

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



Producción de biomasa pigmentada de color rojo
a partir de un cultivo mixto, en medio sintético y su
evaluación en nutrición de camarón blanco
Litopenaeus vannamei,

T E S I S

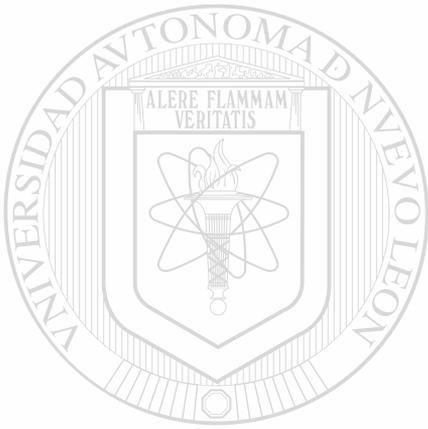
Como requisito parcial para optar al grado de:
Doctorado en Ciencias con Especialidad en Biotecnología

PRESENTA

Q.B.P. Graciela García Díaz MSP

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, N. L. JUNIO DE 2000

GGD



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

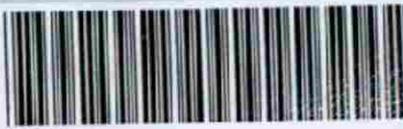
Producción de biomasa pigmentada de color rojo
a partir de un cultivo mixto, en medio sintético y su
evaluación en nutrición de camarón blanco
Litopenaeus vannamei.

UNL

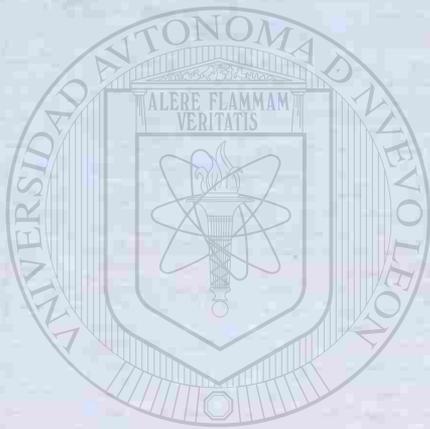
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
BIBLIOTECAS

TD
SH380
.G37
2000
c.1

2000



1080124447



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

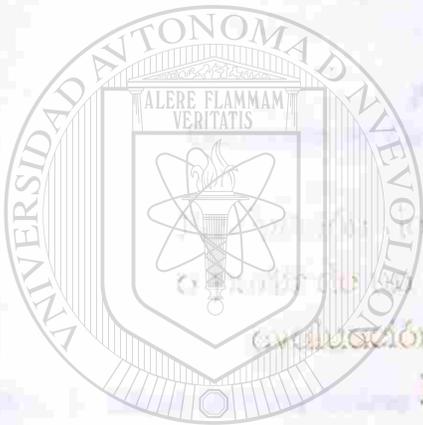
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Presentación de Tesis para optar al grado de

Doctorado en Ciencias con Especialidad en Biotecnología

por el alumno de nombre y apellidos: Litopenaceus vannamei



Para optar al grado de

Doctorado en Ciencias con Especialidad en Biotecnología

en la carrera de Biotecnología de la Universidad de Nuevo León

con el título de "Cultivo mixto, en medio sólido y su

evaluación en nutrición de camarón blanco

Litopenaceus vannamei.

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

TESIS

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

Como requisito parcial para optar al grado de:

Doctorado en Ciencias con Especialidad en Biotecnología

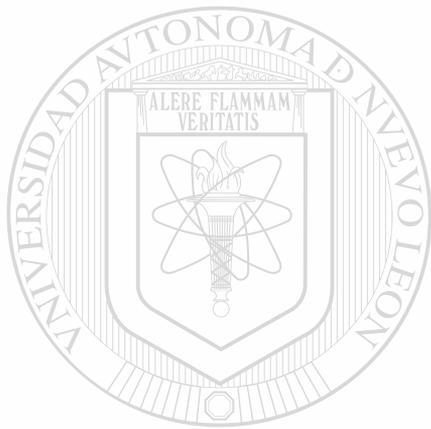
PRESENTA

Q.B.P. Graciela García Díaz MSP

EN NICOLÁS DE LOS GARZA, N. L. JUNIO DE 2001



TO
SH380
.G37
2000



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

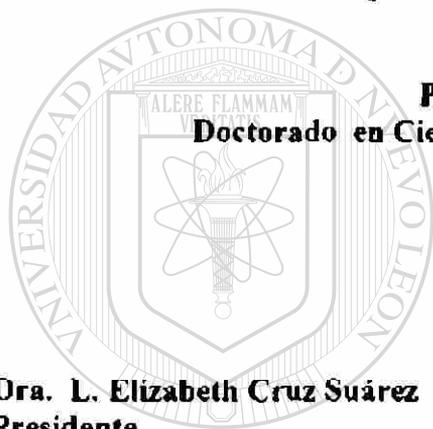


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**

**Producción de biomasa pigmentada de color rojo
A partir de un cultivo mixto, en medio sintético
y su evaluación en nutrición de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.**

**Por
Q.B.P. Graciela García Díaz MSP**

**Para otorgar el grado de
Doctorado en Ciencias con Especialidad en Biotecnología**



COMITÉ DE TESIS

**Dra. L. Elizabeth Cruz Suárez
Presidente**

**Dr. Dennis Ricque Marie
Secretario**

**Dr. Mohamad H. Badi Zabeth
Vocal**

**Dr. Luis J. Galán Wong
Vocal (Co-Director)**

**Dr. Hiram Medrano Roldán
Asesor Externo**

UANL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS
®

Handwritten signatures of the thesis committee members on horizontal lines.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Nuevo León por el apoyo brindado

*Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)
Por la Beca otorgada para la realización del Doctorado, inscrito en el
Padrón de Posgrados de Excelencia.*

A la Secretaría de Educación por la Beca PROMEP

A MIS ASESORES Por el apoyo y confianza para realizar este trabajo.

Dra. L. Elizabeth Cruz Suárez

Dr. Luis J. Galán Wong

Dr. Hiram Medrano Roldán

Dr. Mohammad H. Badii Zabath

Dr. Dennis Rique Marie

*A mis compañeros del Depto de Bioquímica de la Fac. de Ciencias Biológicas
Q.B.P. Lilia Miranda, Dra. Leticia Hauad, M.C. Adriana Nuñez, Ing. Félix
Barrera, Q.B.P. José Garza Chavéz, Q.B.P. Juan Antonio Rodríguez Arzave,
M.C. Eduardo Martínez Vega, Dra. Azucena Oranday Cárdenas, Dra. María
Julia Verde Star, Dra. Catalina Rivas Morales por su amistad y óptimo
ambiente de trabajo.*

Por su apoyo a sacar adelante este trabajo a Claudio, Pablo, Martha, Mireya, David, Beatriz, Oscar y Martín alumnos de la maestría Recursos Alimenticios y Productos Acuicolas del programa de Maricultura Depto. de Ecología FCB-UANL; al estudiante Rodolfo Lozano Olvera, a la Q.B.P. Lucía Palacios por su asistencia en la Sala de Biotecnología Depto. de Microbiología e Inmunología FCB UANL y a los alumnos de maestría Victorino Cerón R. y Ma. De los Angeles Hernández de la Unidad de Biotecnología del Instituto Tecnológico de Durango, Dgo.

Agradecemos a Francisco García García, SAFMEX, Toluca, México y a Eric Auclair, de Lesaffre Développement, Marcq-En-Baroeul Cedex, Francia, por proveer las muestras de Saccharomyces cerevisiae y β -glucano, así como la información concerniente a su composición. A Bernard Devresse y Marlene Dehasque de INVE Technologies, Baasrode, Bélgica, por proveer las cepas bacterianas; a Magda Iracheta por su ayuda en microbiología; a Gloria Yepiz Plascencia del CIAD, Hermosillo, México por su supervisión en la determinación de la fenoloxidasa. Al personal de investigación de Pyosa.

Agradezco el apoyo brindado en la ayuda en el escrito de esta tesis a licenciados en informática Verónica Arriaga y Jorge Flores; a los diseñadores gráficos Alicia Chapa, Mónica Pamela Espinoza y Jesús Lozano

Dedicatoria

POR RODEARME SIEMPRE DE SU INFINITO AMOR

A DIOS

A MIS PADRES

*María del Carmen Díaz Vda. De García
Baltazar García González**

A MI HERMANA

*María del Carmen García de Barragán
a mi cuñado favorito y Familia.*

A MIS HIJOS

*Oscar Eduardo Torres García
Graciela Ellen Torres García*
David Esteban Torres García*

A MIS AMIGOS

Indice

Resumen.....	1
Introducción.....	2
I. Antecedentes.....	4
1.1 Ecología Microbiana.....	4
1.2 Procesos de Fermentación.....	6
1.3 Crecimiento Microbiano.....	8
1.3.1 Cultivo continuo para la producción de proteína Unicelular.....	12
1.3.2 Producción de carotenoides por un cultivo mixto mediante cultivo continuo.....	13
1.3.3 Determinación de la concentración celular.....	16
1.3.4 Determinación del color rojo en hongos y levaduras.....	17
1.4 Acuicultura.....	18
1.4.1 Cultivo del camarón.....	18
1.4.2 Importancia de las proteínas.....	19
1.4.3 Pigmentos en acuicultura.....	20
1.4.4 Actividad inmunoestimulante.....	22
II. Objetivos Generales.....	24
III. Material y Metodos.....	25
Etapa I - Producción de biomasa pigmentada.....	25
3.1 Identificación de microorganismos.....	25
3.2 Cultivo mixto.....	26
3.2.1 Material biológico.....	26
3.2.2 Preparación del medio de cultivo MM-LRM-ETOH.....	27
3.2.3 Preparación del inóculo a partir de la biomasa HPPR1A.....	27
3.2.4 Preparación del inóculo a partir de la biomasa HPPR1B.....	28
3.2.5 Cultivo continuo.....	28
3.2.6 Optimización de la producción de pigmento HPPR1A.....	28
3.2.6.1 Optimización de la producción de pigmento HPPR1A.....	28
3.2.6.2 Optimización de la producción de pigmento HPPR1B.....	29
3.2.6.3 Producción de pigmento HPPR2.....	29
3.2.7 Parámetros de evaluación del cultivo continuo.....	30
3.2.8 Caracterización química y bioquímica de la biomasa pigmentada.....	34
Etapa II - Evaluación nutricional.....	36
3.3 Formulación de dietas experimentales.....	36
3.4 Análisis proximal de dietas experimentales.....	37

3.5 Pruebas de lixiviación.....	38
3.6 Material biológico.....	38
3.7 Condiciones experimentales, manejo de larvas.....	38
3.8 Bioensayo para evaluar la biomasa como fuente proteica.....	39
3.9 Bioensayo para la determinación de pigmentación.....	40
3.10 Bioensayo para determinar el coeficiente de utilización digestiva aparente de la proteína.....	42
3.11 Bioensayo para determinar la actividad inmunoestimulante.....	43
3.12 Análisis estadístico.....	46
IV. Resultados.....	47
Etapa I - Producción de biomasa pigmentada a partir de cultivo mixto en un proceso continuo.....	47
4.1 Identificación de microorganismos.....	47
4.2 Optimización de la producción de pigmento.....	51
4.2.1 Cinética de crecimiento.....	51
4.2.2 Evaluación de pigmentación y biomasa.....	53
4.2.3 Evaluación de la cinética del cultivo continuo.....	58
4.2.4 Coeficiente de transferencia y demanda biológica de oxígeno.....	61
4.2.5 Asociación simbiótica.....	62
4.3 Caracterización bioquímica de la biomasa pigmentada HPPR1B.....	63
4.3.1 Análisis proximal de la biomasa.....	63
4.3.2 Caracterización de carotenos.....	63
4.3.3 Perfil de aminoácidos.....	64
4.3.4 Digestibilidad de la proteína <i>in vitro</i>	66
Etapa II - Evaluación nutricional de la biomasa pigmentada HPPR1B en camarones blancos juveniles <i>Litopenaeus vannamei</i>	67
4.4 Bioensayo de crecimiento.....	67
4.4.1 Análisis proximal de ingredientes.....	67
4.4.2 Análisis proximal de las dietas.....	68
4.4.3 Evaluación biológica.....	68
4.4.3.1 Calidad de agua.....	68
4.4.3.2 Parámetros biológicos.....	68
4.5 Bioensayo de pigmentación.....	71
4.5.1 Análisis proximal de ingredientes.....	71
4.5.2 Análisis proximal de las dietas.....	71
4.5.3 Evaluación nutricional.....	71
4.5.3.1 Calidad de agua.....	71
4.5.4 Evaluación de pigmentación.....	74
4.5.4.1 Relación hepatosomática.....	74
4.5.4.2 Cuantificación de pigmentos.....	74

4.6 Bioensayo de Digestibilidad de la proteína.....	78
4.6.1 Análisis proximal de ingredientes.....	78
4.6.2 Análisis proximal de las dietas.....	78
4.6.3 Digestibilidad de la proteína.....	78
4.7 Bioensayo de actividad inmunoestimulante.....	79
4.7.1 Evaluación nutricional.....	79
4.7.1.1 Calidad de agua.....	79
4.7.1.2 Parámetros biológicos.....	79
4.7.2 Tasa de crecimiento.....	81
4.7.3 Tasa de conversión alimenticia.....	82
4.7.4 Tasa de sobrevivencia.....	82
4.7.5 Actividad de la fenoloxidasa.....	83
4.7.6 Eliminación bacterial.....	83
V. Discusión.....	85
Etapa I - Producción de biomasa pigmentada.....	85
Etapa II - Evaluación nutricional.....	90
VI. Conclusiones.....	94
6.1 - Producción de biomasa pigmentada.....	94
6.2 - Evaluación nutricional.....	95
VII. Literatura citada.....	96
VIII. Anexos.....	107

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 - Los Carotenos como antioxidantes en la prevención de enfermedades.	13
2 - Biosíntesis de betacarotenos y xantófilas en microorganismos.	15
3 - Factores que afectan en la pigmentación de Peneidos.	21
4 - Biotransformación del Betacaroteno - Astaxantina.	22
5 - Curva patrón de la fuerza del pigmento presente calculada para el valor triestímulo Z/ppm carotenos totales de la biomasa pigmentada <i>Phaffia</i> .	32
6 - Sistema de valores proporcionados por la Comisión Internacional de Iluminación (L*a*b).	33
7 - Sistema de valores proporcionados por la Comisión Internacional de Iluminación (L*H*C).	33
8 - Curva de calibración de dióxido de cromo.	43
9 - Curva de calibración de proteína BSA (bovine serum albumin).	45
10 -Aislamiento de microorganismos(a) y observaciones en el microscopio hitológico(b,c,d).	48
11 -Observaciones al microscopio electrónico, corte transversal de células ovaladas y circulares de las hifas.	49
12 -Pruebas confirmatorias,tirillas API.	49
13 -Producción de ascosporas en medio de Gorodowas.	50
14 -Cinéticas de crecimiento, tratamientos del 1 al 8.	51
15 -Cinéticas de crecimiento , tratamientos del 9 al 16.	53
16 -Observaciones al inicio del cultivo continuo, microscopio histológico.	52
17 -Observaciones de hifas, microscopio estereoscópico.	52
18 -Pigmentación obtenida en los tratamientos del 9 al 16.	54
19 -Cuantificación de Pigmentos obtenidos en los tratamientos del 9 al 16.	55
20 -Producción de Biomasa en los tratamientos del 1 al 8.	56
21 -Producción de Biomasa en los tratamientos del 9 al 16.	57
22 -Rendimiento de Biomasa-sustrato de los tratamientos del 1 al 8.	58
23 -Rendimiento de Pigmento-Biomasa de los tratamientos del 1 al 8.	59
24 -Rendimiento de Biomasa- sustrato de los tratamientos del 9 al 16.	60
25 -Rendimiento de Pigmento-Biomasa de los tratamientos del 9 al 16.	60
26 -Cinéticas individuales de cada uno de los microorganismos y del cultivo mixto.	62
27 -De izquierda a derecha las Biomosas HPPR1, HPPR2B y la dieta HPPR1B para los bioensayos.	65
28 -Identificación de los carotenos por cromatografía en capa delgada, observación directa y al UV.	65
29 -Representación gráfica de las tasas de sobrevivencia (a) y crecimiento (b) del bioensayo para evaluar la biomasa como fuente proteica.	70
30 -Representación gráficas de las tasas de sobrevivencia(a) y crecimiento(b) del bioensayo para evaluar la biomasa como fuente de pigmentos.	73
31 -Imagen de hepatopancreas con las dietas HPPR1 y control grafico de la relación hepatosomática.	74
32 -Cuantificación de pigmento por el método espectrofotometría de absorción.	75
33 -Camarones cocidos	76
34 -Cuantificación de pigmentos por el método espectrofotométrico de reflectancia (Z).	76
35 -Cuantificación de pigmentos por espectrofotometría de reflectancia (L*a*b)(L*H*C).	77
36 -Digestibilidad de la proteína "in vivo"	79
37 -Promedio de peso de <i>Litopenaeus vannamei</i> .	81
38 -Promedio final de biomasa de cada dieta.	81
39 -Promedio de tasa de conversión alimenticia <i>Litopenaeus vannamei</i> .	82
40 -Promedio de sobrevivencia de <i>Litopenaeus vannamei</i> .	82
41 -Actividad de la fenoloxidasa en <i>Litopenaeus vannamei</i> .	83
42 -Eliminación bacterial en <i>Litopenaeus vannamei</i> .	84

RESUMEN

El presente trabajo describe en la primera parte la producción de biomasa pigmentada a partir de un cultivo continuo, en condiciones no estériles y utilizando como fuente de carbono, el alcohol etílico. La biomasa pigmentada fue liofilizada y caracterizada químicamente. Ésta, sustituyó parcialmente la proteína de la harina de pescado y se utilizó como aditivo al preparar dietas con diferentes porcentajes de la biomasa pigmentada de color rojo HPPR1 en tres bioensayos, dos productos comerciales de levaduras como controles positivos, además de un extracto purificado de β -1,3 glucano, incluidos en la dieta, para determinar si alguno de los productos tenía un efecto positivo en el crecimiento, sobrevivencia, conversión alimenticia en la proporción del alimento (10%); así como su pigmentación, y respuesta inmune(1%) en *Litopenaeus vannamei* juveniles. Además un cuarto bioensayo de digestibilidad de la proteína con la dieta control y la biomasa pigmentada color rosa HPPR2 en la proporción 70:30.

Conclusiones y contribuciones: La asociación de *Phaffia rhodozyma* y *Saccharomyces exiguus* fue benéfica en la producción de carotenos, la presencia de precursores en el líquido de remojo, minerales y vitaminas son indispensables; así como la relación C/N 5:1, temperaturas de 25°C, 1VVM y una agitación de 400 rpm. La producción de pigmentos no va a la par con la de biomasa. Sus precursores son formados a las 15 horas al inicio del cultivo continuo. La zeaxantina, astaxantina y otros carotenos se presentaron entre las 70 y 100 horas como productos secundarios.

Los colores de la biomasa se presentan durante la fase miceliar en la primera plantilla (HPPR1A) fueron de color crema y solo el tratamiento tres en las paredes presentó color rojo, en la segunda (HPPR1B) variaron de rosa, naranja y morado pero no rojo. Se recomienda trabajar con cepas de *Phaffia* con alta productividad de astaxantina.

En la evaluación nutricional en peneidos las dieta HPPR1B y HPPR2, mostraron un alto poder atractivo y de palatabilidad, así como también su estabilidad y biodisponibilidad del pigmento por su forma miceliar; los resultados de la evaluación biológica al 1% indicaron una tendencia de ganancia en peso y sobrevivencia. Sin embargo, cuando la sustitución de la HP fue del 10% el efecto fue negativo en los camarones que se alimentaron por tiempos prolongados y sólo en el Bioensayo de inmunoestimulación(1%), junto con la *Saccharomyces cerevisiae*, fue más alta ($P=0.006$) comparada con los animales cultivados con la dieta que contenía β -glucano y la dieta control. La tasas de conversión alimenticia fueron mayores para la HPPR1 10% pero no para la de 1%. La pigmentación se encontró en todos los bioensayos por abajo de la *Phaffia* y en cuanto la digestibilidad (HPPR2) fue la mayor. Sin embargo en ambas existen un alto consumo de la dieta. Se recomienda su uso como aditivo y no como fuente proteica.

Al final del experimento de inmunoestimulación, la habilidad de los camarones para eliminar bacterias de la hemolinfa fue probada, los animales alimentados con HPPR1 al 1%. *Phaffia rhodozyma*, *Saccharomyces cerevisiae* y la dieta control no fueron estadísticamente diferentes pero con la dieta de glucano aún mostraban números altos de *Vibrio harveyi* y mostraron un pobre desarrollo sobre los otros, indicando que no sólo este tratamiento no ayudó a incrementar la resistencia a las infecciones, sino por el contrario, estos animales mostraron una baja sobrevivencia cuando se comparaba con los animales alimentados con la dieta control.

INTRODUCCIÓN

Los avances científicos han permitido el intercambio internacional de tecnologías. En particular, la biotecnología ofrece perspectivas de competencia a corto y largo plazo en diversos sectores productivos para llevar a cabo procesos específicos, a través de la utilización de microorganismos, enzimas y células animales y vegetales.

Por la gran demanda y necesidad de producir alimentos baratos a gran escala, el área de alimentos se ha enfocado en la obtención de fuentes alternas de proteínas y aditivos naturales, y debido a la complejidad estructural de algunos de ellos, como en el caso de los pigmentos, se dificulta la posibilidad de que su síntesis química pueda ser realizada a un bajo costo y evitar la contaminación del ambiente en su proceso; además, algunos de estos, han resultado ser carcinogénicos y teratogénicos.

Cuando el pigmento es obtenido por extracción a partir de tejidos de plantas o animales, existe una dependencia entre el volumen del producto y la disponibilidad regional o temporal del organismo poseedor del pigmento, por ello, una alternativa a los procesos de producción mencionados, es la síntesis vía cultivo celular, ya que los microorganismos ofrecen la ventaja de no estar sujetos a las inclemencias de la naturaleza y poseen la cualidad de adaptarse a diversos sustratos sin requerir amplios espacios y su tiempo de duplicación es corto con diversidad de rutas metabólicas; además, puede producirse bajo condiciones controladas y lo más importante, son naturales y tienen un alto contenido nutricional y proteico.

