
1.62	43.67	6.24	356.638	3.86	70	4	2.31	1.85	54.79	13.70	408.830
2.23	41.33	13.78	486.783	6.17	30	3	2.88	2.42	41.33	13.78	526.725
1.66	43.585	6.23	356.897	3.76	70	6	2.24	1.77	43.585	7.26	382.040
1.83	43.68	6.95	401.64	3.74	68.75	5	2.60	2.15	49.10	9.15	470.12
0.2203	1.25687	2.809	46.64822	1.0869	17.27		0.2775	0.2771	6.2487	3.1624	60.132111

**BIOENSAYO - ACTIVIDAD INMUNOESTIMULANTE**

tca42	sob42	n49	x 49	inp49	alim49	cons49	tc49	tca49	sob49	biomasa total
3.60	80	5	3.02	2.56	69.370	13.87	562.28	5.41	50	15.10
3.79	70	6	3.43	2.97	70.970	11.83	645.65	3.97	60	20.58
2.88	90	5	4.18	3.74	71.910	14.38	839.33	3.85	50	20.90
3.21	70	5	2.85	2.41	45.363	9.07	545.70	3.76	50	14.27
2.99	90	8	2.92	2.47	70.375	8.80	545.47	3.56	80	23.38
3.28	80	6	3.05	2.59	69.550	11.59	567.40	4.47	60	18.30
3.15	70	7	2.84	2.38	43.630	6.23	520.79	2.62	70	19.86
4.92	30	3	3.19	2.73	31.485	10.50	591.13	3.84	30	9.58
3.48	72.50	5.63	3.17	2.73	59.08	10.78	602.22	3.93	56.25	18.04
0.66	19.09		0.45	0.45	16.20	2.72	102.87	0.79	15.06	4.48
tca42	sob42	n49	x 49	inp49	alim49	cons49	tc49	tca49	sob49	biomasa total
3.46	100	8	2.40	1.94	67.945	8.49	431.04	4.37	80	19.16
3.25	90	9	2.80	2.34	72.575	8.06	509.54	3.45	90	25.18
2.91	80	8	3.25	2.80	71.129	8.89	627.07	3.17	80	26
3.98	70	6	2.83	2.37	69.245	11.54	516.81	4.88	60	16.95
6.16	50	5	2.53	2.08	68.105	13.62	455.26	6.56	50	12.66
3.29	90	8	2.58	2.13	65.790	8.22	466.34	3.87	80	20.66
4.38	60	6	2.77	2.31	67.255	11.21	503.12	4.85	60	16.51
3.25	70	7	3.06	2.61	65.955	9.42	575.81	3.61	70	21.43
3.83	76.25	7	2.78	2.32	68.50	9.93	510.62	4.34	71.25	19.83125
1.05	16.85		0.28	0.28	2.39	1.99	64.66	1.10	13.56	4.48
tca42	sob42	n49	x 49	inp49	alim49	cons49	tc49	tca49	sob49	biomasa total
2.42	100	9	2.98	2.52	45.335	5.04	550.17	2.00	90	26.8
2.94	80	7	3.28	2.83	72.765	10.40	619.92	3.68	70	22.98
3.31	70	7	3.61	3.16	71.260	10.18	690.87	3.22	70	25.3
3.71	80	8	2.73	2.27	70.260	8.78	496.83	3.87	80	21.82
3.10	82.50	7	3.15	2.69	64.91	8.60	589.45	3.19	77.50	24.225
0.55	12.58		0.38	0.38	13.09	2.48	84.33	0.84	9.57	8.09
tca42	sob42	n49	x 49	inp49	alim49	cons49	tc49	tca49	sob49	biomasa total
3.49	90	9	2.54	2.08	73.065	8.12	447.41	3.91	90	22.86
3.88	50	5	3.07	2.62	42.983	8.60	571.18	3.29	50	15.37
3.10	90	9	2.43	1.98	46.300	5.14	436.22	2.60	90	21.91
3.49	76.67	7	2.68	2.22	54.12	7.29	484.94	3.26	76.67	20.0466667
0.39	23.09		0.34	0.34	16.49	1.87	74.90	0.66	23.09	6.74
			8.05							
tca42	sob42	n49	x 49	inp49	alim49	cons49	tc49	tca49	sob49	biomasa total
2.82	60	6	3.00	2.54	44.110	7.35	555.02	2.89	60	18
3.77	70	5	3.11	2.66	69.925	13.99	588.05	5.26	50	15.55
3.36	80	7	2.98	2.53	71.070	10.15	563.70	4.01	70	20.86
2.47	80	6	3.80	3.34	44.480	7.41	724.30	2.22	60	22.8
5.11	50	3	3.89	3.43	67.340	22.45	753.07	6.54	30	11.67
7.40	40	3	2.53	2.08	70.620	23.54	458.50	11.33	30	7.59
5.70	30	3	3.14	2.68	41.330	13.78	584.82	5.13	30	9.43
4.10	60	5	2.35	1.88	43.585	8.72	406.03	4.63	50	11.74
4.34	58.75	4.75	3.10	2.64	56.56	13.42	579.19	5.28	47.50	14.9
1.645	18.077		0.53863	0.5387	14.16378	6.43693	117.57876	2.811758	15.81	5.50