Las técnicas más recientes de la biotecnología para la producción de estos pigmentos naturales abarca desde la micropropagación de cultivos vegetales y la producción de biomasa vía reactor, hasta la manipulación genética de microorganismos; pero la tendencia actual es la selección en forma natural.

La biomasa de bacterias, hongos y levaduras puede ser considerada como una fuente alterna de proteínas, lípidos, vitaminas, minerales, carbohidratos, atrayentes e inmunoestimulantes; algunas de ellas también producen diversos pigmentos entre ellos destacan los carotenos con actividad antimicrobiana y antioxidante. El betacaroteno se le conoce por su acción fisiológica inhibe las mutaciones y el desarrollo de tumores, aumenta la respuesta inmune y es precursor de la vitamina A.

Los carotenos son necesarios para el desarrollo del ser humano y todos los animales; debido a que no los pueden sintetizar "*de novo*", dependen de su dieta para poder obtenerlos y su ausencia provoca una variedad de síntomas y problemas. En el cultivo del camarón los carotenoides en especial el grupo *cis*-xantofilas son necesarios para realizar algunas funciones fenológicas y fisiológicas, entre las que se encuentran la comunicación entre organismos, camuflaje, reproducción y advertencia; así como la percepción de la luz, protección intra-celular contra los radicales libres causantes de estrés, daño oxidativo y lesión inmunológica, entre otros; además, en el producto final afecta el criterio de calidad externa y su vida media de anaquel.

En el cultivo del camarón la dieta constituye un 60 % del costo total de la producción; por ello, la búsqueda de fuentes de proteína y aditivos nutricionales (antioxidantes, sustancias anti-estrés) a bajo costo es de gran interés en la Acuicultura.

En México, la producción de camarón, actualmente asciende a unas 17,000 toneladas métricas anuales de peso vivo, cantidad que se ha triplicado con relación a años anteriores y que representa el 1.5% de la producción mundial; el cultivo de camarón (*Litopenaeus vannamei*, *L. stylirostris*, *L. aztecus*, y otros), constituye una de las actividades económicas principales de la acuicultura.

Este estudio esclareció las condiciones adecuadas para la producción de biomasa pigmentada a partir de un cultivo mixto y su aplicación en beneficio del crecimiento y sobrevivencia del camarón, ya que se comprobó que la calidad proteica, nutricional, antiestrés e inmunoestimulante, supera cualquiera de las utilizadas actualmente (sintético, animal o vegetal).

El atractivo de la biomasa pigmentada de color rojo radica en:

- 1.- Es cultivable en forma continua en un medio de sales minerales, alcohol etílico y agua de la llave; lo que ofrece ventajas económicas por su bajo costo.
- 2.- Debido a su morfología micelar, ofrece mayor área de contacto y al disminuir el espesor de la pared celular, le permite tener mayor disponibilidad de nutrientes; además, es fácilmente separable del medio de cultivo.
- 3.- Por su calidad nutricional como fuente de proteínas e inmunoestimulantes, así como por el aporte de pigmentos estables por estar incluidos dentro de la levadura, proporciona una mejoría en la tasas de crecimiento y de sobrevivencia, un aumento en la respuesta inmune y en la pigmentación muscular del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.
- 4.- Se utiliza para la alimentación de otros organismos y también como colorante en la industria alimenticia.
- 5.- Generó una nueva línea de investigación de pigmentos en el programa de Maricultura del Departamento de Ecología, en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

I. ANTECEDENTES

1.1 Ecología Microbiana

La ecología microbiana se refiere a la relación entre microorganismos y su ambiente. Muchos de los estudios microbiológicos van encaminados a caracterizar adecuadamente las especies en cultivos puros. Sin embargo, ésta se realiza en condiciones artificiales, debido a que en el ambiente natural es muy raro que los microorganismos se encuentren en cultivos de este tipo; en realidad, la población normal de un hábitat abarca un gran número de especies microbianas diferentes (Pelczar, 1980).

La complejidad de microorganismos en un ambiente específico y sus alrededores se conoce como ecosistema; éstos incluyen la reunión de especies y los compuestos orgánicos e inorgánicos de un sitio en particular.

Los microorganismos que habitan en un mismo sitio constituyen una comunidad; la cual está formada por dos o más poblaciones de especies microbianas individuales. Cada población puede ser vista como una entidad discreta, pero no independiente; frecuentemente pocos componentes de una comunidad microbiana son conocidos y estudiados. La composición de las comunidades naturales no es producto de la casualidad, cada especie y género tienen cierta distribución, un patrón determinado por las respuestas psicológicas de las poblaciones y el ambiente en el que se encuentran (Brock, 1987).

Los microorganismos que habitan un ecosistema tienen muchos tipos de asociaciones o interacciones. Algunas de éstas son indiferentes o neutrales; otras son benéficas o positivas y otras perjudiciales o negativas (Slater, 1981).

Los tres tipos de asociaciones existentes son:

a) Asociación neutral:

Neutralismo, es muy difícil suponer que haya dos ó más poblaciones de microorganismos que estén en contacto íntimo sin afectarse entre sí. Esto sucede entre los organismos que son muy diferentes en sus necesidades de crecimiento. En otras palabras, los organismos de este caso se desarrollan bien, porque no compiten por los alimentos que se encuentran en cantidades limitadas, ni se inhiben aunque ocupen el mismo medio.

b) Asociación positiva o benéfica:

Mutualismo, es un ejemplo de relación simbiótica en la cual cada organismo resulta beneficiado. Una forma de asociación mutualista es la que implica un intercambio de alimentos entre dos especies,

fenómeno llamado sintrofismo (Slater, 1981). Un ejemplo de esta relación se da entre el *Lactobacillus arabinosus* y el *Streptococcus faecalis*; cada uno produce el factor esencial requerido por el otro; el primero produce ácido fólico y el segundo fenilalanina.

Comensalismo, es la relación entre dos microorganismos en la cual uno se beneficia de la asociación y el otro no se ve afectado. En el tipo más obvio de esta relación, los organismos comensales obtienen ventaja del hospedero, el cual, al desarrollarse, produce cambios físicos o fisiológicos en el ambiente que favorecen al comensal. Un ejemplo es el crecimiento de las levaduras en soluciones muy concentradas de azúcar. La reducción subsecuente de la concentración de azúcar permite el desarrollo de bacterias que no crecerían en las condiciones de alta presión osmótica.

c) **Asociación negativa o perjudicial:**

Antagonismo, cuando un organismo afecta adversamente el medio en que vive otro organismo, se dice que es antagonista. Estos organismos son de gran importancia práctica, ya que frecuentemente producen antibióticos u otras sustancias inhibitoras que afectan los procesos de desarrollo normal o supervivencia de otros. Ciertos compuestos producidos por la *Saccharomyces* sp., inhiben la germinación de esporas de *Acetobacter* sp..

Competencia, los organismos que se establecen en el mismo nicho ecológico, es decir, que necesitan de los mismos alimentos y condiciones ambientales, tiene una gran influencia entre sí, compiten por las mismas sustancias. En algunas situaciones el mejor adaptado predomina o elimina completamente a los otros.

Parasitismo, se define como la relación que existe entre organismos en la cual uno vive en o a expensas del otro; el parásito se alimenta de las células, tejidos o líquidos de otro organismo llamado hospedero, que comúnmente es inofensivo en el proceso. El parásito depende del hospedero y vive en contacto físico y metabólico íntimo con él.

Depredación, la muerte o ingestión (asimilación) de microorganismos de una especie por los de otra especie, se conoce como depredación; la diferencia está en que un depredador ingiere a otro organismo y un parásito solo le roba a otro organismo, derivando alimentos del hospedero en una forma que generalmente no es dañina. La depredación

es una relación extremadamente importante en la cadena alimentaria.

Anteriormente el término simbiosis se usaba como referencia a la convivencia mutua de organismos; actualmente se considera una asociación biológica en la cual todos los organismos obtienen beneficios, como en el caso de la fijación simbiótica del nitrógeno.

Para que un microorganismo crezca en un ambiente, éste debe estar provisto de una fuente disponible de energía, carbono y elementos nutricionales adicionales; en el primer nivel trófico se encuentran los organismos que usan la fuente de energía original del ecosistema y son los que se alimentan primero en la cadena. Otras poblaciones obtienen energía de los productos excretados por las especies primarias, y las cuales pertenecen al segundo nivel trófico y se denominan especies secundarias, mismas que proliferan por la oxidación de compuestos orgánicos o inorgánicos generados microbiológicamente dentro de un ecosistema.

La naturaleza y magnitud de las actividades metabólicas de los microorganismos son tales, que frecuentemente producen cambios en el ambiente. Los cambios iniciales son la transformación del sustrato, seguidos por el agotamiento de los alimentos y la elaboración de productos finales. Los microorganismos que participan en el primer nivel de cambio, elaboran productos inadecuados para utilizarlos posteriormente, pero estos son utilizados por otras especies que después los sustituyen.

Manejar cultivos microbianos donde más de una especie está involucrada es complicado, debido principalmente a que el estado de las variables de los sistemas están cambiando con respecto al menos a una variable, que usualmente es el tiempo; por lo tanto, en la industria alimenticia es poco común encontrar tecnologías que involucren cultivos mixtos, debido a que presenta una gran dificultad su control (Slater, 1981; Wang *et al.*, 1979). Por otra parte el dimorfismo se presenta en condiciones especiales, presencia o ausencia de minerales (Borges, 1993).

1.2 *Procesos de Fermentación*

Un proceso de propagación de microorganismos, involucra una serie de reacciones bioquímicas efectuadas por sus enzimas, así como las características físicas y químicas de operación como producto del medio de cultivo y del desarrollo mismo del proceso de propagación.

En general, el proceso de una fermentación consta de las siguientes etapas:

1. Selección de cepas (Aiba, 1973a)
2. Aislamiento, identificación, preservación de cepas (Ross, 1979; Larone,

-
- 1987; Gimeno, *et al.*, 1993)
 3. Preparación del inóculo (Stanbury, 1984).
 4. Preparación de materias primas y requerimientos del medio de cultivo (Trivedi, *et al.*, 1986)
 5. Elección del sistema de fermentación (Aiba, 1973a).
 6. Recuperación de la biomasa (Stanbury, 1984).
 7. Tratamiento de efluentes (Wang, 1979).
 8. Manejo del producto para su comercialización (Aiba, 1973b; Wang, *et al.*, 1979).

Entre estas etapas, debe existir una interrelación para obtener gradualmente la eficiencia máxima de la fermentación.

El escalamiento de procesos es una tarea interdisciplinaria que requiere del uso combinado e integrado de conceptos y métodos de Ingeniería Química y Fisiología Microbiana (Quintero, 1990).

Durante la propagación del microorganismo, la presencia del oxígeno es muy importante, razón por la cual se requiere calcular su demanda de oxígeno es muy importante, razón por la cual se requiere calcular su demanda por oxígeno (N_a), la cual deberá conocerse para saber si el reactor es capaz de satisfacer esa demanda en función de las condiciones de aireación y agitación. La determinación del coeficiente de transferencia de oxígeno (Kla), proviene del conocimiento del N_a ; el Kla se mide mediante la técnica establecida por Taguchi *et al.*, 1966, para posteriormente dar paso al criterio y método de escalamiento del proceso (Wang, 1979).

En un proceso aereado, la transferencia de oxígeno al medio de cultivo debe satisfacer la demanda del microorganismo; el suministro de oxígeno es adecuado si es mayor que la demandada por el microorganismo.

El sistema de agitación micro-mezclado y macro-mezclado en un fermentador deberá promover la transferencia de masa en la interfase y asegurar la homogeneidad del cultivo; además de promover la transferencia de calor y proveer un área de interfase suficiente entre gas-líquido-sólido para la transferencia de masa.

La viscosidad del medio de cultivo varía con la concentración de la biomasa, más aún si ésta es de tipo micelial, concomitantemente con un incremento en los problemas de transferencia de oxígeno (Aiba, 1973b).

La temperatura, el pH, las velocidades de aireación y agitación juegan un papel importante en la calidad del proceso de fermentación (Nagai, 1978). Existen algunas características importantes en la formulación del medio de cultivo y en las condiciones de propagación que conducen a la formación de espuma, para lo cual se requiere el uso de antiespumantes,

aunado a un diseño apropiado de impulsores que permiten una homogenización del medio de cultivo y del proceso de transferencia de masa y calor (Lee, 1992).

Las técnicas para propagar microorganismos son de tres tipos: cultivo batch intermitente, que consiste en propagar al microorganismo hasta que éste llega a su fase extraordinaria, como consecuencia de un agotamiento de los nutrientes; cultivo semicontinuo, en el cual los nutrientes se van agregando en función de la respuesta que ofrece su cinética de crecimiento y que a través de la curva de producción de células y de consumo de sustrato, se puede cuantificar a una velocidad si se agrega el sustrato para evitar problemas de regularización metabólica; cultivo continuo, que consiste en iniciar la propagación del microorganismo hasta un 80%, aproximadamente, de su fase exponencial, en ese momento agregar medio de cultivo fresco, a una velocidad igual a la de salida de producto, todo ello en función de la capacidad metabólica del microorganismo manteniendo constantes todos los parámetros de fermentación, es decir, que todos ellos no cambian en función del tiempo.

El cultivo continuo, permite mantener una fisiología constante del microorganismo por largos periodos de tiempo (Crueger, 1990a), por lo que esta alternativa permite utilizar esta técnica para estudios de fisiología microbiana en función de condiciones de operación, así como del agregado de diferentes materiales que afectan positiva o negativamente la calidad del proceso.

El manejo de poblaciones microbianas puras, requiere que los procesos sean operados sin contaminación, para lograrlo es necesario un alto grado de limpieza y que las operaciones sean asépticas. La esterilización, es decir la eliminación o destrucción de todas las entidades vivas de los materiales que van a ser usados en el proceso, se puede llevar a cabo por agentes físicos como calor, filtración y radiación, o químicos, utilizando derivados clorados, metales pesados, derivados fenólicos, alcoholes, peróxido de hidrógeno, etc.(Crueger, 1990b).

Un proceso típico de fermentación es susceptible a contaminarse de muchas maneras, las más comunes son por el tipo de medio de cultivo utilizado, el manejo del inóculo, el proceso de inoculación, la forma del suministro de aire, la adición de nutrientes, antiespumantes y otros durante el proceso o por el fermentador mismo, debido a un diseño defectuoso de los sellos del reactor o por la falta de mantenimiento apropiado (Quintero, 1993).

1.3 Crecimiento Microbiano

El cultivo de microorganismos en laboratorio y a nivel industrial se ha desarrollado debido a que estos poseen una serie de propiedades tales como valor nutricional (alto contenido de

metabólicas, adaptación para crecer en diversos sustratos no sujeta a cambios climatológicos y producción bajo condiciones totalmente controladas.

En un cultivo microbiano se presentan diferentes fases de crecimiento:

1. Lag o de retardo
2. Aceleración del crecimiento
3. Crecimiento exponencial
4. Desaceleración
5. Estacionaria
6. Declinación

Estas fases reflejan cambios en la biomasa y en el medio ambiente. Después de la fase Lag el crecimiento ocurre a la máxima velocidad y finalmente cesa, como resultado del balance entre los siguientes factores: carencia de nutriente, acumulación de un producto inhibitorio o algún cambio físico-químico en el medio ambiente.

Los modelos de crecimiento unicelular en crecimiento por lote, puede ser expresado en términos de concentración celular (X), de sustrato limitante (S) y el de un inhibidor (I).

En 1942, Monod (citado por Quintero, 1993), estableció un modelo de crecimiento celular; la ecuación describe la relación entre la velocidad específica del crecimiento (μ) y la concentración de nutriente limitante (S), en el cultivo:

Ecuación de Monod:
$$\mu = \frac{\mu_{\max} \cdot S}{K_s + S}$$

El valor de μ_{\max} , se obtiene al graficar μ como función de la concentración del sustrato. El valor de K_s , se obtiene cuando μ_{\max} es igual a la mitad ($\mu = 0.5 \mu_{\max}$).

En el cultivo continuo, la entrada del medio a una concentración del sustrato (fuente de carbono), S_0 ; y a un flujo volumétrico constante, F; dividida por el volumen del cultivo, V; se denomina tasa de dilución, D; ésta, es aproximadamente igual a μ , la cual también corresponde a la pendiente del crecimiento exponencial.

$$D = F/V$$

La producción de biomasa, (x, expresada en gramos), por la unidad de volumen por la unidad de tiempo del cultivo, se denomina productividad, $P = Dx$.

La razón entre la cantidad de células producidas o productos celulares y el sustrato consumido se denomina rendimiento o Y . Son 3 los rendimientos que se utilizan para operar un fermentador. Y_x , gramos de células/gramos de sustrato; Y_O , gramos de células/gramos de oxígeno; Y_{kcal} , kilocalorías desprendidas/kilogramos de células.

La μ es constante durante la fase exponencial del crecimiento cuando éste es proporcional a la masa de células presentes; la μ está en relación con el tiempo de duplicación (t_d), y la ecuación se integra entre los límites X y $2X$

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{0.693}{\mu}$$

Los estudios cinéticos son necesarios para entender el comportamiento de cualquier fermentación y consisten en la estimación de las velocidades de la síntesis celular, la formación de productos y los efectos del medio ambiente sobre estas velocidades.

En la cinética también deben considerarse las condiciones de temperatura, fuerza iónica y pH, mismas que se establecen al principio de la fermentación y que varían durante su transcurso, a menos que se controlen estrictamente, esto puede contribuir notablemente en el crecimiento celular y de los metabolitos secundarios que se produzcan (Quintero, 1993).

Cuando a un microorganismo se le proporcionan los nutrientes necesarios y las condiciones ambientales óptimas, realiza un conjunto de reacciones metabólicas, en las cuales las células crecen y/o producen algunos metabolitos de interés. La conversión de sustrato a biomasa determina el rendimiento del crecimiento celular, generalmente cuanto más oxidado está el sustrato, menor es el rendimiento (Quintero, 1993).

Otros factores que afectan al crecimiento son:

- **Temperatura**, a medida que ésta sube, el crecimiento y las reacciones enzimáticas son más rápidas; sin embargo, por encima de una cierta temperatura, las proteínas, ácidos nucleicos y otros componentes celulares pueden dañarse irreversiblemente, afectando la supervivencia microbiana. El efecto de la temperatura mínima no se conoce lo suficiente, pero ésta puede afectar en la fluidez de la membrana citoplasmática, quizá a una temperatura muy baja, pueda impedir el transporte adecuado de los nutrientes, así como la formación de gradientes protónicos (Madigan, 1998).
- **pH**, cada microorganismo tiene un pH óptimo; independientemente de las condiciones externas (pH extracelular), debe permanecer cercano a la neutralidad, con la finalidad de impedir la destrucción de macromoléculas lábiles en condiciones ácidas o alcalinas. En un medio de cultivo, con medio

lábil en condiciones ácidas o alcalinas. En un medio de cultivo, con medio no renovado, el pH puede cambiar durante el crecimiento como consecuencia de las reacciones metabólicas, por ello se emplean amortiguadores para mantener constante el pH, mismo que depende del tipo de organismo, ya que debe permanecer en hongos de 4.5 a 7.0, en levaduras de 4.5 a 6.0 y en bacterias de 6.0 a 7.5 (Madigan, 1998).

- **Agua**, todos los microorganismos requieren agua y su disponibilidad depende no solo del contenido de ésta en el medio ambiente, sino también de la concentración de solutos en ella; si el agua está asociada a los solutos, entonces no está disponible para los microorganismos. La disponibilidad de agua se expresa generalmente en términos físicos como “actividad de agua” (aw), que es la razón entre la presión de vapor del aire en equilibrio con una sustancia o solución y la presión de vapor a la misma temperatura del agua pura. El agua se difunde de una región de baja concentración de soluto, a otra de mayor concentración de solutos (osmosis). Los solutos que se acumulan en el citoplasma para ajustar la actividad de agua no deben ser inhibitorios para la bioquímica celular; ya que estos compuestos, son muy solubles en agua e incluyen diversos azúcares, polialcoholes, aminoácidos y derivados (Bailey, 1986).
- **Aire**, para el crecimiento de muchos microorganismos aeróbicos es necesario suministrar suficiente aire debido a la baja solubilidad del oxígeno, ya que el que es utilizado durante el crecimiento microbiano no es reemplazado siempre por difusión del aire; además, la oxidación de la fuente de carbono y su transformación en células, productos y CO₂, establece una demanda de oxígeno que es esencial satisfacer a través de la aereación y mezclado del cultivo (Bailey, 1986; Madigan, 1998; Quintero, 1993).

Las levaduras y hongos filamentosos pueden crecer en muy diversos substratos; se desarrollan en un amplio rango de temperatura y un pH de 2 a 7; por lo tanto, los nutrientes utilizados y las condiciones de cultivo son muy importantes para la producción de biomasa y metabolitos secundarios a partir de estos microorganismos (Quintero, 1993).

La composición de los medios de cultivo se clasifican químicamente en definidos y complejos dependiendo de si su composición es conocida o no. Es necesario un balance de los componentes elementales para proporcionar los nutrientes requeridos para obtener la biomasa. Los microorganismos requieren para su crecimiento una fuente de energía y una de carbono, en la mayoría de la fermentaciones industriales una misma fuente provee ambas y es necesario que la fuente de materia contenga todos los elementos constitutivos de la masa celular en las proporciones requeridas para la composición interna del organismo

(H₂, O₂, C, N₂, S, P, Mg, Mn, Ca, Fe, Co, Zn, Cu, Mo) (Stanbury, 1984).

La composición celular depende del tipo de microorganismos; por ejemplo, las bacterias levaduras y hongos, caen en el siguiente rango: carbón 45-55%, nitrógeno 6-14% potasio 0.5-2%, fósforo 1-3%, magnesio 0.1-1%, azufre 0.02-1%, calcio 1%, (porcentaje en peso seco). También están presentes minerales menores tales como cobre 0.1-10mg, fierro 1-10mg, zinc 1mg y manganeso 0-5mg. (Trivedi *et al* 1986).

La formulación del medio de cultivo debe considerar todos los elementos antes mencionados además de otros necesarios para la producción de metabolitos especiales como los pigmentos, antibióticos, y enzimas, entre otros. Los constituyentes se clasifican en grupos de la A a la D. El grupo "A" contiene todos los nutrientes necesarios excepto nitrógeno (Glucosa, KH₂PO₄, MgSO₄·7H₂O, CaCl₂, Fe₂(SO₄)₃, ZnSO₄·7H₂O, CuSO₄·7H₂O, MnSO₄·H₂O); el grupo "B" provee nitrógeno en forma de ion amonio, que es metabolizado por la mayoría de los microorganismos en forma de sales minerales (NH₄Cl, NH₄(SO₄)₂) y/o compuestos orgánicos (urea, aminoácidos). La función del grupo "C", un quelato cuya fórmula general es C₆H₇Na₃O₇·2H₂O, proporciona el ion metal en solución, éste también causa efectos tóxicos, sobre todo cuando el inóculo es pequeño. La propiedad buffer de los componentes del grupo "D" es necesaria para mantener el pH adecuado (Na₂HPO₄, KH₂PO₄).

1.3.1 Cultivo continuo para la producción de Proteína Unicelular (PUC)

En la década de los 60's y principios de los 70's, tuvo un gran auge la producción de proteínas unicelulares, pues se pensaba que era una solución posible a los problemas alimentarios del mundo. Su producción por medio de cultivos mixtos fue basada en sustratos no convencionales, por ejemplo, en las parafinas y el metanol (Casas y col. 1971).

La mayor experiencia en la producción y uso de PUC, se ha dado con la levadura *Candida utilis* (*Torulopsis*) y la *Saccharomyces cerevisiae*, utilizada por más de 50 años en diversos países y aprobada en los Estados Unidos por la Food Drug Administration (FDA) para consumo animal y humano (De la Torre, 1993; Kirsop, 1988).

Otra levadura es la *S. exiguus*, la cual es preferida a la *S. cerevisiae* en el levantamiento de masas agrias en panificación, por tolerar más altas concentraciones de ácido acético. Además, tiene la característica de utilizar como fuente de carbono, el alcohol etílico (Aguirre, 1993; Espinoza, 1992; Galán, 1981; Olguín, 1993). La *S. exiguus*, forma un pseudomicelio y en su fase amórfica se le conoce como *C. holmii* (American Type Culture Collection "A.T.C.C.", 1990, Alexopoulos, 1956).

En un trabajo preliminar realizado en la sala de Biotecnología del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, con la levadura *S. exiguus* y el hongo HPPRI en cultivo continuo, se estableció que es posible mantener el predominio de la forma miceliar sobre la forma oval, que en un principio es de color blanco y posteriormente cambia a rojo; para lograr esto, la concentración del alcohol etílico, no debe ser mayor al 3% para evitar la pérdida del pigmento en la forma miceliar (Álvarez, *et al.*, 1994b).

1.3.2 Producción de carotenoides por un cultivo mixto mediante cultivo continuo.

Los carotenos son de reciente interés por su potencial de prevenir y disminuir enfermedades como la arteriosclerosis, cáncer, y el envejecimiento; estos actúan como micronutrientes con actividad antioxidante inhibiendo la lipídoperoxidación, pues en gran parte los componentes en las membranas celulares son ácidos grasos poliinsaturados; otros componentes intracelulares sujetos a oxidación pero en menor grado son las enzimas y los ácidos desoxirribonucleico. En la figura 1 se muestran los radicales libres generados de fuentes endógenas como la cadena respiratoria, enzimas oxidantes, células fagocíticas, etc. y/o exógenas como los alimentos, contaminantes, fármacos, humo de cigarro, etc. (Pineda, 1994).

Los carotenos (CH), tienen dobles enlaces que pueden autooxidarse por reaccionar con el oxígeno atmosférico, aunque la velocidad con la que se oxiden, dependerá de la luz, temperatura y presencia de prooxidantes y antioxidantes; combinarse con radicales libres de ácidos grasos (ROO·) forman el lípido-hidroperóxido (ROOH) y un radical caroteno (C·) (Frankel, 1993; Haard, 1992).

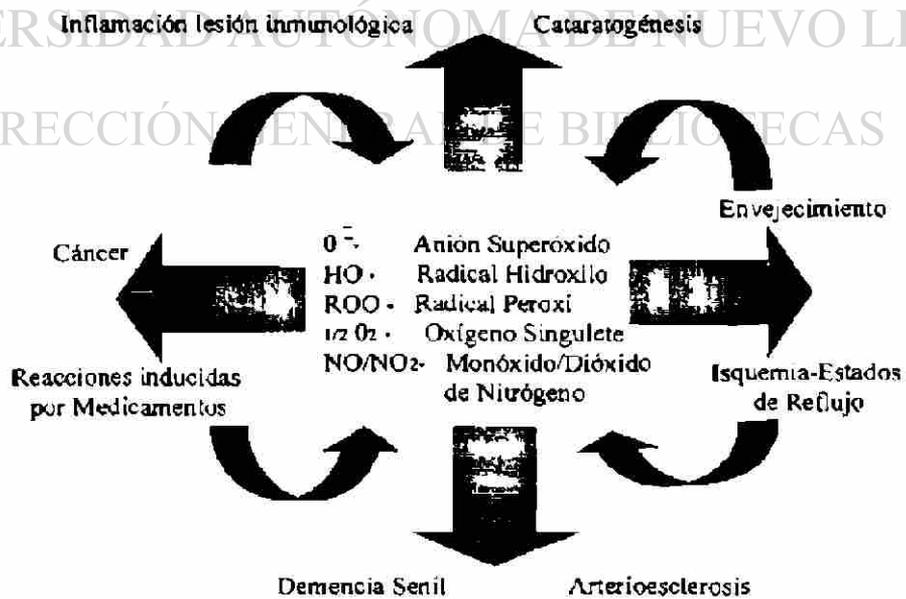


Figura 1.- Los Carotenos como antioxidantes en la prevención de enfermedades.

La estructura química de los carotenoides es poliénica, consta de 40 átomos de carbono, formada por ocho unidades de isopreno, cuyo arreglo se hace inverso en el centro; pueden ser lineales o tener ciclizaciones en los extremos. El nombre genérico de "carotenoides" deriva de la zanahoria *Dacus carota* (Badui, 1994).

Se dividen en dos grandes grupos por su estructura química:

Carotenos, tienen características de hidrocarburos, son solubles en éter de petróleo y un poco en etanol; ejemplos: α , β , γ -carotenos, y licopeno.

Xantófilas, son la forma oxidada de los carotenos, se presentan como ácidos, aldehídos o alcoholes y son solubles en etanol, metanol y éter de petróleo; ejemplos: fucoxantina, luteína, zeoxantina y astaxantina.

Ambos grupos deben sus colores amarillo, anaranjado y rojo, a la conjugación de los dobles enlaces, así como la presencia de los anillos aromáticos en los extremos, en estado natural su configuración es *trans* y con algunas excepciones *cis*. Las modificaciones en estas estructuras provocan cambios notorios en el color (Goodwin, 1976; Gordon, *et al.*, 1983; Haard, 1992).

Los carotenoides junto a la clorofila, se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, en plantas, algas y bacterias fotosintéticas; colorean las hojas otoñales, frutos y algunas flores y raíces de plantas; hongos superiores y levaduras; así como el exoesqueleto de los mariscos y el plumaje de muchas aves, entre otros. Sin ellos, la carne, muchos pescados, los huevos y la mantequilla tendrían un aspecto que nos parecería poco sano y nada apetitoso (Ando, *et al.*, 1989; Setsuko, *et al.*, 1994; Sommer, *et al.*, 1991).

En las plantas y los microorganismos, los carotenoides son sintetizados como metabolitos secundarios, que se producen por una necesidad de protección a los rayos UV, pero también absorben la luz con fines fotosintéticos a partir de dos moléculas de Acetil-CoA (fig.2).

La biosíntesis de los carotenoides (terpenoides), es a partir del ácido mevalónico, caracterizado porque en su estructura se repite una unidad de 5 carbonos conocida como isopreno; 8 moléculas de ésta, más 1 pirofosfato, forman el prefitoeno. La pérdida del pirofosfato y la apertura del anillo dan lugar al fitoeno, caroteno incoloro a partir del que se sintetizan todos los demás (Cortés, 1993b).

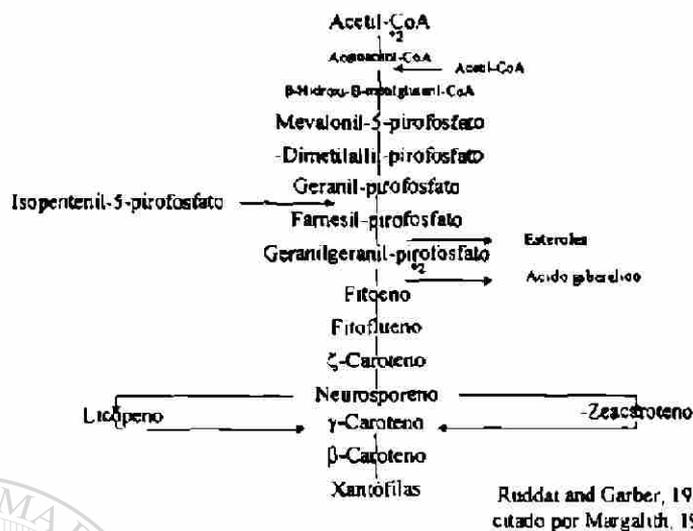


Figura 2.- Biosíntesis de betacarotenos y xantófilas en microorganismos.

La carotenogénesis microbiana y vegetal se induce por diversos factores durante su producción via reactor tales como la luz azul o roja, que son un buen fotoinductor (Medrano, *et al.*, 1969); y en ausencia de luz, se induce por la adición de sustancias como γ -hidroximercuribenzoato, γ -cloro-mercuribenzoato, dimetilformamida, succinamida, isonicotinil hidrazina y la β -ionona (Margalith, 1992). En el medio de cultivo, la presencia de glucosa, acetato, leucina o extracto de levadura se convierte en mevalonato, que es el precursor de todos los terpenoides, el retinol o la vitamina A (Kirsop, *et al.*, 1988).

La toma de substratos, excreción de productos y el curso del metabolismo intracelular, dependen del control combinado de los antecedentes genéticos de la célula y las condiciones del medio ambiente (Madigan, 1998).

Los productos de la oxidación de carotenoides en cultivos de plantas y microorganismos, incluyen compuestos volátiles, los cuales tienen aromas florales como el aspirano, la β -ionona y la β -damascenona y frutales como el β -13, y el β -14 apocarotenales (Haard, 1992).

Los inhibidores de la carotenogénesis son la difenilamina, nicotina, piridina, imidazole, fenilpiridazinona, 2, (4 clorofeniltio) trietilamina, así como las concentraciones elevadas de alcanos, saturar el medio con nitrógeno y la exposición prolongada a temperaturas altas (Haan, *et al.*, 1991).

En Japón, se ha obtenido un caroteno color rojo del hongo *Monascus anka* y del *M. purpureus*, mismo que se ha utilizado desde hace cientos de años como colorante alimenticio, y destacando la fuente de glutamato monosódico como estimulante de la carotenogénesis;

por el contrario, una alta concentración de fosfatos y sulfatos de magnesio tienen un efecto inhibitorio (Blanc *et al* 1994, Lin, *et al.*, 1991; Zhang *et al.*, 1982). Watanabe, 1974 citado por Francis, 1987 aisló un pigmento rojo de la *Penicillium purpurogen*.

La presencia de ácido trispórico colorea de color rojo los cigóforos *Blakesleea trispora*, y *Phycomyces sp.*; también se habla de la inducción de pigmentos en cultivos mixtos (Tafuya, *et al.*, 1993; Frengova, 1994).

Otro pigmento rojo es la astaxantina (3,3'-dihroxi-4,4'-diceto- β -caroteno), que se obtiene del basidiomiceto *Phaffia rhodozyma* (Andrews *et al* 1976) utilizando diversas fuentes de carbono como la glucosa, la celobiosa, el etanol, el succinato de N-glutamina, la urea, el sulfato de amonio y algunos materiales vegetales de desecho como tomates, chícharos y uvas (Meyers, 1994, Longo *et al*, 1992). Al existir cambios en la temperatura se producen otros carotenos diferentes como el toruleno y la torularodina (Polulyakhov, 1991).

Sobre cultivos mixtos para la obtención de pigmento rojo con aplicación en la industria alimenticia están la *Rodothorula glutinisin* y el *Lactobacillus helveticus* (Frengova, 1994), así como la *Phaffia* y el *Bacillus circulans*; este último produce enzimas que liberan el pigmento de la levadura (Johnson, *et al.*, 1991).

1.3.3 Determinación de la concentración celular

La concentración celular (X), se refiere al número de células y/o su masa celular; éstas, se pueden determinar por diferentes métodos dependiendo de las características físicas de los microorganismos, principalmente por su tamaño; puede contarse el número de células utilizando un microscopio histológico (Ross, 1979).

Otro procedimiento es "platear", es decir, colocar un volumen pequeño del cultivo en una caja "Petri" con agar nutritivo, e incubarlo a una determinada temperatura durante un tiempo fijo; el resultado se obtiene contando las colonias y se multiplica por la dilución que se haya hecho (Larone 1987, Gimeno *et al*, 1993).

El método más empleado es el fotométrico, se utiliza un filtro azul para medir la dispersión de la luz. El método espectrofotométrico cuantifica la concentración celular midiendo la absorbancia para levaduras a una longitud de onda de 650nm y para bacterias a 635nm.

Los microorganismos miceliales se determinan por peso seco, cuya técnica consiste en centrifugar o filtrar con papel millipore; se lavan cuidadosamente con agua o solución amortiguadora y se ponen a secar al vacío con una temperatura de 100°C de 6 a 18h hasta alcanzar un peso constante (Quintero, 1990).

1.3.4 Determinación del color rojo en hongos y levaduras

Para extraer los pigmentos existen diversos métodos físicos, químicos y enzimáticos, en particular para los carotenoides libres, su sensibilidad a la luz, calor, oxígeno y ácidos lo hacen sumamente inestable, por lo que es necesario agregar antioxidantes durante este proceso.

Para la extracción del pigmento en hongos se recomienda combinar varios procedimientos usando hidróxido de potasio, fenol y solventes orgánicos como: acetona, metanol, etanol, tetrahidrofurano o dimetilsulfóxido, previo congelamiento con dióxido de carbono, o molido en un mortero con arena y sulfato de sodio anhidro. Opcionalmente se pueden añadir enzimas, o sonificar para romper la pared celular (Goodwin, 1976, Farkas, 1979).

La extracción con fluidos supercríticos, utilizando dióxido de carbono modificado con etanol, ha recibido atención por no dejar residuos químicos en el material y utiliza temperaturas moderadas (Spanos, *et al.*, 1993; Marsili, *et al.*, 1993).

Los tejidos que van a ser analizados se almacenan a -10°C o se liofilizan en la presencia de uno o más antioxidantes sintéticos, que actúan como donadores de protones, tales como: Etoxiquin, ETQ; derivados fenólicos como los tocoferoles naturales y sintéticos; butilhidroxianisol, BHA; butilhidroxitolueno, BHT; galato de propilo y terbutilhidroxiquinona, TBHQ; o bien, pueden ser naturales, que son inhibidores de radicales libres, como el ácido ascórbico (vitamina C) y ascorbil palmitato (Badui, 1994, Kanner, 1994, Sherwin, 1972).

Por último, se transfieren en éter de petróleo, acetona o hexano, o bien, se recuperan en aceite de soya removiendo el éter en un rotavapor al vacío (Andrews, *et al.*, 1976; Nam, *et al.*, 1988; Sedemak, *et al.*, 1990).

La determinación de carotenos totales en las células intactas suspendidas en agua destilada muestran una máxima longitud de onda de absorción a 490nm y puede seleccionarse una emisión láser del ion argón a 488nm de excitación y medirse en un microscopio con contraste de fase y obtenerse una relación entre la fluorescencia y el contenido de carotenoides dentro de la célula sin observar diferencias por el crecimiento del pseudomicelio (Gil, 1994).

Gil-Hwan, *et al.* (1989), han aislado y caracterizado levaduras mutantes hiperproductoras de carotenoides por citometría de flujo y microscopía fluorescente de barrido con focal láser. También se pueden cuantificar de manera directa por métodos de análisis sensorial (comparación colorimétrica) e instrumental como la espectrofotometría de reflectancia e indirecta previa extracción y purificación por espectrofotometría ultravioleta-visible de transmitancia.

Para identificarlos y cuantificarlos individualmente se separan por cromatografía en una capa fina de fase normal: sílica gel G alcalina con antioxidante, alumina, microcelulosa y de papel como fase estacionaria y solventes orgánicos no polares como fase móvil (Wu, *et al.*, 1994), y en fase reversa: sílica gel G impregnada con parafina o aceites: C18 y solventes orgánicos polares y agua (Sthal, 1967), se identifican por su color y su Factor de Retardo o Frente Relativo (Rf, por sus siglas en inglés), que es la distancia en centímetros recorrida por el pigmento entre la distancia en centímetros recorrida por el eluyente y multiplicado por 100; se cuantifican por espectrofotometría de ultravioleta-visible, reflectancia o infrarrojo con transformada de Fourier (Monteville, *et al.*, 1991; Goodwin, 1976).

Otro método alternativo es la Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC por sus siglas en inglés) en fase reversa, acoplado como detector un espectro de masas (Sedmak, 1990; Nam, *et al.*, 1988, Lindsay, 1992, Nelis, 1989).

1.4 Acuicultura

1.4.1 Cultivo del camarón

El cultivo del camarón a nivel laboratorio implica un entendimiento de la fisiología del espécimen en estudio, desde su ciclo biológico, identificación y nutrición en cada estadio, hasta la elaboración de dietas, patología, parámetros físico-químicos de la calidad de agua y microbiológicos (Pruder, 1994, Provenzano, 1983). Además de esto, la preparación del agua marina sintética y el diseño hidráulico del sistema que permita una adecuada aireación, una buena recirculación del agua, así como el sistema de purificación para reciclar en agua, los controles de temperatura y luminosidad (Ricque, 1990).

El crecimiento del camarón está influenciado por dos tipos de factores: los intrínsecos, como la salud, genética, entre otros; y los extrínsecos, como la calidad del alimento, el desarrollo, la competencia por espacio y alimento, etc. (Tacon, 1987, Ponce, 1990).

La calidad de un alimento en particular para el cultivo del camarón, es principalmente el aspecto de atractabilidad y palatabilidad, ya que aun, cuando un alimento nutricionalmente está balanceado, resulta de poco valor si no es consumido por el camarón. La mayoría de los atractantes utilizados son aminoácidos (homarina, taurina, prolina), nucleótidos (ATP, ADP, AMP), compuestos cuaternarios de amonio (betaleínas) y ácidos orgánicos (Costero, 1993). Por otra parte, contribuye de manera importante la estabilidad del alimento durante su elaboración y almacenaje porque repercutiría en su valor nutricional y económico; así como el contenido de vitaminas, biodisponibilidad, digestibilidad de proteínas, perfil de

aminoácidos, rancidez de grasas y aceites (Ricque, 1992 y 1994) y de sus interacciones con la producción de compuestos tóxicos como la mollerosina (Abdo *et al* 1990).

Para la fabricación de las dietas experimentales, se incluye desde la compra de las materias primas, análisis bromatológicos de los ingredientes, previa selección conforme a las necesidades fisiológicas del camarón; la formulación se hace con la ayuda de un programa computarizado llamado Mixit (Salazar, 1993; Hardy, 1991; Akiyama *et al*, 1991).

Durante el procesamiento de las dietas y su posterior almacenaje, es necesario establecer controles de calidad y complementar con pruebas de lixiviación, biodisponibilidad y digestión *in vitro* (Cruz 1990a y b; De La Cruz *et al* 1989; Akiyama *et al*, 1998).

1.4.2 Importancia de las proteínas

Las proteínas dentro de la dieta de los camarones, está fundamentada desde el punto de vista económico y nutritivo.

Dentro del contexto económico cabe considerar que el alimento constituye uno de los gastos más importantes en el costo de producción de los cultivos, que es aproximadamente del 60%, y la fracción proteica del alimento constituye una porción fundamental de éste.

En cuanto al plano nutricional, las proteínas no son solo importantes sino indispensables, ya que los camarones, en contraste con los organismos terrestres, son capaces de derivar más energía metabolizable del catabolismo proteico que de los carbohidratos. Por lo anterior, los requerimientos de este nutriente han sido extensivamente estudiados por diferentes autores, los cuales mencionan que su nivel de incorporación dentro de los alimentos comerciales varía de 25 a 55%. Esta variación se da en función de la edad, de los hábitos alimenticios de la especie, de la calidad de la fuente proteica (Henley, 1994; IFAMM; 1970), su digestibilidad (Cho, 1979) y del valor energético de la dieta, entre otros (Glass *et al*, 1989; Cruz *et al*, 1993).

La proteína de la dieta es utilizada por el camarón para diversos fines como el mantenimiento y reparación de tejidos, crecimiento, formación de nuevas proteínas funcionales y estructurales (hormonas, enzimas, anticuerpos, etc.) y una gran cantidad de sustancias de importancia biológica, además de servir como sustrato para la formación de carbohidratos y lípidos. Por ello, se requiere incorporar en la dieta ingredientes con alto contenido proteico, puesto que, una vez cubierta la ración de mantenimiento, existe una relación directa casi lineal entre la ración proteica y la tasa de crecimiento, hasta llegar al requerimiento proteico que corresponde al punto de máximo de crecimiento, y a partir del cual, aunque se agregue más proteína, el crecimiento no aumenta (Koshio *et al*, 1993).

El interés del uso de levaduras en la nutrición de peces y crustáceos es un antiguo tópico,

debido a su calidad proteica rica en lisina, biodisponibilidad, contenido en vitaminas del grupo B, oligoelementos, fósforo formado a partir de ácidos nucleicos (estos últimos actúan como precursores de atractantes) y por su contenido de carotenos (Haard, 1992).

Además aunado a esto, la levadura tiene la ventaja de que hay menos destrucción durante el proceso de fabricación de los alimentos de las vitaminas y factores de crecimiento desconocidos por estar encapsulados (Cuzón, 1994; Coutteau, 1990).

1.4.3 Pigmentos en acuicultura

La primera impresión que nosotros tenemos acerca de la calidad o aceptabilidad de un alimento es organoléptica, principalmente, la visual. Los colores de los alimentos se deben a distintos compuestos orgánicos, algunos se producen durante su manejo y procesamiento, y otros son añadidos, como los pigmentos y colorantes, para obtener una coloración deseada en la carne de los peces o crustáceos en cautiverio (Latscha, 1991; Castro, 1993b; Lewis, 1990).

Se reconocen diversos agentes de color sintético y natural; estos últimos pueden ser de procedencia vegetal como los derivados tetrapirrólicos, los omnocromos, las melaninas, los indigoides, las quinonas, las flavinas, las purinas, las pteridinas y los carotenoides o de procedencia animal como las heme-proteínas (Badui, 1994), carotenoides y otros (Simpson, 1981).