### BIOCAT49 Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval		Lower Bound	Upper Bound	Minimum	Maximum				
					For Mean									
					Lower	Upper								
HPPR1	3	20.0487	4.0770	2.3544	9.9187	30.1577	15.37	22.86						
CONTROL	8	18.0498	4.6674	1.6302	14.1487	21.9500	9.98	21.39						
PHAFIA	4	24.2250	2.2450	1.1226	20.6527	27.7173	21.42	26.51						
Saccha	5	19.8313	4.4735	1.5037	23.5762	12.88	26.00							
Sucan	3	14.9075	5.8466	2.0201	19.7849	7.57	24.39							
Total	31	18.6864	5.2814	9.988	18.7511	20.8256	7.57	26.80						

### Test of Homogeneity of Variances

#### BIOCAT49

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.080	4	25	.352

#### ANOVA

Between Groups	(Combined) Sum of Squares	df	Mean Square	ANOVA	
				F	Sig.
Linear Term	256.234	4	64.059	2.859	.043
Unweighted Deviation	34.845	1	34.845	1.552	.224
Weighted Deviation	52.054	1	52.054	2.333	.139
Total	320.140	3	88.047	3.047	.048
Within Groups	580.569	28	22.330		
Total	830.803	30			

#### BIOCAT49

#### Subset for Homogeneous Subsets

Subset for Homogeneous Subsets = 05

Tukey HSD	trainn	N	Subset for Homogeneous Subsets
	1	2	
Tukey HSD: Biucan	14.9075	8	
CONTROL	18.0488	8	
Saccha	19.8313	8	
HPPR1	20.0487	8	
PHAFIA	24.2250	4	
Sig.	.418	.246	
Dunnett's			
Biucan	14.9075	8	
CONTROL	18.0488	8	
Saccha	19.8313	8	
HPPR1	20.0487	8	
PHAFIA	24.2250	4	
Sig.	.118	.063	

Means for groups in homogeneous subsets are displayed

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.217

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

### PESO49 Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval		Lower Bound	Upper Bound	Minimum	Maximum				
					For Mean									
					Lower	Upper								
HPPR1	3	2.6020	3.4227	.1978	1.8299	3.5301	2.743	3.07						
CONTROL	8	3.1700	4.0555	.1434	2.8310	3.5080	2.84	4.05						
PHAFIA	4	3.1500	3.4033	.1821	2.5446	3.7551	2.73	3.61						
Saccha	8	2.7775	2.8071	.0935E-02	2.5433	3.0177	2.40	3.25						
Sucan	8	3.1600	3.582	.1943	2.8501	3.5458	2.35	3.98						
Total	31	3.0098	4.282	.7880E-02	2.8438	3.1577	2.35	4.05						

#### PESO49

Between Groups	(Combined) Sum of Squares	df	Mean Square	PESO49	
				F	Sig.
Linear Term	1.104	4	.276	1.633	.196
Unweighted Deviation	9.617E-02	1	9.617E-02	559	.438
Weighted Deviation	2.458E-03	1	2.458E-03	0.15	.905
Within Groups	1.102	3	.367	2.173	.115
Total	4.398	30			

#### PESO49

#### Subset for Homogeneous Subsets

Subset for Homogeneous Subsets = 05

Tukey HSD	trainn	N	Subset for Homogeneous Subsets
	1	2	
Tukey HSD: HPPR1	2.8500	3	
CONTROL	3.1700	8	
PHAFIA	3.1500	4	
Saccha	3.1000	8	
Sucan	3.1000	8	
Sig.	.330	.05	

Means for groups in homogeneous subsets are displayed

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.217

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

		N	Mean	S.E.	D.F.	95% Confidence Interval		Significance
						Lower	Upper	
HIPPIET	5	76.9087	2.0000	13.3333	19.7000	13.3333	50.00	0.000
CONTROL	5	66.2500	1.5000	4.5713	42.8667	59.8833	30.00	0.000
PAINFAT	5	77.5000	4.0000	1.3526	73.1467	81.8533	30.00	0.000
SACRIF	5	71.2500	1.5000	1.5285	68.2233	74.2767	30.00	0.000
GENDER	0	47.5000	0.0000	1.5111	44.9867	49.0133	30.00	0.000
Total	31	70.8267	1.5000	1.5152	67.8133	73.8333	30.00	0.000

Test of Homogeneity of Variances

TS49

	I	II	III	IV	V	S.E.		Significance
						1	2	
TS49	1	2	3	4	5	2.00	1.50	0.000

Test of Homogeneity of Variances

TS49

	N	Mean	S.E.	D.F.	95% Confidence Interval		Significance
					Lower	Upper	
HIPPIET	5	13.3333	1.5000	13.3333	10.8333	15.8333	0.000
CONTROL	5	11.3333	1.5000	11.3333	8.8333	13.8333	0.000
PAINFAT	5	13.3333	1.5000	13.3333	10.8333	15.8333	0.000
SACRIF	5	11.3333	1.5000	11.3333	8.8333	13.8333	0.000
GENDER	0	11.3333	0.0000	11.3333	8.8333	13.8333	0.000
Total	31	12.0000	1.5000	12.0000	9.5000	14.5000	0.000