Los carotenoides junto con las melaninas son los más abundantes en la naturaleza; sin embargo, solo son sintetizados "de novo" por las plantas y algunos microorganismos; por lo tanto, los animales son completamente dependientes de la obtención de estos suplementos por medio de la dieta, los cuales transforman en metabolitos activos, ya sea para cumplir funciones bioquímicas y/o de pigmentación (Meyer 1986, 1994; Monasveta, 1993).

Estudios en camarones indican que los carotenoides en particular la astaxantina, no será más considerada que como pigmento y se le clasifica como vitamina soluble en grasa (Cortés, 1993a); además la astaxantina, junto con la vitamina C y E, son antioxidantes naturales que toman parte de la defensa contra los radicales libres (He, 1993; Ingensamson, 1993; Setusko, 1994). El camarón no es capaz de sintetizar astaxantina "de novo", por lo tanto, debe ser incluida en su dieta (Haard, 1987); fuentes naturales de astaxantina son las harinas de Krill (*Euphasia superba* y *Thysanoessa* sp.), cabeza de camarón (Johnson, 1989), langosta (Ya, 1991), soya y de levaduras (Trivedi, 1986).

Varios estudios con la astaxantina sintética llamada *Carophyll pink*, producida por La Roche © contiene un 80% del 3,3'-dihidroxi-4-4'-diceto-β-caroteno, muestran tanto en camarones como en peces, una alta sobrevivencia, mejor crecimiento y aumento en la

respuesta inmune. A pesar de su baja palatabilidad (Arango, 1994; D'Abramo, 1995; Haard, 1987; Kurkumaly, 1993; Negre, 1993).

Los factores que influyen en la pigmentación de los crustáceos son: por parte del pigmento la cantidad, estructura química, estabilidad, biodisponibilidad, forma y tiempo de administración; por parte de la dieta: la calidad del alimento, composición, manufactura, toma de alimento/FCR; según la especie: su genética, desarrollo, estadio (muda), metabolismo, sexo, estado nutricional, enfermedad (infección bacteriana, virosis, fúngica, parásitos, intoxicaciones) (Matson, 1986; Torrison 1989 citado por Meyer, 1993; Torrison 1990).

Principales Factores que Influyen en la Pigmentación del Camarón

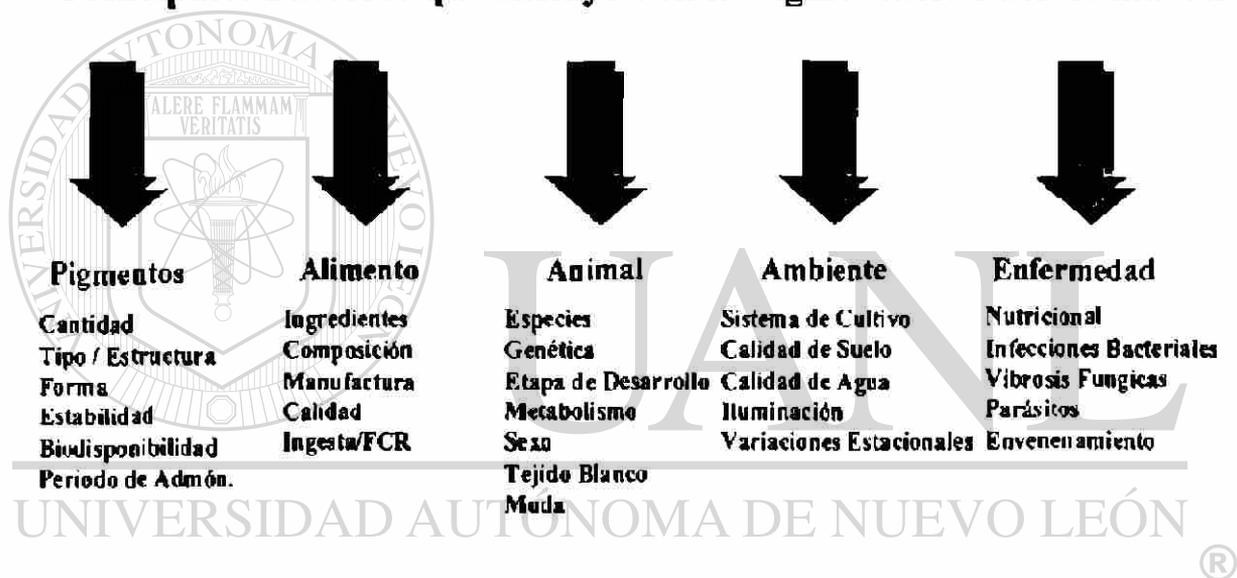
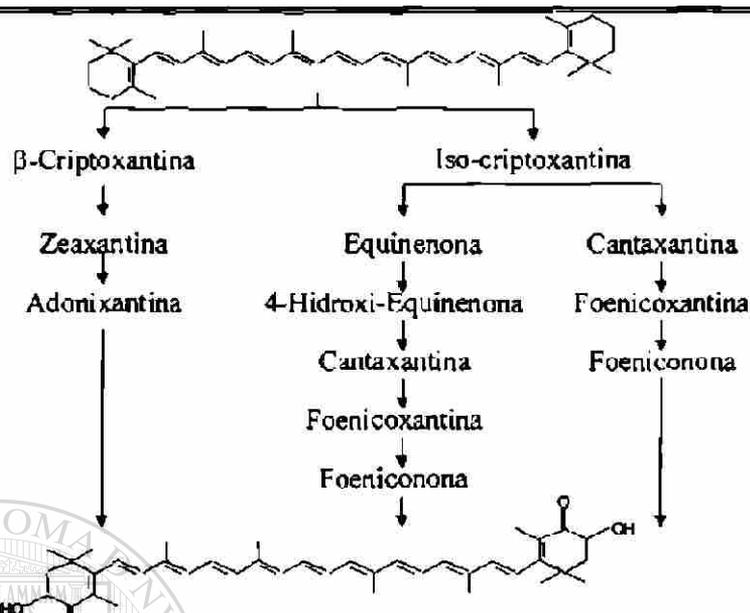


Figura 3.- Factores que afectan en la pigmentación de Peneidos.

La mayor parte de los pigmentos en los camarones son metabolizados en el hepatopáncreas, el cual también tiene las funciones de depósito temporal y donde el β -caroteno es transformado en astaxantina (fig 2), la forma esterificada de la astaxantina se encuentra en el tejido epidérmico (músculo), y se localiza en los cromóforos hipodérmicos y la capa pigmentada de la epidermis del exoesqueleto, donde predominan las carotenoproteínas y los carotenolípidos. (Matson, 1986; Meyer 1994; Torrison *et al*, 1990; Vincent 1988).



Latscha T., 1991

Figura 4.- Biotransformación del Betacaroteno - Astaxantina.

En los *Litopenaeus vannamei*, *L. monodon*, *L. japonicum*, los pigmentos se encuentran en los músculos en forma de mono y diester-carotenoides, (Chien 1992; Menasveta 1993; Yamada 1990).

1.4.4 Actividad inmunoestimulante

La producción de camarón en cultivos intensivos, representa una actividad de alto riesgo, ya que debido a su alta densidad de población se pueden desarrollar y transmitir patógenos con mayor frecuencia (Chávez, 1993; Boonyaratpalin, 1990).

En la actualidad se efectúan análisis de la calidad del agua; la detección de infecciones se efectúa sacrificando especímenes; asimismo, el uso de vacunas y antibióticos para su tratamiento resulta también a un elevado costo y poco resuelven la etiología primaria.

Un tratamiento alternativo es el uso de los probióticos (Ewing, 1989; Hoyos, 1990) e inmunoestimulantes (Dehasque, 1995a y b; Raa, 1992 y 1994) que permiten estudiar los mecanismos de defensa en el camarón (*Litopenaeus sp.*), el cual cuenta con un sistema de defensa no específico formado de lectinas, un sistema profenol oxidasa (proPO) y células con actividad fagocítica. Al ser activados estos mecanismos de defensa, se ha observado una mejora en la flora normal microbiana interna y externa, así como un aumento en la tolerancia en situaciones de estrés causados por cambios de temperatura, concentración de sales, manipulación y contaminación bacteriana, viral o química; por ejemplo, algunos virus y bacterias se mantienen latentes y solamente causarán enfermedad en casos de estrés como en la combinación de monodon baculovirus MBV y el *Vibrio spp.* (Nash, 1990; Sung, 1994a; Adler, 1994).

En el caso específico del *Vibrio* spp., bacteria asociada con el intestino, agallas y cutículas de camarón silvestre y cultivado; ha sido aislado en concentraciones bajas de la hemolinfa de camarones aparentemente sanos, mismo que probablemente fue introducido como resultado del estrés (Lightner, *et al.*, 1992).

Dentro de las reacciones de defensa en invertebrados, se observa con frecuencia la melanización; la enzima involucrada en la síntesis de melanina es la fenoloxidasa (PO), (E.C 1.103.1; o difenol oxígeno, óxido-reductasa), la cual es capaz de oxidar los fenoles a quinonas, que posteriormente polimerizan en forma no enzimática a la melanina (Vargas, 1992; Söderhäll, 1986).

Se ha demostrado que el camarón posee un sistema inmune prioritario que depende principalmente de la fagocitosis, encapsulación, aglutinación y la actividad de lisis de los hemocitos que son células circulantes en la hemolinfa, que contienen enzimas hidrolíticas como: fosfatasa ácida, β -gluco-oxidasa y esterasa (Smith y Söderhäll, 1986), su sistema inmune va dirigido a cualquier actividad celular o respuesta humoral provocada por la invasión microbiana o parasitaria, en reconocimiento inicial a algo extraño por el hospedero (Sung, 1996).

La respuesta inmune se realiza a través de un complejo en cascada de sirena de proteasas y otros factores en los hemocitos que son específicamente depositados por moléculas ajenas, como el sistema profenoloxidasa (proPO), y es limitado a las células semigranuladas y granuladas. La activación escalonada del ProPO, sirve como receptor de señales propias, liberada de la superficie de microorganismos o parásitos y concluye en la conversión de proenzima para activar la profenoloxidasa, la cual es necesaria para sintetizar la melanina bacterial; ésta, es activada por cantidades de 1,3-glucanos, liposacáridos o espontáneamente a bajas concentraciones de calcio (Smith y Söderhäll, 1991; Robertson, 1990) Existen numerosos reportes del aumento de sobrevivencia y evidencia de inmunostimulación debidas al β -glucano purificado, (Itami, *et al.*, 1993; Manners, 1974; Matsuo, 1993) lo que da apoyo a futuras investigaciones.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

II. OBJETIVOS

Objetivo General:

Investigar el desarrollo óptimo en cultivo continuo de un cultivo mixto en medio sintético para la producción de biomasa pigmentada de color rojo y su evaluación en nutrición de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

Objetivos Específicos:

1. Identificar los microorganismos presentes en el cultivo mixto.
2. Establecer parámetros de optimización del cultivo mixto, en cultivo continuo, en condiciones no estériles, para la producción de una biomasa pigmentada de color rojo, utilizando como fuente de carbono el alcohol etílico.
3. Caracterizar química y bioquímicamente la biomasa pigmentada de color rojo, deshidratada en polvo de HPPR1B y HPPR2.
4. Realizar bioensayos en la nutrición del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* para evaluar la biomasa pigmentada de color rojo como fuente proteica, activador del sistema inmunológico, anti-estrés y pigmentante.
5. Realizar bioensayo de digestibilidad de la proteína de la biomasa pigmentada HPPR2. ®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

III. MATERIAL Y METODOS

Se presentan en 2 apartados, correspondientes a las 2 etapas de la presente investigación:

Etapa I. - Producción de biomasa pigmentada en cultivo continuo que incluye las variables de la biosíntesis de pigmentos a partir de un cultivo mixto con la biomasa HPPR1 en fresco "A" y deshidratada "B", identificación de los microorganismos, su caracterización química y bioquímica de las biomasas HPPR1 B roja, y HPPR2 rosa (Victorino, 1995).

Etapa II.- Evaluación nutricional de las biomasas pigmentadas HPPR1 "B" y HPPR2 de color rosa, obtenida a partir de la primera plantilla de Plackett-Burmann, en el camarón blanco *Litopenneus vannamei* que incluye bioensayos de crecimiento, pigmentación, e inmunoestimulación con HPPR1 "B" y de digestibilidad de proteínas con la HPPR2.

ETAPA I - Producción de biomasa pigmentada a partir de un cultivo mixto en un proceso continuo

3.1 Identificación de los microorganismos

La identificación de HPPR1 "A"; "B" y HPPR2 se realizó por aislamiento en placas con medios selectivos (Catálogo de levaduras A.T.C.C., 1990; Larone, 1987), por su morfología, en microcultivos (Koneman, *et al.*, 1985), y por pruebas de dimorfismo (Ross, 1979).

Para su observación al microscopio histológico (Zeiss), se tiñeron las pruebas con KOH, azul de metileno y de diazonio (Summerbell, 1985) y se tomaron fotografías; también se observaron al microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM-9. Previamente, las muestras se fijaron en glutaraldehído 2.5%, en buffer de fosfatos 0.1M, pH 7.2, y OsO4 2%, también en buffer, se deshidrataron con alcohol etílico cada 15 min al 65, 70, 75, ..., 100%, y se infiltraron en resina Embed. Se realizaron cortes de 60 y 90 nm de grosor con cuchilla de vidrio en un ultramicrotomo Porter Blum MT-1; y se colorearon con acetato de uranilo saturado y con citrato de plomo (Spur, 1969). Además se realizaron pruebas confirmatorias con tirillas de API Yeast 20 C (A.T.C.C., 1990).

3.2 Cultivo Mixto

3.2.1 Material biológico

Una muestra de biomasa pigmentada de color rojo fue proporcionada en un tubo de 20ml por el Dr. Hiram Medrano Roldán, jefe el Departamento de Biotecnología del Tecnológico de Durango. Al microscopio se observan levaduras e hifas no pigmentadas, pues el color se difunde. Está provenia de un cultivo de *Saccharomyces exiguus*, el cual presentó repentinamente una coloración roja, probablemente debido a una contaminación. En una práctica de cultivo continuo, a nivel de post-grado del curso de Ingeniería Bioquímica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL. Se reprodujo de nuevo la biomasa pigmentada de color rojo a la cual se le denominó hongo productor de color rojo número uno (HPPR1).

Este cultivo se describe con detalle en el anexo I (Alvarez, 1994a). Se cosecharon 72 litros de biomasa líquida a lo largo de 168h; La biomasa pigmentó despues de 120h de cultivo. A partir de las 140h se colectaron alrededor de 14 litros de biomasa a la salida del reactor, la cual se filtro y almacenó un volumen de medio litro cubierto con aceite mineral y se etiquetó como "A". Por otra parte al total de la biomasa líquida colectada en cuatro garrafones de 20 litros, se juntaron y se liofilizaron en el "Spray Dryer", se etiquetó como biomasa "B", se almacenó en frascos cerrados y protegidos de la luz. Cabe mencionar que solo la última fracción alrededor de 18 litros era bien pigmentada y por lo tanto, la concentración del pigmento total de la fracción "B" fue de un cuarto de la coloración obtenida en los últimos 18 litros. La biomasa HPPR2 fue proporcionada por el Macstro en Ciencias C. R. Victorino.

3.2.2 Preparación del medio de cultivo MM-LRM-ETOH

Para la preparación del medio de cultivo MM-LRM-ETOH, se pesaron las cantidades indicadas en las siguientes tablas, aforándose con agua de la llave a un litro.

Compuesto	Cantidad (g/l)
Etanol	7.8
Cloruro de Amonio (NH ₄ Cl)	5.0
Fosfato de Potasio Dibásico (KH ₂ PO ₄)	5.0
Sulfato de Magnesio (MgSO ₄)	2.5
Cloruro de Calcio (CaCl ₂)	0.1
Cloruro de Sodio (NaCl)	0.1
Líquido de Remojo de Maíz (LRM)	1 *
Solución de minerales más vitaminas	2.5 *

* ml

Relación de la solución de minerales más vitaminas:

Compuesto	Cantidad (mg/l)
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.0280
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.0140
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.0250
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.0240
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0.0240
MnSO ₄ ·H ₂ O	0.0840
Biotina	0.0002
Tiamina	0.0400

El pH se reguló con ácido clorhídrico (HCl) 1N; se añadió el alcohol etílico al 1% (V/V); se inoculó en un 2% con el cultivo activado y se mantuvo en cultivo intermitente (batch o lote) durante 14h., hasta obtenerse una DO de 1.6 para iniciar el cultivo continuo.

3.2.3 Preparación del inóculo a partir de la biomasa HPPRI "A"

La reactivación de las cepas se realizó en condiciones estériles en matraces Erlenmeyer con capacidad de 500ml; mismos que contenían 100ml de medio mineral (MM) y alcohol etílico (ETOH) al 1%.

El ETOH sintético fue proporcionado por la compañía CYDSA; se añadió una o varias asadas de las cepas conservadas en aceite mineral (la biomasa "A") y se colocaron en un agitador giratorio New Brunswick, a 25°C y 300rpm durante 36h. A partir de este se preparó el inóculo, tomando dos ml del medio de cultivo y se colocaron en un segundo matraz con MM y ETOH al 1%; se colocaron en el agitador con las mismas condiciones que el primero; se midió la densidad óptica (DO) a 650nm hasta obtener una DO de 1.6, misma que ocurrió a las 36h.

3.2.4 Preparación del inóculo a partir de la biomasa HPPRI "B"

La reactivación de las cepas "B", se realizó de la misma forma que " A"; durante 36h, posteriormente por triplicado se inocularon dos ml por matraz en tres diferentes medios de esporulación:

- MM - ETOH 1% con extracto de levadura 0.2 %
- MM - ETOH 1% con sulfato de amonio 0.2%
- MM - ETOH 1% con acetato de sodio 0.2% y un ml LRM (1:10).

Se agitaron a 300rpm a 25 C durante 48 a 60h hasta obtener el inóculo pigmentado de colores rosa, naranja o rojo. De 72 a 90 h se observaron la formación de "pellets", las cuales no son recomendables como inóculo. Se utilizó como inóculo el medio c , por presentar la mayor pigmentación.

3.2.5 Cultivo continuo

Se usaron Bioreactores New Brunswick Scientific modelo MF-21 de 14lts, con un volumen de trabajo de diez litros a los cuales se les añadió al 2% el inóculo.

Previo a su uso, los reactores se esterilizaron sin medio de cultivo, con vapor húmedo durante 15min. a una presión de 115mm de Hg.

Se calibraron con un tacómetro las potencias de los 3 reactores que trabajaron simultáneamente. Así, como la velocidad de alimentación de la bomba peristáltica de tres vías, se calibraron los electrodos de oxígeno con gas de Nitrógeno a cero y 100% en un bioreactor con agua y agitación; los de pH con soluciones amortiguadoras de 4 y 7, para la temperatura el sensor inmerso en agua con glicerol al 10% contra un termómetro. La espuma se controló con el antiespumante Down Corning FG-10 al 20%.

3.2.6 Optimización de la producción de pigmento "A"

La optimización de la producción del pigmento, se hizo a través del método Secuencial Simplex modificado (MSSM) (Hendrix, 1980); éste, es un proceso ortogonal en el cual todos los efectos pueden ser estimados independientemente unos de otros y se puede describir como una estrategia de retroalimentación estrictamente empírica y multifactorial de alta eficacia que permite ubicar con relativa rapidez el óptimo experimental, con cálculos variables de expansión, contracción o reflexión que determinan las condiciones del (los) siguiente(s) experimento(s), según las respuestas obtenidas.

En base a los resultados preliminares según Álvarez, *et al.*, (1994b), se determinaron 11 variables con valores altos y bajos o la adición o sustracción de algunos componentes del medio de cultivo durante un cultivo continuo y con un tiempo total del proceso de 120 h:

- 1) Concentración de iones hidrógeno pH
- 2) Volumen de aire / volumen de líquido / minuto (VVM)
- 3) Velocidad de alimentación (flujo ml/min.)
- 4) Temperatura (T °C)
- 5) Agitación (rpm)
- 6) Líquido de Remojo del Maiz presente o ausente en el cultivo continuo a las 22 h (LRM 0,1)
- 7) Reinoculación a las 48 h (2I)
- 8) Eliminación ó adición de vitaminas a las 64 h (V 0, 1)
- 9) Eliminación ó adición de minerales a las 80 h (M 0, 1)
- 10) Eliminación ó adición de NH₄Cl a las 96 h (N 0, 1)
- 11) Número de propelas Rushton (NP 2,3)

3.2.6.1 Optimización de la producción de pigmento HPPRI "A"

Con la biomasa "A", se utilizó la plantilla de Plackett Burman para ocho tratamientos, correspondientes a siete variables (k), más uno (k+1): pH tres y cuatro, VVM de medio y de uno, 500 y 700rpm, y la eliminación (0) o adición (1) de un segundo inóculo (2dol), vitaminas (V) y minerales (M) y el cloruro de amonio (N); cada uno agregado o eliminado

a la hora especificada en el listado anterior; se fijaron cuatro de las variables: temperatura a 30°C, tres propelas y el LRM presente durante las primeras 15h, y se eliminó al inicio de la adición del medio de cultivo con un flujo de alimentación de 400 ml/h:

t/v	rpm	VVM	pH	2doI	V	M	N
1	500	0.5	3	0	1	1	1
2	700	0.5	3	1	1	0	0
3	500	1.0	3	1	0	1	0
4	700	1.0	3	0	0	0	1
5	500	0.5	4	1	0	0	1
6	700	0.5	4	0	0	1	0
7	500	1.0	4	0	1	0	0
8	700	1.0	4	1	1	1	1

Las biomásas pigmentadas resultantes serán clasificadas según su color

3.2.6.2 Optimización de la producción de pigmento HPPRI "B"

Con la biomasa "B", se probaron las siguientes siete variables: temperatura de 20 y 25 °C, pH de 3.5 y 4.5, VVM de uno y 1.5, 300 y 400rpm, número de propelas dos y tres, cambio de flujo de alimentación de 400 a 600 ml/h a las 80h y la adición o eliminación del LRM a las 22h, cuando se inició la adición y sustracción simultánea del medio de cultivo.

t/v	Tº	pH	VVM	rpm	NP	F	LRM
9	20	3.5	1	300	3	600	1
10	25	3.5	1	400	3	400	0
11	20	4.5	1	400	2	600	0
12	25	4.5	1	300	2	400	1
13	20	3.5	1.5	400	2	400	1
14	25	3.5	1.5	300	2	600	0
15	20	4.5	1.5	300	3	400	0
16	25	4.5	1.5	400	3	600	1

3.2.6.3 Producción de pigmento HPPR2

A partir de las cepas aisladas de HPPRI A se obtuvo la biomasa de color rosa HPPR2. Durante su proceso se midieron los parámetros reológicos para establecer un diseño de bioproceso miceliar y su escalamiento (Victorino, 1995).

3.2.7 Parámetros de evaluación del cultivo continuo

Observación al microscopio, se observaron al microscopio estructuras ovaladas y pseudohifas, utilizando una solución al 1% de KOH, azul de metileno y azul de diazonio.

Cinética de crecimiento del cultivo continuo, se tomaron muestras del medio de cultivo de 4ml cada dos h; y se midió la DO en un Espectrofotómetro Turner M690 a una longitud de onda de 650nm. Cuando se presentó la fase micelar se cambió a peso seco y se tomaron 10ml del medio de cultivo a la salida del reactor cada dos h durante el cultivo continuo; se llevaron a una estufa de secado a 105°C a peso constante y colocaron los tubos en un desecador para que se enfriaran; finalmente se pesaron en una balanza analítica con una sensibilidad de 0.1 mg (Sartorius MoD. 2842), se determinó la diferencia en peso de los tubos, obteniendo el peso seco celular por litro de medio de cultivo (LMC); con la ecuación: $A=(B-C)/D$; donde A, representa los grs de biomasa por LMC; B, es la suma del peso del tubo y la materia seca expresada en grs; C, es el peso del tubo en grs y D, es el volumen de la muestra en lts. Posteriormente se graficaron curvas de crecimiento DO ó peso en grs contra tiempo.

Velocidad específica de crecimiento (μ) y el tiempo de duplicación (t_d), éstas se obtuvieron a partir de las gráficas de absorbancia o peso seco, contra el tiempo; la μ se obtiene de la pendiente de la curva de crecimiento; la t_d , se obtiene de dos puntos en la cinética de crecimiento (μ) donde la biomasa se duplica, estos datos también se obtienen con la siguiente fórmula:

$$t_d = \frac{0.693}{\mu}$$

Para la copa HPPR1 se calculó μ_{max} y K_s , al graficar volumen de etanol en % contra μ (Eisenthal, *et al.*, 1974).

Determinación del coeficiente de rendimiento celular, los coeficientes de rendimiento celular en base al sustrato ($Y_{x/s}$) fueron determinados por la relación de la biomasa celular y el consumo de alcohol etílico; éste se cuantificó en un Cromatógrafo de Gases Beckman modelo GC-72-15, con un detector de ionización de flama (FID siglas en ingles) y un integrador electrónico SP200, en una columna de acero inoxidable con la fase estacionaria sólida "Porapak Q" con una longitud de 1.26m y 0.32cm de diámetro, y las condiciones de análisis fueron: temperaturas de la columna a 120°C, inyector a 180°C y detector a 200°C. Como fase móvil un flujo de nitrógeno de 20 cc/min. Para su cuantificación se prepararon estándares de alcohol etílico y se usó como estándar interno el alcohol isopropílico, ambos solventes fueron de la firma Merck® (Olguín, 1993).

$$Y_{x/s} = \frac{X-X_0}{S_0-S}$$

$Y_{x/s}$ = Coeficiente de rendimiento en base a sustrato (g células secas/g sustrato)
 X = Concentración final de biomasa celular (g/L)
 X_0 = Concentración inicial de biomasa celular (g/L)
 S_0 = Concentración inicial de alcohol etílico (g/L)
 S = Concentración final de alcohol etílico (g/L)

Posteriormente se graficaron curvas de crecimiento (DO vs. tiempo en h; Eishthal, *et al.*, 1990).

Coeficiente de rendimiento del producto pigmento, se obtuvo con la ecuación: $Y_p = P/S$, que es la concentración de pigmento por sustrato (alcohol etílico, fuente de carbono) expresados en porcentaje. Para la determinación de los pigmentos en la biomasa, primero se cuantificó el pigmento a través de la medición de carotenos totales en un Espectrofotómetro Beckman modelo DU650, a 470nm de longitud de onda, y se usó como estándar la astaxantina sintética *Carophyll pink* de La Roche ®. Se mezcló con lana de vidrio y congeló con CO₂, se extrajo con acetona el pigmento del micelio, siendo necesaria la utilización de ultrasonido; se añadieron tres porciones de hexano y se lavó con agua destilada con cloruro de sodio al 1%, para romper la emulsión hexano-agua. Se juntaron los extractos de hexano y se añadió sulfato de sodio anhidro para eliminar el agua y se usó una mezcla de antioxidantes (ETQ y BHT al 0.1%), para proteger a los carotenos libres de la oxidación. (Sedmak, *et al.*, 1990).

Los extractos de hexano, se filtraron y se aforaron a un volumen de 20ml los cuales se leyeron en el espectrofotómetro de absorción a 470nm, (Ya Tu, *et al.*, 1991). La cuantificación de astaxantina se obtuvo mediante la fórmula siguiente:

$$\text{Astaxantina ppm} = \frac{(\text{DO } 470\text{nm}) (\text{Volumen de aforación}) (100)}{(\text{Peso húmedo en gramos}) (19.30^*)}$$

* Coeficiente de extinción de astaxantina en hexano = 1930

En un segundo método, se cuantificaron los pigmentos con un espectrofotómetro de reflectancia Modelo MS2020PL (fabricante Macbeth No. de serie: 22066038) y se usó el programa Color Mentor C2 versión 5.5 (Color formulation and control for pigment and oxide, Macbeth color-eye), este equipo pertenece a la empresa PYOSA planta San Nicolás de los Garza, donde se midió la fuerza del pigmento (Z) obtenida de los valores de luminosidad, rojicidad y tonalidad (Ver anexo II); para leer las muestras se tomaron 10ml

del medio de cultivo de la biomasa al inicio y al final del cultivo continuo, se filtraron en papel Whatman No.1, se secaron durante la noche en una estufa a 60°C y se almacenaron en la oscuridad en un legajo hasta que se efectuó su lectura. Se realizó una curva de calibración con una suspensión de biomasa de *Phaffia* de Merck®, la cual contiene una mezcla de carotenos (8000ppm de astaxantina) y con la *S. exiguus* color blanco se hicieron las diluciones correspondientes.

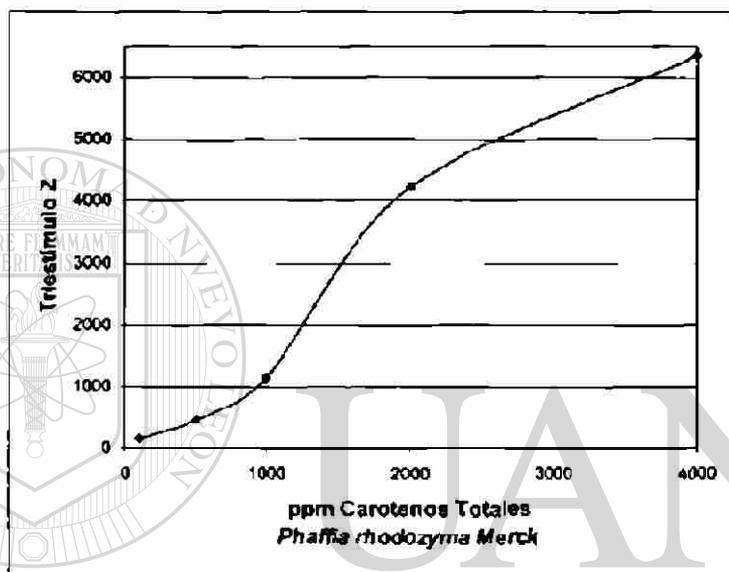


Figura 5 - Curva patrón de la fuerza del pigmento presente calculada para el valor triestímulo Z/ppm carotenos totales de la biomasa pigmentada *Phaffia*.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

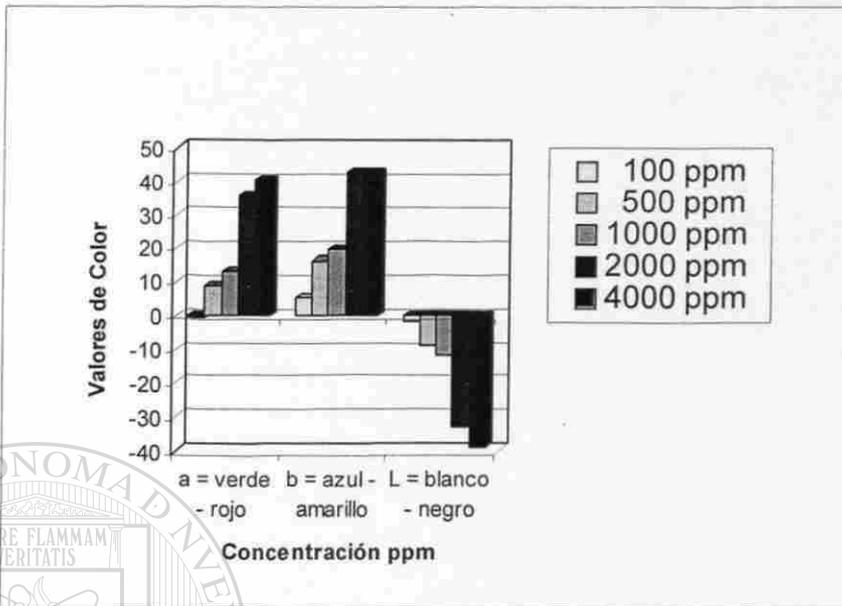


Figura 6.- Sistema de valores proporcionados por la Comisión Internacional de Iluminación (L^*a^*b).

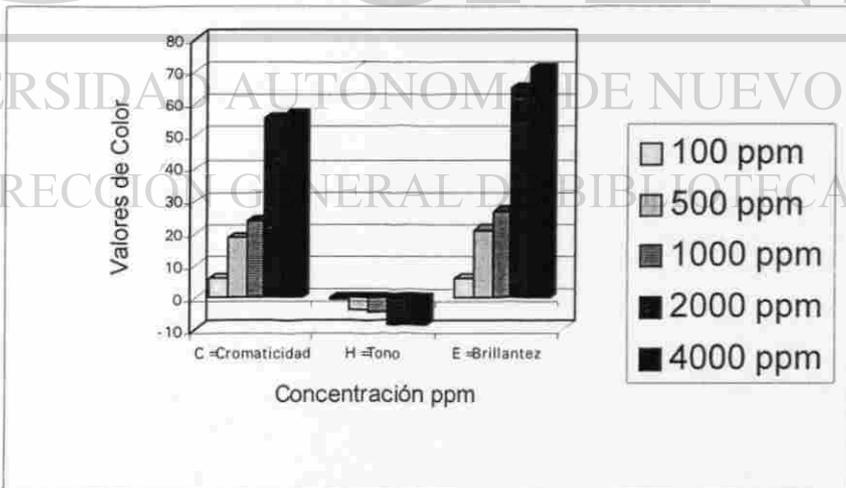


Figura 7.- Sistema de valores proporcionados por la Comisión Internacional de Iluminación (L^*H^*C).

Demanda de oxígeno (N_a) y coeficiente de transferencia (Kla), se midió la concentración celular en un Espectrofotómetro Turner M690 a una longitud de onda de 650 nm. Se determinaron los valores de N_a y Kla durante el cultivo continuo entre las 70 y 100 h, a

través del método dinámico de Tagushi-Humphrey (1966). Realizándose en dos fases:

- A) Se suspendió la entrada de aire, y con un electrodo medidor de oxígeno de respuesta rápida se midió la disminución de la concentración de oxígeno cada 10 segundos; se graficaron los resultados contra el tiempo, para obtener la tasa específica de consumo de oxígeno disuelto ($Q_{O_2} = \text{g mol-O}_2/\text{g-célula-h}$) a partir de la pendiente, la cual corresponde a la demanda de oxígeno (N_a).
- B) Antes de que alcanzara el valor crítico de C_L (Oxígeno disuelto en el seno del líquido), se inició de nuevo la aeración y se midió el aumento de la concentración de oxígeno cada 10 segundos; graficándose contra el tiempo, para obtener el coeficiente de transferencia (h^{-1}).

A partir del valor de N_a , se calculó el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno Kla (hr^{-1}); mediante la siguiente ecuación:

$$Kla = Na / (C^* - C_L)$$

N_a = Demanda de Oxígeno ($\text{g O}_2/\text{LMCxhora}$)

C^* = Concentración de oxígeno en el medio de cultivo al nivel de saturación ($\text{g O}_2/\text{l}$)

C_L = Concentración de oxígeno en el medio de cultivo durante el proceso de fermentación ($\text{g O}_2/\text{l}$)

Análisis Estadístico, se utilizó un modelo de predicción para definir que variables tuvieron efectos positivos o negativos en la producción de pigmentos; y a través de un análisis de ANOVA, se compararon las medias de la varianza a un nivel de significancia de 0.05. Dichos análisis se realizaron con el software Design ease 3.0.8 para Windows 1995.

3.2.8 Caracterización Química y bioquímica de Biomosas pigmentadas

Las biomosas HPPR1 "B" y HPPR2 fueron bromatológica y bioquímicamente caracterizadas.

Secado de biomosas, la biomasa pigmentada HPPR1 "B" obtenida en el reactor durante la fase final del cultivo continuo, se mezcló con la biomasa de color blanco-crema, misma que se colectó desde el inicio del cultivo continuo en tres garrafones con capacidad cada uno de 18 lto. Las biomosas homogenizadas HPPR1 "B" y la HPPR2 fueron liofilizadas

por separado en un equipo de secado en seco (Spray Dry) marca Apex mod SSE 6B, con una velocidad de alimentación de diez ml/min y a la temperatura más baja que registró el equipo (100°C).

Análisis proximal o bromatológico, se realizaron mediante métodos oficiales, se determinaron en por ciento los parámetros de: humedad, ceniza, proteína, grasa, fibra cruda, extracto libre de nitrógeno (A.O.A.C., 1990).

Caracterización de carotenos, los carotenos y las xantofilas se identificaron por cromatografía en capa fina (Wu, *et al.*, 1994) y los carotenos totales se cuantificaron en un Espectrofotómetro DU-600 Beckman a 470nm. Se compararon contra el estándar de *Carophyll pink* La Roche® y extractos de diversas fuentes de carotenos y xantofilas (Lindsay, 1992).

Perfil de aminoácidos, se realizó por HPLC en un equipo Beckman System Gold con detector de arreglo de diodos y un sistema computarizado donde se registraron los resultados: con una columna de intercambio iónico SPHEROGEL SE-sodio y se trabajó con un gradiente; la fase móvil en la bomba A fue un buffer NaPPB y en la bomba B Ninhidrina. las proteínas de la biomasa pigmentada se precipitaron con ácido tricloroacético; se cuantificó la proteína total por el método de Bradford. La hidrólisis de la proteína se realizó por digestión húmeda en un horno de microondas CEM. Se realizaron curvas de calibración con albúmina y estándares de aminoácidos (SIGMA). El análisis se realizó en una empresa particular de la industria de alimentos del Estado de México.

Digestibilidad de la proteína in vitro con pepsina, se determinó por el método estándar de la A.O.A.C. modificado por Torry (Castro, *et al.*, 1993; Olsen, 1992), se calcularon los datos con las siguientes fórmulas:

$$\% n = \frac{14.01 * a * n * 1000}{m * 100}$$

- % n = nitrógeno de la muestra
a = ml gastados en Titulación
n = normalidad del H₂SO₄
m = peso muestra en gramos

$$\% \text{ digestibilidad} = 100 * \frac{\% nb - \% na}{\% nb}$$

- % nb = nitrógeno de todos los reactivos menos el de la pepsina
% na = nitrógeno de la muestra digerida
% ntp = nitrógeno total de la muestra (sin digerir).

Etapa II - Evaluación Nutricional

Se realizaron cuatro bioensayos. El primero trata el crecimiento, el segundo la pigmentación, el tercero la digestibilidad de la proteína y el cuarto su actividad inmunoestimulante.

3.3 Formulación de dietas experimentales

Se realizaron las formulaciones de las dietas controles y experimentales (tablas de las páginas 40 y 42) con el software de nutrición Mixit, Agricultural software Consultants, INC; Hardy, 1991, en función de los resultados del análisis bromatológico de los ingredientes

Las dietas de los bioensayos crecimiento y pigmentación, la biomasa pigmentada se adicionó al 10%, la harina de pescado y de camarón se desgrasaron y despigmentaron por medio del método Bligh & Dyer (1959), debido a que estos ingredientes son la fuente más importante de pigmentos, quedando entonces solamente una pequeña aportación por el gluten, la harina de trigo y la pasta de soya.

Para el bioensayo de digestibilidad, las dietas experimentales se prepararon con la dieta base (Tabla de la página 38) y la biomasa pigmentada en una relación 70:30.

Para el bioensayo de inmunoestimulación, la biomasa pigmentada se aplicó externamente en aceite al 1%, la composición de los ingredientes en la dieta con un 30% de proteínas se calcularon con el programa "Mixit," utilizando las proporciones en peso seco siguientes:

Composición de ingredientes en la dieta para el bioensayo de inmunestimulación

Lista de ingredientes	% de inclusión
Harina de pescado	17.003
Harina Krill antártico	3.000
Pasta de Soya	7.572
Harina de Trigo	56.175
Gluten de trigo	8.000
L-Metionina	0.020
Fosfato monosódico	1.793
Vitamina C	0.025
Colina	0.031
Inositol	0.076
Mezcla vitamínica*	0.022
Colesterol	0.172
Lecitina de soya	3.285
Aceite de pescado	2.701
Antioxidante (ETQ)	0.020

*Mezcla vitamínica en la dieta mg/Kg: Vitamina K₃: 20; tiamina: 150; riboflavina: 100; cianocobalamina B₁₂: 0.1; ácido fólico: 20; piridoxina: 50; pantoténico: 100; niacina: 300; colina: 400; biotina: 1; inositol: 300; Vitamina A: 15,000 UI/Kg y Vitamina D3: 7,500 UI/Kg. (Akiyama, *et al.*, 1991).

Todos los ingredientes sólidos se molieron finamente en un turbomolino Pulvex^{MR}; se pesaron de acuerdo a la formulación y mezclándose en una batidora Kitchen-Aid^{MR} modelo K45SS de 5lts, primero se agregaron las harinas, que son los macroingredientes, por un lapso de 20 min; después se fueron agregando cada uno de los microingredientes y por último se añadió lentamente el aceite y 300 ml de agua, hasta obtener una pasta homogénea. La pasta se pasó por un molino de carne, TorKey^{MR} M22, con un dado de 2mm de diámetro de orificio. Con excepción de la dietas experimentales del cuarto bioensayo, el aceite se añadió después del secado. Los “pellets” se secaron en una estufa eléctrica Shel Lab^{MR}, M1130FX, por espacio de ocho min., a 100°C; finalmente se llevaron a temperatura ambiente y se conservaron en recipientes herméticos, debidamente etiquetados y en refrigeración.

Los nutrientes que aportaron el 30% de proteína fueron la harina de pescado y el coextruido de harina de soya con pasta de camarón o krill en una relación 1:1.

Un mínimo de 20%, máximo abierto de carbohidratos o extracto libre de nitrógeno (ELN) con harina de trigo; el 7.5% de lípidos con el aceite de pescado de Menhaden; ceniza máximo un 10%, fibra máximo 4% y un premix de vitaminas, colina, inositol y vitamina C, fueron incluidas en la dieta en cantidades recomendadas por Akiyama (1991). La dosis de vitamina E suplementada fue de 100ppm, ya que esta cantidad está reportada por He y Lawrence (1993), como un nivel óptimo para dar buen crecimiento sin generar un exceso que actúe como antioxidante. Además se agregaron 130ppm de antioxidante sintético ETQ para contrarrestar la oxidación por extrusión, ya que no genera residuos en exceso en las dietas experimentales.

Se elaboraron un kilo de cada una y al analizarlas, éstas fueron isoproteicas e isocalóricas, cubriendo los requerimientos nutricionales para el camarón (Akiyama, *et al.*, 1993a, 1993b).

3.4 *Análisis proximal de dietas experimentales*

En las dietas terminadas se determinó el por ciento de proteína, grasa, fibra, ceniza, humedad y por diferencia el Extracto Libre de Nitrógeno, utilizando los métodos oficiales (A.O.A.C., 1990) y estandarizados en los equipos automáticos de la línea Tecator y en el espectrofotómetro Beckman DU650, del Laboratorio de Análisis Químicos del Programa de Maricultura, Depto. de Ecología, Unidad “B” de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L.

3.5 Pruebas de lixiviación

Se colocaron dos, cinco ó diez g de cada una de las dietas en canastas de malla metálica de ocho x ocho x diez cm llevadas a peso constante durante una hora dentro de un tanque con circulación de agua marina sintética; la pérdida de materia seca se obtuvo por medio de la siguiente fórmula (Aquacop, 1978):

$$\% \text{ Pérdida de materia seca} = \frac{(P1 - Pc) \times ms - (P2 - Pc)}{(P1 - Pc) \times ms} \times 100$$

P1 = peso de la canasta más el alimento inicial húmedo

Pc = peso de la canasta seca

ms = por ciento en peso, de la materia seca en la muestra al inicio de la prueba

P2 = peso de la canasta más el alimento lixiviado seco

3.6 Material biológico

Para el bioensayo de crecimiento (1) se obtuvieron juveniles de 550mg de peso promedio de camarón blanco *L. vannamei* del laboratorio de producción de postlarvas GENESIS, S.A de C.V. Puerto Peñasco, Sonora. Para los bioensayos de pigmentación (2) y el de digestibilidad (3) se utilizaron de los mismos camarones alimentados con una dieta comercial en los tanques de aclimatación, con un peso de 2.17g a 2.88g y de 3.07g a 4.85g respectivamente y para el de actividad inmunoestimulante (4) con un rango de 0.25g a 0.64g de una granja de La Paz, México, certificados y libres de agentes infecciosos Ejem.® virus.

3.7 Condiciones experimentales, manejo de larvas

Las larvas se aclimataron durante una semana con una dieta base comercial en uno de los tres estanques de pre-engorda con dimensiones de 140x150x40cm., con una capacidad de 500lts, después se repartieron aleatoriamente en algunos de los 48 acuarios de fibra de vidrio de 60x30x35cm, con una capacidad de 60lts cada uno, colocando diez camarones en cada uno (densidad equivalente a 62.5 organismos por metro cuadrado), se procuró que las medias del peso de los camarones de cada acuario fueran homogéneas; posteriormente los pesos fueron analizados estadísticamente para observar si no existían diferencias en las medias de cada uno de los acuarios antes de iniciar los bioensayos durante una segunda semana con las dietas experimentales; cada tratamiento se corrió con 4 replicados. Los experimentos tuvieron una duración de 28 a 56 días, alimentando los camarones al 8% de su biomasa una vez al día.