TS49

TS49

	N	Mean	S.E.	D.F.	95% Confidence Interval		Significance
					Lower	Upper	
HIPPIET	5	13.3333	1.5000	13.3333	10.8333	15.8333	0.000
CONTROL	5	11.3333	1.5000	11.3333	8.8333	13.8333	0.000
PAINFAT	5	13.3333	1.5000	13.3333	10.8333	15.8333	0.000
SACRIF	5	11.3333	1.5000	11.3333	8.8333	13.8333	0.000
GENDER	0	11.3333	0.0000	11.3333	8.8333	13.8333	0.000
Total	31	12.0000	1.5000	12.0000	9.5000	14.5000	0.000

TS49

TS49

	N	Mean	S.E.	D.F.	95% Confidence Interval		Significance
					Lower	Upper	
HIPPIET	5	13.3333	1.5000	13.3333	10.8333	15.8333	0.000
CONTROL	5	11.3333	1.5000	11.3333	8.8333	13.8333	0.000
PAINFAT	5	13.3333	1.5000	13.3333	10.8333	15.8333	0.000
SACRIF	5	11.3333	1.5000	11.3333	8.8333	13.8333	0.000
GENDER	0	11.3333	0.0000	11.3333	8.8333	13.8333	0.000
Total	31	12.0000	1.5000	12.0000	9.5000	14.5000	0.000

INC 49

INC 49

	N	Mean	S.E.	D.F.	95% Confidence Interval		Significance
					Lower	Upper	
HIPPIET	5	13.3333	1.5000	13.3333	10.8333	15.8333	0.000
CONTROL	5	11.3333	1.5000	11.3333	8.8333	13.8333	0.000
PAINFAT	5	13.3333	1.5000	13.3333	10.8333	15.8333	0.000
SACRIF	5	11.3333	1.5000	11.3333	8.8333	13.8333	0.000
GENDER	0	11.3333	0.0000	11.3333	8.8333	13.8333	0.000
Total	31	12.0000	1.5000	12.0000	9.5000	14.5000	0.000

INC 49

INC 49

	N	Mean	S.E.	D.F.	95% Confidence Interval		Significance
					Lower	Upper	
HIPPIET	5	13.3333	1.5000	13.3333	10.8333	15.8333	0.000
CONTROL	5	11.3333	1.5000	11.3333	8.8333	13.8333	0.000
PAINFAT	5	13.3333	1.5000	13.3333	10.8333	15.8333	0.000
SACRIF	5	11.3333	1.5000	11.3333	8.8333	13.8333	0.000
GENDER	0	11.3333	0.0000	11.3333	8.8333	13.8333	0.000
Total	31	12.0000	1.5000	12.0000	9.5000	14.5000	0.000

INC 49

INC 49

TC4B

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
HPPR1	3	3.583	0.652	.3153	3.035	4.130	1.69	3.81
CONTROL	3	3.383	.7983	.2013	2.760	4.594	7.82	5.43
PHAFFIA	6	3.1913	.6474	.4223	4.592	2.800	3.97	8.56
Specific	6	4.3656	1.0922	.3872	3.478	5.260	2.15	11.37
General	6	5.220	2.597	1.008	7.564	3.682	4.807	1.00
Total	21	4.2288						1.37

TC4B

ANOVA

TC4B							
Brown	(Combined)	N		Sums of Squares	df	Mean Square	F
Groups				1,621	1	1,621	21.0
	Linear			1,427	1	1,427	0.77
	Unweighted			1,1827	1	1,1827	0.90
	Weighted			1,532	1	1,532	0.53
White Groups				72.777	26	2.799	
Total				80.001	26	3.080	

TC4B

TC4B							
Brown	(Combined)	N		Sums of Squares	df	Mean Square	F
Groups				7055.550	4	1763.888	34.6
	Linear			315.559	1	315.559	0.15
	Unweighted			12359.353	1	12359.353	0.04
	Weighted			80306.987	3	26769.662	0.42
White Groups				58988.51	28	2103.168	
Total				61122.88	30	2037.406	

TC4B

ANOVA

TC4B							
Brown	(Combined)	N		Sums of Squares	df	Mean Square	F
Groups				494.987	3	164.996	34.6
	Linear			510.2639	1	510.2639	0.15
	Unweighted			524.4200	1	524.4200	0.04
	Weighted			488.8475	1	488.8475	0.42
White Groups				815.2218	28	29.1146	
Total				1157.2104	30	38.5737	

Means in groups in homogeneous subsets are indicated by the same letter(s).  
 \* Used Harmonic Mean Sample Size = 3.17.  
 b. The groups below are unpaired. The harmonic mean of the group sizes is used. Tukey HSD tests are not presented.

Means in groups in homogeneous subsets are indicated by the same letter(s).  
 \* Used Harmonic Mean Sample Size = 3.17.  
 b. The groups below are unpaired. The harmonic mean of the group sizes is used. Tukey HSD tests are not presented.