Durante los bioensayos se monitoreó: la temperatura del agua con un termómetro Weksler^{MR} con un rango de 20 a 25°C; la salinidad se midió con un salinómetro YSI^{MR} modelo 33 con un rango de 0 a 100 ‰; y cada quince días se midió la concentración de nitritos, nitratos, amonio y pH con Kits rápidos de Aquarium System^{MR}. El fotoperiodo se mantuvo de 12 h de luz y 12 h de obscuridad.

3.8 Bioensayo de crecimiento para evaluar la biomasa como fuente proteica

Se elaboraron dos dietas (un kilo de cada una); la control y la experimental; en esta última se incluyeron 100 g de la biomasa pigmentada en sustitución por la harina de pescado y harina de trigo; se quitó el 1.3% de la harina de pescado y 8.7% de la harina de trigo y se mantuvieron constantes las cantidades de los otros ingredientes, mismos que están expresados en % en la siguiente tabla.

Fórmula de las dietas experimentales expresadas en gramos por ciento (%)

Ingredientes básicos	D-CONTROL10	D-HPPR110
Harina de pescado	13.00	11.70
HPPR1	0.00	10.0
Pasta de Soya	13.0	13.0
Harina de camarón	4.0	4.0
Harina de Trigo	52.833	44.133
Gluten de trigo	8.0	8.0
Mezcla vitamínica*	0.225	0.225
Metionina	0.108	0.108
Aceite de pescado	7.518	7.518
Fosfato monosódico	1.269	1.269
Vitamina C	0.025	.025
Vitamina E	0.010	0.010
Antioxidante ETQ	0.013	0.013

*Mezcla vitamínica en la dieta mg/Kg: Vitamina K₃: 20; tiamina: 150; riboflavina: 100; cianocobalamina B₁₂: 0.1; ácido fólico: 20; piridoxina: 50; pantoténico: 100; niacina: 300; colina: 400; biotina: 1; inositol: 300; Vitamina A: 15,000 UI/Kg y Vitamina D3: 7,500 UI/Kg. (Akiyama, *et al.*, 1991).

Los camarones se alimentaron una vez al día, cubriendo el 8% de la biomasa total en cada tanque. Se pesaron al inicio, a los 14 y 28 días, y todos los días por apreciación se registraron los consumos de alimento y número de muertos. Al final se calcularon las tasas de:

Conversión Alimenticia (TCA), Crecimiento (TC), Crecimiento Relativo (TCR) y Supervivencia (TS) con las siguientes fórmulas:

$$\text{Tasa de conversión alimenticia (TCA)} = \frac{\text{Alimento consumido}}{\text{Peso ganado}}$$

$$\text{Tasa de crecimiento} = \frac{\text{peso final} - \text{peso inicial}}{\text{peso inicial}} * 100$$

$$\text{Tasa de crecimiento relativo} = \frac{\text{peso crecimiento experimental}}{\text{tasa de crecimiento control}} * 100$$

$$\text{Tasa de supervivencia (TS)} = \frac{\text{Numero final de organismos}}{\text{Numero inicial de organismos}} * 100$$

Para el consumo de alimento se tomaron en cuenta los valores promedios estimados de los individuos vivos en el acuario al momento de la biometría. El consumo individual se calculó en base al consumo de alimento estimado en por ciento cada día para el acuario y número de camarones vivos ese día, la fórmula utilizada fue la siguiente:

$$\text{Tasa de consumo (g)} = \Sigma \frac{\text{ración en el acuario} \times \% \text{ consumido del día}}{\text{número de camarones en el acuario ese día}}$$

3.9 Bioensayo para la determinación de pigmentación

Se elaboraron tres dietas: una control y dos experimentales; de las dietas experimentales se quitaron siete g de la harina de trigo y tres g de la harina de pescado; en una se agregó biomasa pigmentada HPPR1 y en la otra el basidiomiceto comercial *Phaffia* Merck®; el resto de los ingredientes fueron tomados en base a la fórmula de la dieta control del bioensayo de crecimiento.

Fórmula de las dietas experimentales expresadas en gramos por ciento (%).

Ingredientes básicos	D-CONTROL	D- EXPERIMENTAL
Harina de pescado	13.00	10.00
HPPR1 o <i>Phaffia</i>	0.00	10.0
Pasta de Soya	13.0	13.0
Harina de camarón	4.0	4.0
Harina de Trigo	52.833	45.833
Gluten de trigo	8.0	8.0
Mezcla vitamínica*	0.225	0.225
Metionina	0.108	0.108
Aceite de pescado	7.518	7.518
Fosfato monosódico	1.269	1.269
Vitamina C	0.025	0.025
Vitamina E	0.010	0.010
Antioxidante ETQ	0.013	0.013

*Mezcla vitamínica en la dieta mg/Kg: Vitamina K₃ 20; tiamina: 150; riboflavina: 100; cianocobalamina B₁₂ 0.1; ácido fólico: 20; piridoxina: 50; pantoténico: 100; niacina: 300; colina: 400; biotina: 1; inositol: 300; Vitamina A: 15,000 UI/Kg y Vitamina D3: 7,500 UI/Kg. (Akiyama *et al* 1991).

Se tomaron como un segundo control positivo los camarones de la sala alimentados con una dieta comercial suplementada con *artemia* sp., que es rica en cataxantina

La evaluación biológica se realizó de la misma manera que en el bioensayo de crecimiento. Además al final del bioensayo se realizó la determinación de la relación hepatosómica, para conocer la capacidad de almacenamiento del pigmento, ésta se estimó según el procedimiento siguiente: se disectó el hepatopáncreas de cada camarón, el cual fue pesado (P1) en una balanza AND^{MR} modelo ER182A con una sensibilidad de 0.00001g. Posteriormente se colocó el resto del cuerpo y se registró éste como (P2). Con la fórmula siguiente se determinó:

$$\text{Relación hepatosómica} = \frac{\text{Peso hepatopáncreas (P1)}}{\text{Peso del cuerpo (P2)}} \times 100$$

Para la cuantificación de pigmentos los animales de cada dieta, se dividieron en dos grupos; un grupo de camarones frescos y otro para camarones cocidos en agua hirviendo durante tres minutos. Se eliminó el exceso de agua con hojas de papel y se pesaron individualmente, cada grupo se seccionaron y juntaron en tres partes: cefalotórax (cabeza y hepatopáncreas), caparazón (exoesqueleto) y músculo; cada fracción se homogenizó y se extrajeron con

acetona los pigmentos; los cuales se mezclaron con una porción igual de solución de NaCl al 5% en agua destilada y se lavaron con pequeñas porciones de hexano. Los extractos de hexano se cuantificaron en el espectrofotómetro de absorción a 470nm, (Ya Tu, *et al.*, 1991).

Se realizó una curva de calibración, con una solución estándar de *Carophyll pink*, procesándose por igual para obtener el porcentaje de recuperación o pérdida. Se obtuvo el límite de detección y el coeficiente de variación con las precauciones necesarias (Ver pág. 30).

Una parte de los camarones cocidos de cada una de las dietas, se secaron entre toallas de papel, congelaron y almacenaron con nitrógeno a -20°C hasta su lectura en el espectrofotómetro de reflectancia de la empresa PYOSA, donde se midió su luminosidad, rojicidad y tonalidad; para efectuar las lecturas, los camarones se colocaron y pegaron curvados en el centro de un cartoncillo y como referencia se tomó un grupo control con una dieta sin carotenos.

3.10 Bioensayo para determinar el coeficiente de utilización digestiva aparente de la proteína

Para la digestibilidad *in vivo* se prepararon tres dietas con la formulación de los bioensayos de crecimiento y pigmentación; misma que se usó como dieta control y en una proporción 70:30 se adicionaron la biomasa pigmentada HPPR2 obtenida del tratamiento tres de la segunda plantilla y la otra con la *Phaffia* comercial Merck®, las cuales se etiquetaron como: CONTROL-30, HPPR2-30, y PHAFFIA-30 respectivamente.

Los camarones se alimentaron dos veces al día, y se recolectaron las heces una hora después por sifoneo durante 10 días, hasta obtener 100 mg de heces en peso seco. Posteriormente se determinó la proteína total por el método micro Kjeldhal y el Cr_2O_3 se cuantificó por el método espectrofotométrico a través de la siguiente curva de calibración ($R^2= 0.99958292$).

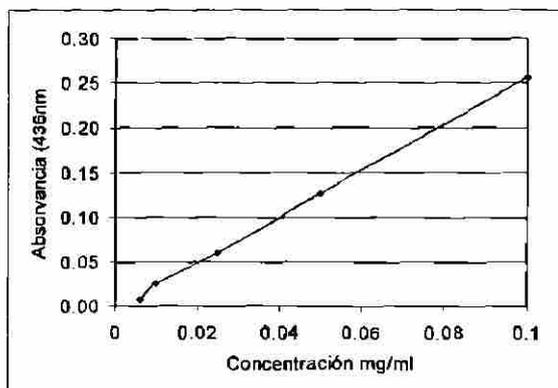


Figura 8.- Curva de calibración de dióxido de cromo.

Se utilizó la dieta de *Phaffia* Merck como una referencia y el control y se midió la digestibilidad de la proteína aparente *in vivo* con las siguiente fórmula:

$$\% \text{ Dig} = 100 - \left(\frac{\% \text{ proteína en heces}}{\% \text{ proteína en dieta}} \times \frac{\% \text{ Cr}_2\text{O}_3 \text{ en dieta}}{\% \text{ Cr}_2\text{O}_3 \text{ en heces}} \times 100 \right)$$

$$\% \text{ Dig. del ingrediente} = \frac{\text{Dig. D.E.} \times \% \text{ nut. D.E.} - 0.7 \times \text{Dig D.R.} \times \% \text{ nut. D.R.}}{0.3 \times \% \text{ nut. en la harina de pescado}}$$

D.E. = dieta experimental con las proteínas (HPPR1 y *Phaffia*) a probar

D.R. = dieta de referencia que no contenga la proteína.

3.11 Bioensayo para determinar la actividad inmunoestimulante

Se elaboró una dieta con los ingredientes básicos, la cual se peletizó, secó y separó en 5 porciones. La dieta control se hizo con el aceite de pescado Menhaden al 2.7%; además se hicieron suspensiones con el aceite de pescado en igual proporción con cada una de las biomásas: de HPPR1, de *Phaffia* y de *S. cerevisiae* al 1% y de glucano al 0.1%; éstas se aplicaron externamente por aspersión (espreado) a la dieta base y se etiquetaron como: AE-CONTROL-1, AE-HPPR1-1, AE-PHAFFIA-1, AE-S.C.-1, y AE-GLUCANO-1 respectivamente.

Ingredientes Básicos en porciento

Harina de pescado	17.00
Harina Krill antártico	3.0
Pasta de Soya	7.57
Harina de Trigo	56.18
Gluten de trigo	8.00
L-Metionina	0.02
Fosfato monosódico	1.79
Vitamina C	0.025
Colina	0.031
Inositol	0.076
Mezcla vitamínica*	0.225
Colesterol	0.172
Lecitina de soya	3.29
Antioxidante ETQ	0.0201
Aceite de pescado "Menhaden"	2.7013

* Mezcla vitamínica en la dieta expresada en mg/Kg: Vitamina K₃, 20; tiamina: 150; riboflavina: 100; cianocobalamina B₁₂, 0.1; ácido fólico: 20; piridoxina: 50; pantoténico: 100; niacina: 300; colina: 400; biotina: 1; inositol: 300; Vitamina A: 15,000 UI/Kg y Vitamina D3: 7,500 UI/Kg. (Akiyama, *et al.*, 1989).

Pruebas de viabilidad, a las dietas AE 1% se realizaron pruebas de viabilidad antes y después de la lixiviación en agua marina durante 1 hora (Aquacop, 1978). Se cuantificaron por conteo, en placas de PDA para microorganismos totales, en TCBS para vibrios y en Agar-Rosa de Bengala selectivo para levaduras, todos ellos marca DIFCO (Brock, *et al.*, 1987).

*Tasas de crecimiento, conversión alimenticia y sobrevivencia los camarones se manejaron de la misma forma que en el primer bioensayo, pero en esta ocasión se prolongó el bioensayo de 28 a 42 días.

Efecto anti-estrés, Transcurridos 42 días del bioensayo se tomaron camarones aleatoriamente, en los cuales se midió la actividad estimulante por conteo de colonias de vibrios en placas de TCBS de las diluciones con agua estéril (10^1 - 10^5) de la hemolinfa obtenida de camarones expuestos a un estrés por inmersión a la cepa BP05 de *V. harveyi* durante 24 h., en tres diluciones diferentes a partir de una solución madre (UFC 2.84×10^7 /ml).

El bioensayo se realizó en el exterior de la sala de zootecnia para evitar la contaminación del sistema de recirculación de agua marina sintética. Se colocaron diez camarones en acuarios de 20x20x15cm con capacidad de diez lto realizándose por tres replicados para cada uno; 1) control, 2) levadura, 3) *Phaffia*, 4) HPPR1 y 5) control-control no expuesto a bacterias.

Para determinar el desafío bacteriano en la hemolinfa, se tomaron 10 μ l de hemolinfa vía seno ventral de la base del pleópodo del primer segmento abdominal de 2 camarones de cada uno de los tratamientos con micropipetas estériles, a las 3, 6, 9, 15 y 27 h posteriores a la inoculación del *V. harveyi*, y se rociaron en placas de agar TCBS y se distribuyeron uniformemente con una varilla de vidrio estéril; las unidades formadoras de colonia (UFC) se contaron después de incubarse por 24 h a temperatura ambiente (28°C aproximadamente).

Todas las muertes que ocurrieron durante el experimento fueron registradas.

Respuesta inmunológica, el 24 de septiembre de 1996, los camarones sobrevivientes del experimento de crecimiento fueron transferidos vía aérea dentro de bolsas de plástico; la mitad llena con agua marina y el resto con oxígeno; las bolsas fueron selladas y almacenadas en cajas de hielo seco al CIAD en Hermosillo, México; a la mitad de los camarones se les realizó el análisis de actividad enzimática de la profenoloxidas de acuerdo a Vargas-Albores (1996).

Se obtuvieron 20 μ l de la hemolinfa insertando puntillas estériles y se colocaron con 50 μ l de anticoagulante (450nM NaCl, 10mM KCl, 10nM EDTA disódico, 10mM HEPES, pH 7.3, 850mOsm/Kg) en tubos Eppendorf de 1.5ml. Se centrifugaron a 300 G por 10 min., el sedimento se lavó dos veces con 0.01M de buffer de cacodilato (CAC) y se resuspendió en frío con una dilución de 1:10, con buffer de CAC 0.01M, 0.45mM de NaCl, 10mM de CaCl₂, 26 mM de MgCl₂, con pH de 7; la suspensión se homogenizó con un sonicador y se centrifugó a 43,000 G por 20 min a una temperatura de 4°C y se conservó a -20°C.

La actividad de proPO se midió en un espectrofotómetro a 490nm usando L-dopa (Sigma) como sustrato; 200 μ l se mantuvieron a 37°C por 15min., se le añadieron 400 μ l de L-dopa (1.6 mg/ml en buffer CAC), y se mezclaron por 1min.; posteriormente se añadieron 400 μ l de buffer; se leyeron y determinaron las proteínas totales por el método de Bradford, utilizando el suero de albúmina bovina. El blanco fue preparado añadiendo los reactivos al buffer (PBS).

Los resultados fueron expresados en unidades y calculados como Δ Abs/min/mg de proteína. Una unidad equivale a un cambio en absorbancia de 0.001/min/mg de proteína.

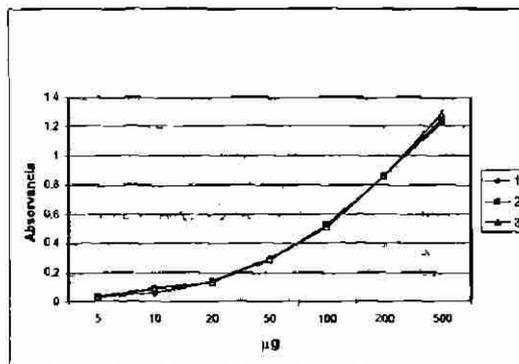
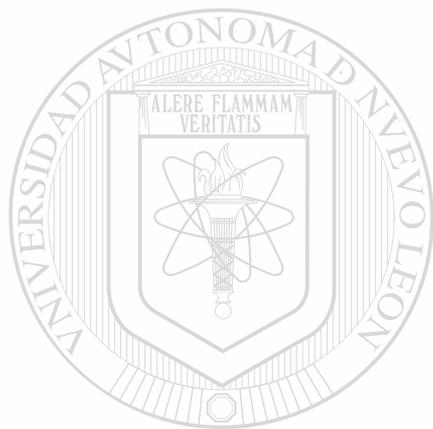


Figura 9.- Curva de calibración de proteína BSA (bovine serum albumin).

3.12 Análisis estadístico

Para cada uno de los bioensayos se determinaron las diferencias significativas entre los datos obtenidos para cada bloque a través de pruebas de homogeneidad de varianza de Bartlett, se efectuó un análisis de varianza ANOVA y pruebas de comparación múltiple de medias utilizando los métodos de Duncan y Tukey.

Se utilizó el programa de software SSPS/PC versión 8.0 (1997).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

IV. RESULTADOS

Los resultados se presentan en 2 apartados, correspondientes a las 2 etapas de la presente investigación, el primero con los datos de la producción de biomasa pigmentada HPPR1 y HPPR2 a partir de un cultivo continuo y su caracterización química. El segundo con la evaluación nutricional de la biomasa pigmentada en el camarón blanco *L. vannamei*.

ETAPA I - Producción de biomasa pigmentada a partir de un cultivo mixto en un proceso continuo

4.1 Identificación de microorganismos

De la biomasa etiquetada como "A", se identificaron el HPPR1, como el basidiomiceto *Phaffia rhodozyma*, el hongo filamentoso *Penicillium* sp. y la bacteria *Pseudomonas* sp.

De la biomasa etiquetada como "B", las cepas aisladas en placas con medio de PDA se identificaron una como el basidiomiceto *Phaffia rhodozyma* por su pigmentación naranja y otra cepa que pigmentó de color rosa-naranja, la cual se identificó como *Saccharomyces exiguus* (fig. 10-a). Sin embargo, al microscopio histológico no se observaron los pigmentos por encontrarse difusos a nivel de la pared celular; a diferencia como son depositados en una vacuola o saco en la *Phaffia rhodozyma* Merck (fig. 10-b).

Las observaciones al microscopio histológico, estereoscópico y también electrónico, mostraron células ovaladas y algunas en gemación (fig. 10-c), formación de micelio (fig. 10-d), y cortes transversales de células ovaladas y circulares respectivamente; estas últimas corresponden a las hifas con paredes celulares adelgazadas y ausencia de septas (fig. 11). La presencia de ambas levaduras se confirmaron en tirillas de API al comparar las cepas de la biomasa B con cepas puras de la Colección del Laboratorio de Microbiología FCB-UANL (fig. 12). También al ser resembradas en el medio de Gorodowas con la formación de ascosporas dentro de células en forma de raqueta para el género *Saccharomyces* (fig. 13-a) y su ausencia en las células circulares de *Phaffia* (fig. 13-b).

En la biomasa HPPR2 de color rosa no se observó la presencia de la *S. exiguus*.



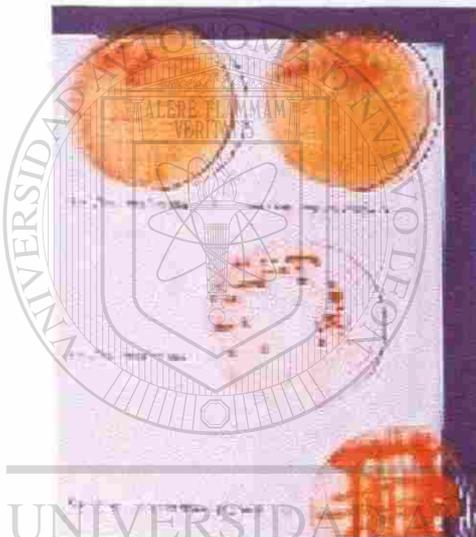
b).- Depósitos de pigmentos en *phaffia rhodozyma*.



c).- Células en gemación del cultivo mixto.



d).- Formación de micelio del cultivo mixto.



a).- Cepas aisladas en placas PDA.

Figura 10 .- Aislamiento de microorganismos (a) y observaciones en el microscopio histológico (b,c,d).

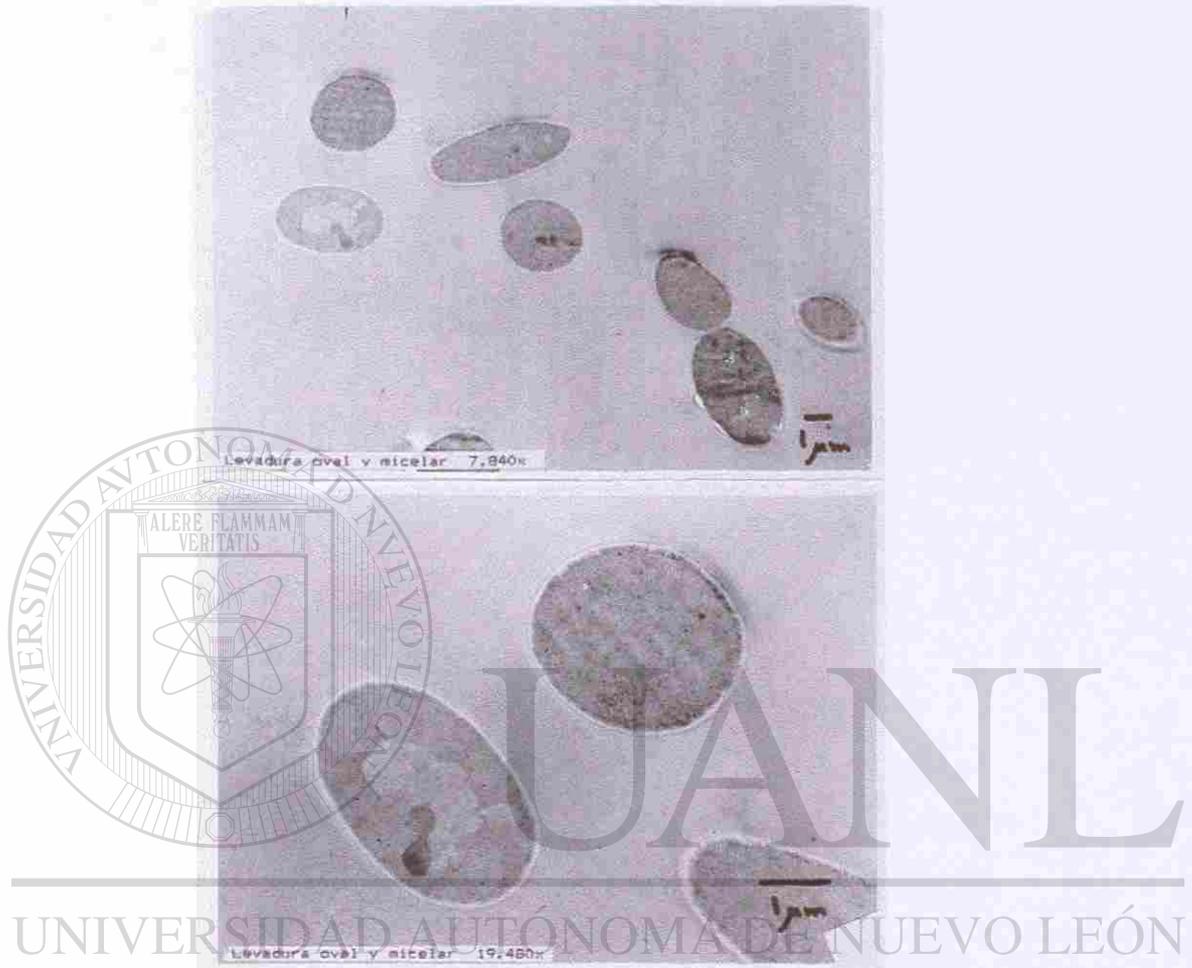
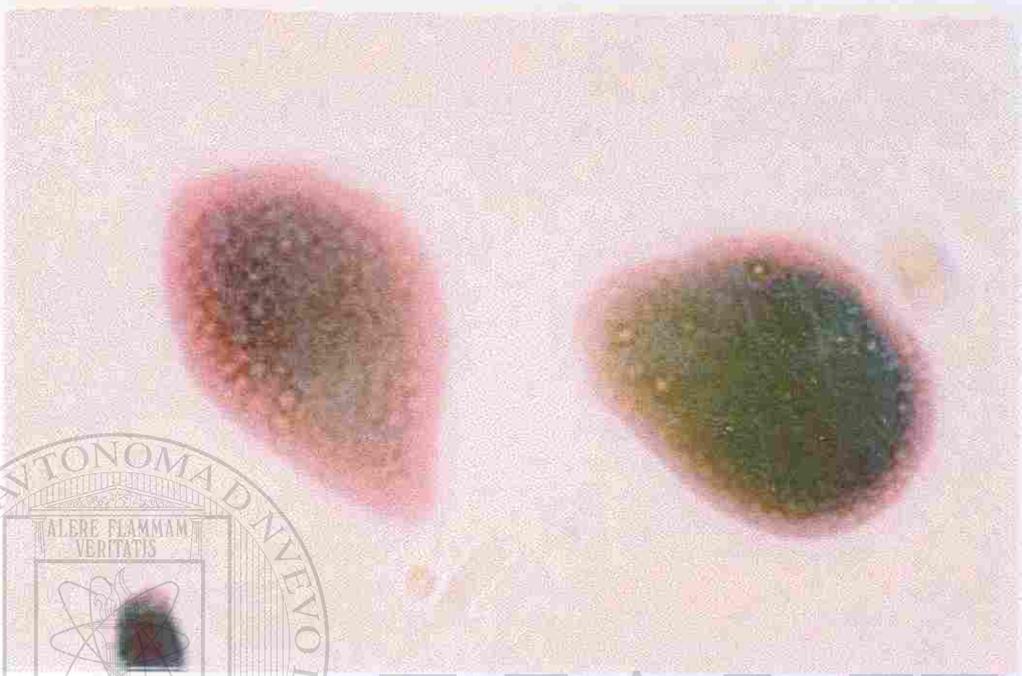


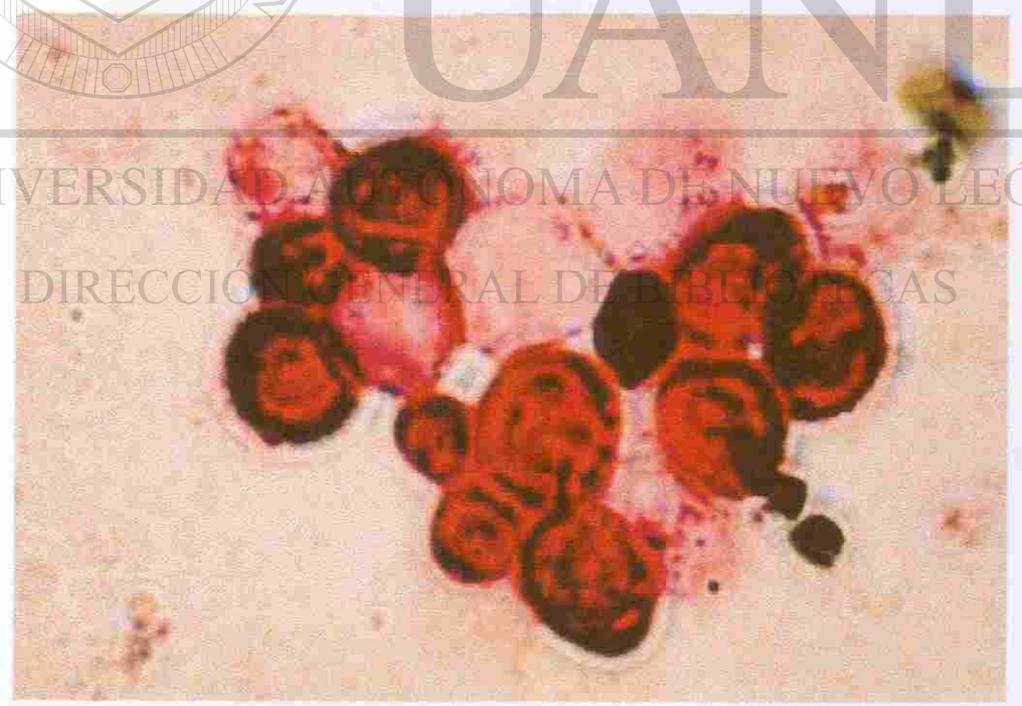
Figura 11.- Observaciones al microscopio electrónico, corte transversal de células ovaladas y circulares de las hifas.



Figura 12.- Pruebas confirmatorias, tirillas API



a).- Ascosporas del género *Saccharomyces*.



b).- Ausencia de ascosporas en el género *Phaffia*.

Figura 13 .- Producción de ascosporas en medio de Gorodowas.

4.2 Optimización de la producción de pigmento

4.2.1 Cinética de crecimiento

Los tratamientos de las dos plantillas de Plackett-Burman, se procesaron en el siguiente orden: 7, 1, 3, 2, 6, 8, 5, 4 y 10, 13, 11, 9, 16, 15, 12, 14. Se registraron cada dos horas su DO durante 120 h, las concentraciones de oxígeno registradas para los primera plantilla fueron entre 40 y 80 % y para la segunda entre 60 y 80%. A continuación se muestran las curvas de crecimiento de las dos plantillas (figs 14 y 15).

En la primera el cultivo continuo se inició a las 15 h de edad del medio de cultivo, las células observadas al Microscopio inicialmente eran ovaladas y a las 30 h se presentaron la formación de escasas pseudohifas con una pigmentación difusa a lo largo de la pared celular (fig.16 y 17). La pigmentación de color rojo más intensa se presentó en la biomasa del tratamiento tres después de las 100 h, pero solo en la biomasa adherida a las paredes de la parte superior del reactor, para los otros tratamientos la biomasa fue de color crema.

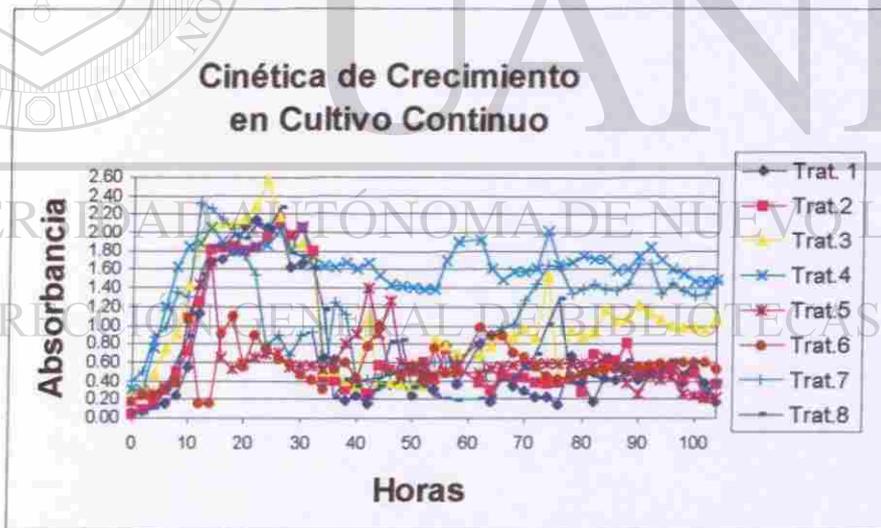


Figura 14.- Cinéticas de crecimiento, tratamientos del 1 al 8.

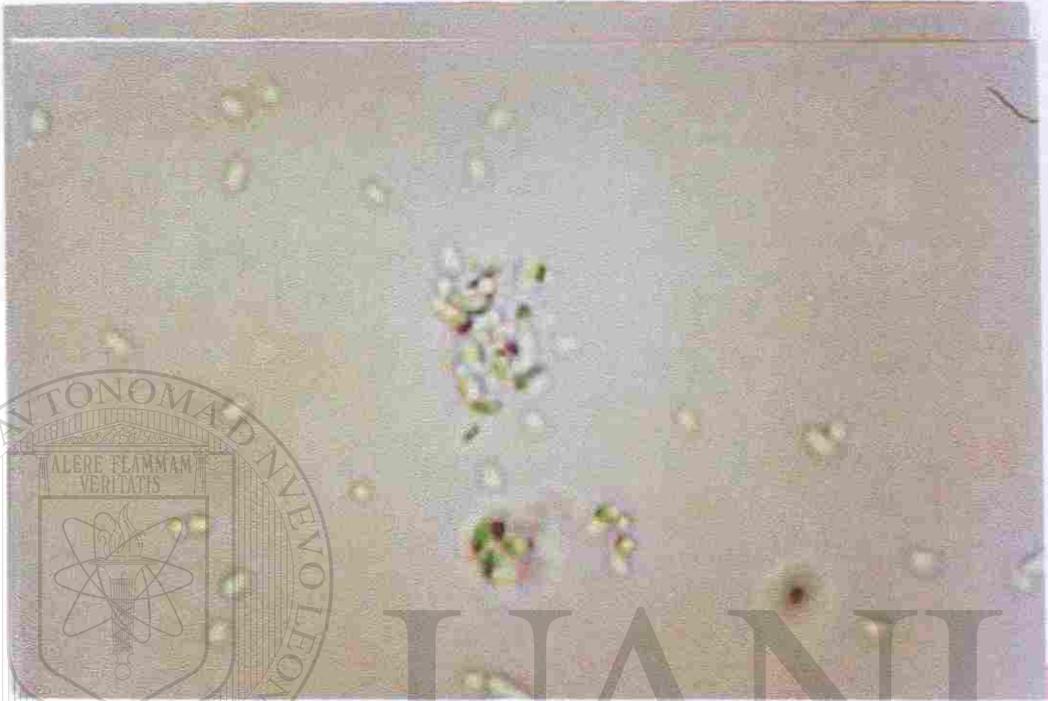


Figura 16 .- Observaciones al inicio del cultivo continuo. microscopio histológico.

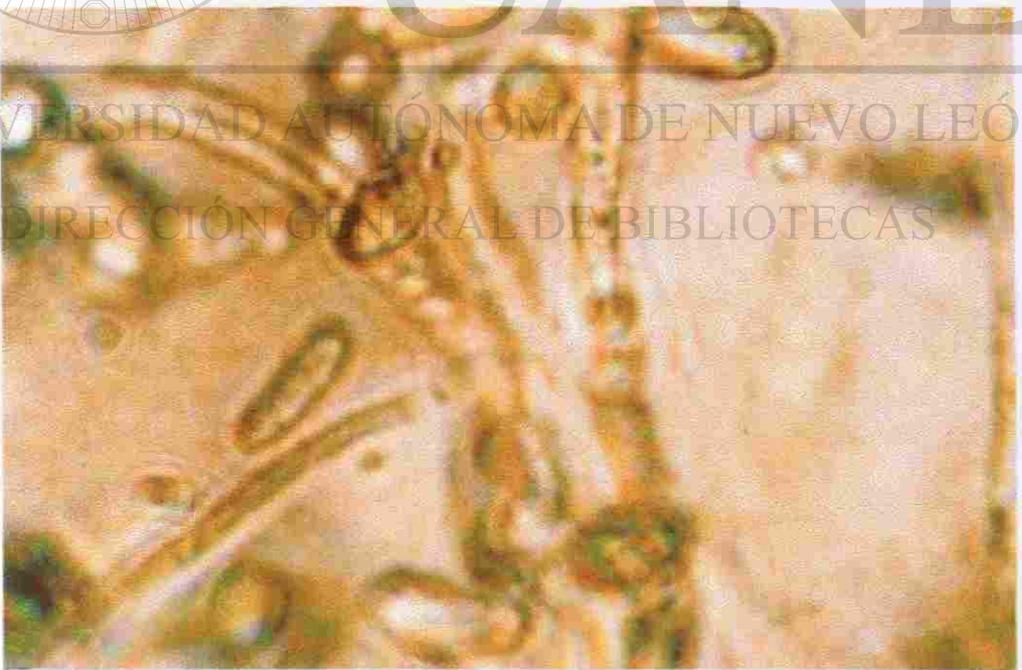


Figura 17 .- Observaciones de hifas, microscopio esteroscópico.

En la segunda plantilla, a las 50 h de iniciarse el cultivo continuo, se observó la presencia de pseudohifas abundantes en todos los tratamientos; mismas que presentaban una pigmentación difusa a lo largo de su pared celular después de las 70 h de iniciado el proceso y las cuales fueron de colores cremas inicialmente, y algunos cambiaron a rosas, naranjas, y hasta moradas (fig 18).

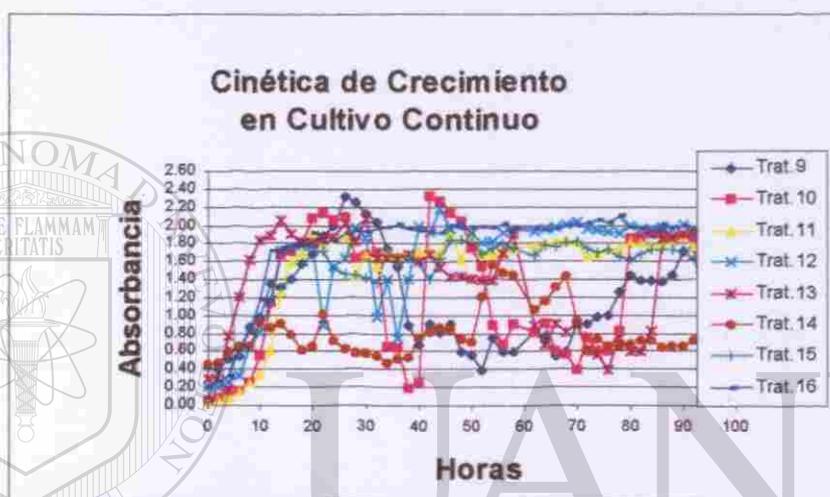


Figura 15.- Cinéticas de crecimiento, tratamientos del 9 al 16.

4.2.2 Evaluación de pigmentación y biomasa

En la siguiente tabla se resumen los datos de color por apreciación visual, y se tomaron muestras para cuantificarlos por espectrofotometría de reflectancia (fig. 19), se registraron los colores que se presentaron en cada uno de los tratamientos en el reactor al final de cada tratamiento. Por otra parte, también se tomaron muestras cada 2 h para cuantificar la biomasa por el método gravimétrico y se obtuvo un promedio entre las 20 a las 100 h.

De los primeros ocho tratamientos, que correspondieron a la primera plantilla, solo el No.tres presentó pigmentación de color rojo en la biomasa, la cual estaba adherida a la parte superior del reactor; la biomasa de cada uno de los ocho tratamientos, se deshidrató

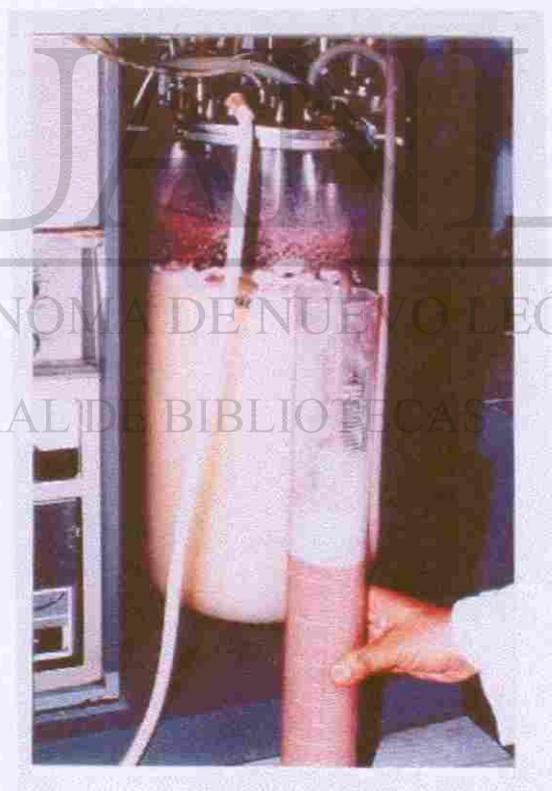
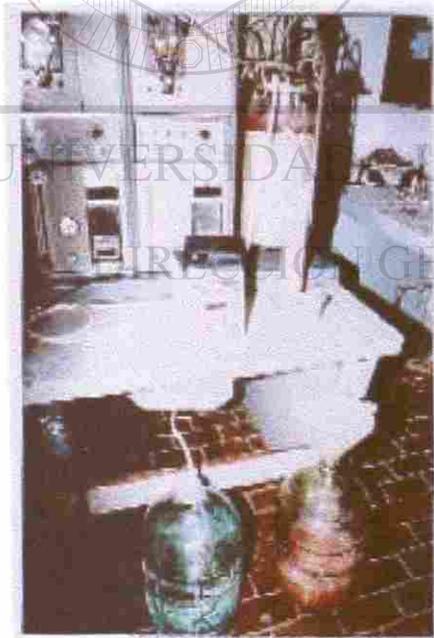
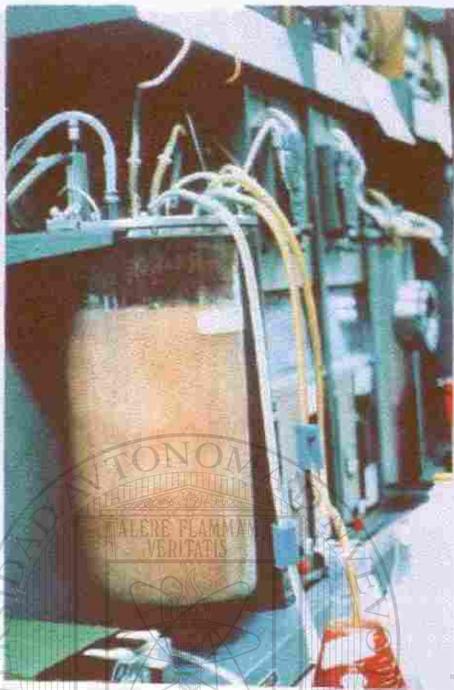


Figura 18.- Pigmentación obtenida en los tratamientos del 9 al 16.

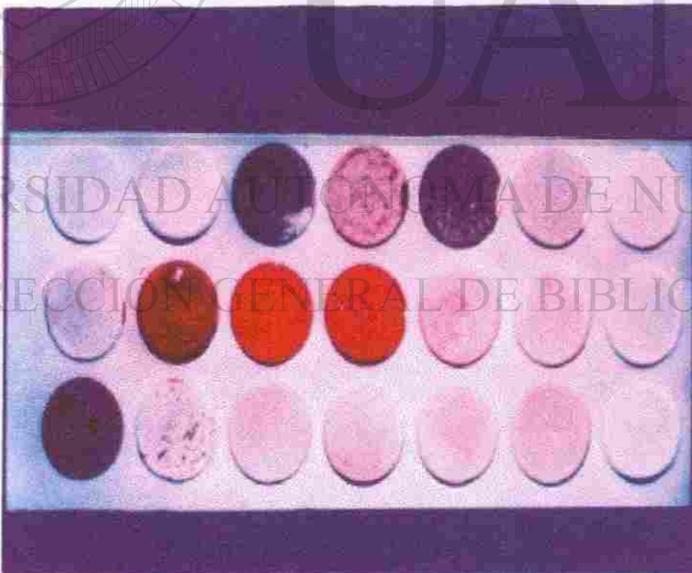
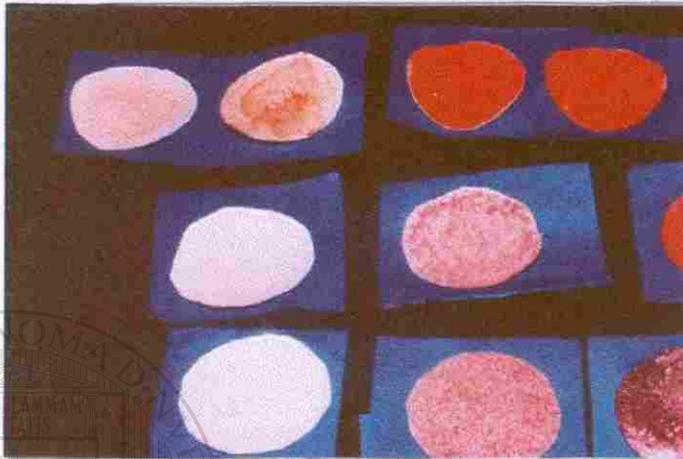


Figura 19.- Pigmentación obtenida en los tratamientos del 9 al 16.

en un liofilizador de charolas, se resuspendió y filtró para su cuantificación de la intensidad de color, la cual dio una concentración de 2800ppm y solo el 10% fue astaxantina (se cuantificó por cromatografía de capa fina de alta resolución; conocido por sus siglas en inglés HPTLC).

La producción de biomasa a las 15 h fue de 6.551 a 7.835 g/l y con un consumo de etanol de 5.22 a 7.62 y un rango entre las 20 a las 100 h de 1.82 a 2.913 g/l y de 1 a 2 g/l respectivamente (fig. 20).

Producción de biomasa, consumo de etanol, color y concentración de pigmentos

Tratamiento	Biomasa g/l*	Etanol g/l*	Color observado	Biomasa g/l**	Carotenos ppm
1	6.551	5.32	crema - crema	2.032	100
2	7.03	5.7	crema - verde	2.178	100
3	6.958	5.32	crema - "rojo"	2.034	"2800"
4	7.013	7.62	crema - rosa	2.913	100
5	6.716	5.27	crema - verde	2.016	100
6	7.835	4.76	crema - verde	1.82	100
7	7.11	6.65	crema - amarillo	2.544	100
8	7.428	5.22	crema - crema	1.994	100

* a las 15 h gramos de etanol consumido

** promedio de 20 a las 100 h, consumo de etanol 0.2%

“ ” pigmentos adheridos a la pared del reactor en la parte superior

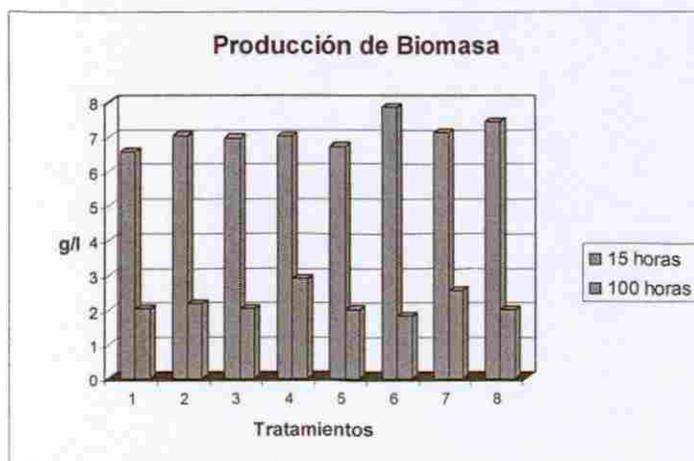


Figura 20.- Producción de Biomasa en los tratamientos del 1 al 8.

Para la segunda plantilla 9, 10, 11 y 13. El tratamiento número nueve, fue el único que presentó coloración rosa en todo el reactor; mientras que el 11 presentó un color naranja, para el 10 y 13, solo a nivel del micelio adherido en la parte superior del reactor; de color rosa y morado respectivamente. Así mismo, se observó que la concentración de biomasa (su peso en seco) es inversamente proporcional a la producción de pigmento. La producción de biomasa a las 22 h osciló de 2.031 a 4.987 g/l y con un consumo de etanol de 5.958 a 6.835 y entre las 20 a las 100 h una biomasa de 1.19 a 1.994 g/l y un consumo de etanol de 1 a 2 g/l (fig. 21).

Producción de biomasa, consumo de etanol, color y concentración de pigmentos

Tratamiento	Biomasa g/l*	Etanol g/l*	Color observado	Biomasa g/l**	Carotenos ppm
9	3.678	6.051	crema - rosa	1.19	2800
10	4.463	6.03	crema -"rosa"	1.38	"2800"
11	4.162	5.958	crema - naranja	1.09	1800
12	4.58	6.013	crema - crema	1.21	100
13	4.987	6.116	crema -"morado"	1.22	"8000"
14	2.031	6.835	crema - crema	1.23	100
15	3.795	6.13	crema - crema	1.26	100
16	4.633	6.275	crema - crema	1.994	100

* a las 22 h gramos de etanol consumido

** promedio de 20 a las 100 h, consumo de etanol 0.2%

“-” pigmentos adheridos a la pared del reactor en la parte superior

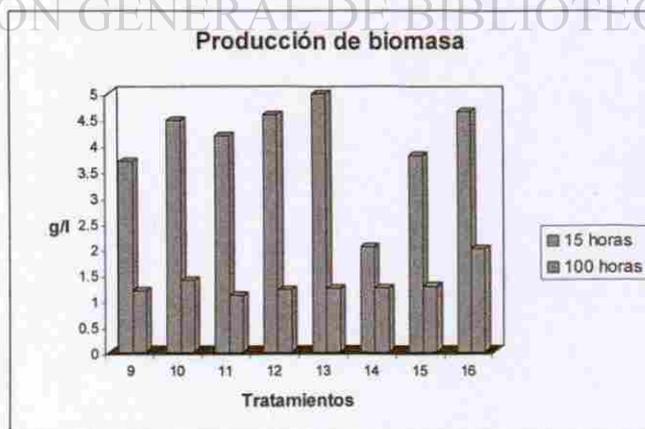


Figura 21.- Producción de Biomasa en los tratamientos del 9 al 16.

4.2.3 Evaluación de la cinética del cultivo continuo

Los valores de μ , fueron obtenidos de la fase de crecimiento exponencial. A las 15 o 16 h estos valores cambiaron a D , debido a la introducción de medio de cultivo fresco y su salida correspondiente.

En la tabla siguiente se muestran los rendimientos $Y_{X/S}$, $Y_{P/S}$ y $Y_{P/X}$ correspondientes a la primera plantilla, donde P representa los pigmentos totales, de los cuales solo un 10% corresponde a la xantófila llamada astaxantina. Además los valores de la velocidad de crecimiento y tiempos de duplicación (figs. 22 y 23).

Evaluación de la cinética del cultivo continuo

Tratamiento	$\mu(\text{hr}^{-1})$	td(hr)	$Y_{X/S}^*$	$Y_{P/S}^{**}$	$Y_{P/X}^{**}$
1	0.0859	8.00	1.016	0.05	0.0492
2	0.0962	7.20	1.089	0.05	0.0459
3	0.1431	5.24	1.017	0.14	0.1376
4	0.1671	4.15	1.456	0.05	0.0343
5	0.1088	6.36	1.008	0.05	0.0496
6	0.0920	7.53	0.910	0.05	0.0549
7	0.1765	4.32	1.272	0.05	0.0393
8	0.1079	6.42	0.997	0.05	0.0501

* 15 hr / ** 100 hr

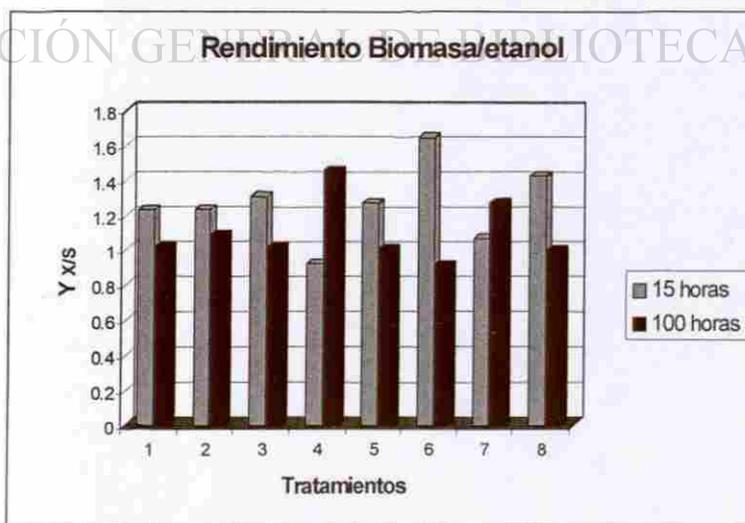


Figura 22.- Rendimiento de Biomasa-sustrato de los tratamientos del 1 al 8.

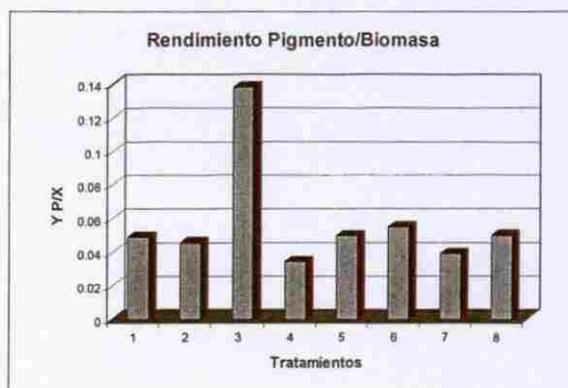


Figura 23.- Rendimiento del Pigmento-Biomasa de los tratamientos del 1 al 8.

Los tiempos de duplicación de los microorganismos oscilaron entre las 4.5 y las 8 h; la fuente de carbono inicial utilizada por los microorganismos, fueron los azúcares presentes en el medio de cultivo, ya que la concentración de etanol inicial registrada fue de 8g/l, permaneciendo sin cambios durante este mismo lapso; posteriormente (15 h) se registraron en promedio 2g/l.

En la tabla siguiente se muestran las velocidades de crecimiento, tiempos de duplicación y los rendimientos $Y_{X/S}$, $Y_{P/S}$ y $Y_{P/X}$ de los tratamientos del 9 al 16. El tratamiento número nueve con un rendimiento de 0.2352 se le denominó hongo productor de pigmento rosa número dos (HPPR2).

Evaluación de la cinética del cultivo continuo

Tratamiento	μ (hr ⁻¹)	td(hr)	$Y_{X/S}$ *	$Y_{P/S}$ **	$Y_{P/X}$ **
9	0.0978	7.00	0.595	0.14	0.2352
10	0.0899	8.00	0.690	0.14	0.2028
11	0.0698	10.00	0.545	0.09	0.1651
12	0.1012	7.00	0.605	0.05	0.0826
13	0.1520	4.56	0.610	0.40	0.6557
14	0.0696	10.00	0.615	0.05	0.0813
15	0.0978	7.00	0.630	0.05	0.0793
16	0.1191	6.00	0.997	0.05	0.0501

* 15 hr / **100 hr

En el tratamiento número nueve se analizaron los pigmentos por cromatografía líquida de alta resolución y se identificaron la zeaxantina, la *trans* luteína y el β -caroteno. La astaxantina no se detectó. Sin embargo, también se observaron otros carotenos no identificados (figs. 24 y 25).

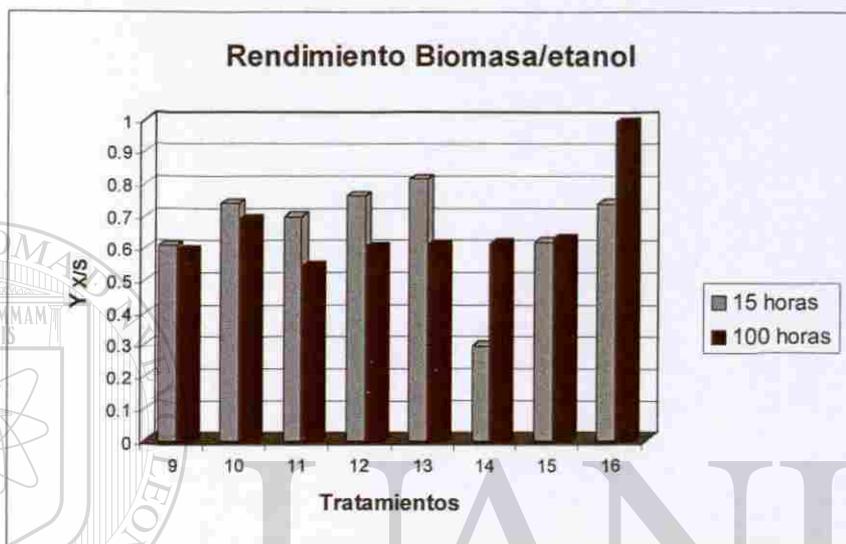


Figura 24.- Rendimiento de Biomasa-sustrato de los tratamientos del 9 al 16.

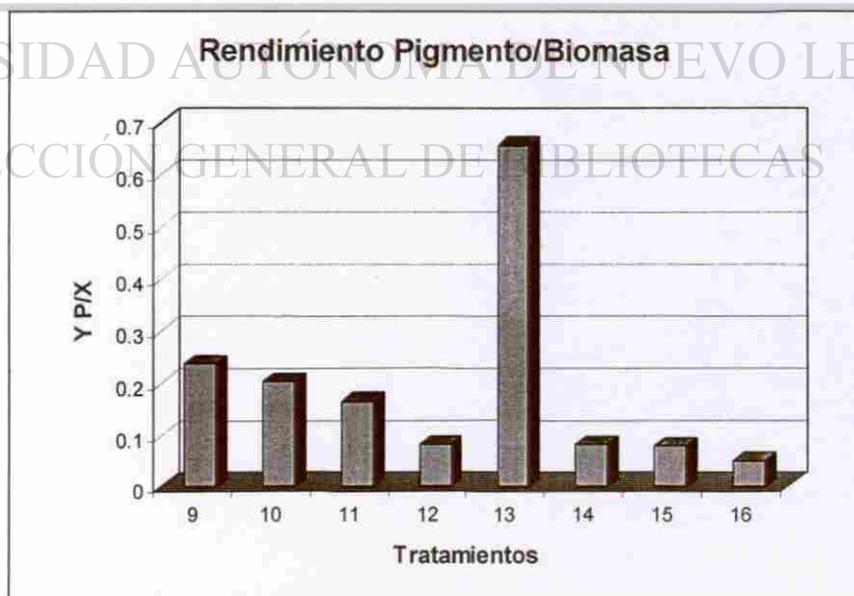


Figura 25.- Rendimiento de Pigmento-Biomasa de los tratamientos del 9 al 16.

A partir del tratamiento que pigmentó el número tres de la primera plantilla, se planteó la segunda plantilla. Los datos se obtuvieron de las diferencias promedio entre los “peores” y los “mejores”. Los resultados se analizaron por separado, la producción de biomasa y pigmento. También se combinaron las dos respuestas y al producto se le sacó raíz cuadrada. Posteriormente los datos fueron ordenados en una columna de menor a mayor, enseguida se tomo el primer valor como el “peor” promedio y se saca la diferencia del promedio de la suma de los 7 datos restantes (1:6); después se toma como promedio “peor” los tres primeros datos contra los cuatro últimos (3:5), (5:3), (7:1), (2:4), (4:4), (6:2), de estos resultados se obtuvieron los coeficientes de deseabilidad sacandole raíz a la n (n = número de respuestas) y se compararon con los rendimientos obtenidos de las sumas horizontales de la tabla de datos distribuidos según la plantilla de Plackett-Burman (Hendrix, 1980).

Para la segunda plantilla el tratamiento 13 fue el que presentó mayor pigmentación y el análisis de los datos por el paquete “Design easy analysis” indicaron las variables óptimas de trabajo que favorecerán la pigmentación son: la temperatura de 25°C, el de pH 4.5, un volumen de aire por lto de medio de cultivo (VVM), 2 propelas, una tasa de alimentación de 400 ml/h, la agitación de 400rpm y la presencia del líquido de remojo (LRM).

4.2.4 Coeficiente de transferencia y demanda biológica de oxígeno

De los tratamientos que presentaron pigmentación: nueve, diez, 11 y 13, se determinó por duplicado su Na y Kla .

Resultados de la Na y Kla

Tratamiento	Na mg/l.hr	Kla l.hr ⁻¹
9	1208	302
	1271	318
10	1023	256
	1101	275
11	1185	296
	1300	325
13	1023	256
	1141	285

4.2.5 Asociación simbiótica

A continuación se muestra la cinética de crecimiento de cada uno de los microorganismos del cultivo mixto. En la curva de levadura, están presentes dos: el ascomiceto *Saccharomyces exiguus* y el basidiomiceto *Phaffia rhodozyma*; el hongo corresponde al género *Penicillium* y la bacteria al género *Pseudomonas* (fig. 26).

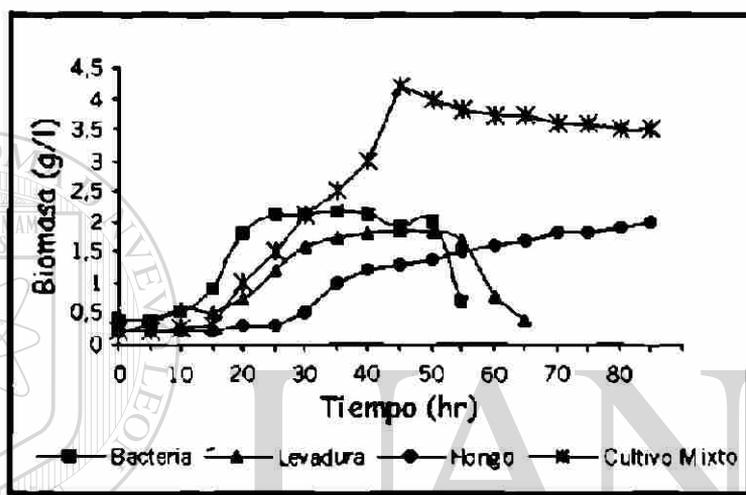


Figura 26.- Cinéticas individuales de cada uno de los microorganismos y del cultivo mixto.

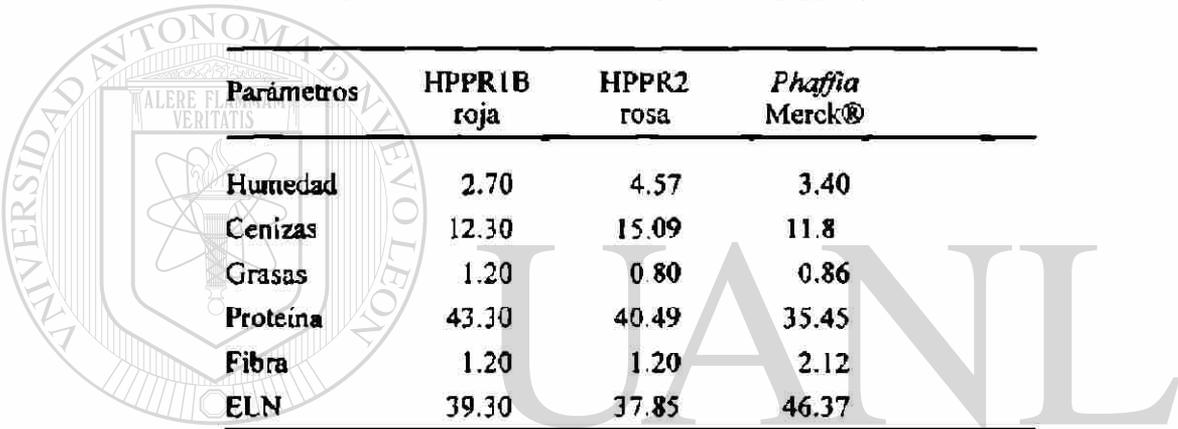
Los resultados de la figura anterior muestran que hay un efecto benéfico entre los individuos que componen el cultivo mixto. La velocidad específica de crecimiento para la *Pseudomonas* sp., es de 0.112 h⁻¹; para la *Penicillium* sp., 0.022 h⁻¹; para la *Phaffia* y la *S. exiguus* de 0.0758 h⁻¹.

A pesar de que las velocidades de crecimiento de cada microorganismo son muy diferentes, existe una asociación entre ellos que permite, cuando se encuentran en comunidad, aumentar su velocidad específica de crecimiento a 0.1194. Esto es muy importante, debido a que este cultivo mixto produce aproximadamente tres veces más pigmento que el que se obtendría con cada uno de los microorganismos por separado. Lo anterior nos permite visualizar que la asociación entre los miembros de este cultivo positiva y/o benéfica, y puede ser mutualista, en la cual todas las especies resultan beneficiadas con esa asociación, o comensalista, en la cual alguna o algunas de las especies se benefician y las otras simplemente no se ven afectadas.

4.3 Caracterización bioquímica de la biomasa pigmentada HPPR1 y HPPR2

4.3.1 Análisis proximal de la biomasa

Los resultados del análisis proximal de las biomásas de HPPR1B, HPPR2 y *Phaffia rhodozyma* producto comercial de la empresa Merck, se muestran en la siguiente tabla. Se obtuvo como dato importante que la *Phaffia* comercial muestra de un 25% a un 30% menos de proteína que las biomásas HPPR1B y HPPR2 (fig. 27).



Parámetros	HPPR1B roja	HPPR2 rosa	<i>Phaffia</i> Merck®
Humedad	2.70	4.57	3.40
Cenizas	12.30	15.09	11.8
Grasas	1.20	0.80	0.86
Proteína	43.30	40.49	35.45
Fibra	1.20	1.20	2.12
ELN	39.30	37.85	46.37

4.3.2 Caracterización de carotenos

Como se observaron en las placas cromatográficas (fig. 28), los carotenos de las levaduras experimentales HPPR1B, HPPR2, *S. exiguus* y la *Phaffia*, correspondieron a la astaxantina, zeaxantina, β -caroteno y otros no identificados, con los Rf de 95, 90, y 5 respectivamente. Se compararon con extractos de zanahoria, de flores de zempasuchil (80% de *trans* luteína, 4.5% de zeaxantina), LRM (zeaxantina), extracto de zanahoria (β -caroteno), de harina de camarón. Además los estándares de β -caroteno/zeaxantina, astaxantina de *Phaffia rhodozyma* Merck® y astaxantina sintética de La Roche®, llamado *Carophyll Pink*.

Además bajo la estimulación de la onda corta UV (236nm), se observaron tres manchas con alta intensidad fluorescentes color lila con Rf de 35, 70 y 85; y otras con menor intensidad en todas las muestras.

Identificación de carotenos por cromatografía en capa delgada

Carotenos	Rf*	Color
Astaxantina	95	rojo
Zeaxantina	90	amarillo
Desconocido	85	lila ₊
Desconocido	70	lila ₊₊
Desconocido	35	lila ₊₊
β-caroteno	5	rosa-naranja

* Factor de retardo o frente relativo

** Color por exposición a la luz ultravioleta (236nm).

La cuantificación de los carotenos totales por espectroscopía de absorción en el visible no se realizó en el laboratorio, primero no fue completa la extracción de los carotenos (87% de astaxantina) de la *Phaffia rhodozyma* Merck®. Además de los problemas para mantenerla estable, al sustituirla por la astaxantina sintética está fue parcialmente soluble en hexano y los carotenos de HPPR1 en hexano, al concentrarlos y recuperarlos en metanol se degradaban.

Las biomásas HPPR1 roja y HPPR2 rosa se analizaron por Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Los carotenos identificados fueron zeaxantina, *trans* luteína y otros carotenos no identificados, pero ninguno de estos correspondió a la astaxantina. Las muestras analizadas por cromatografía de capa fina de alta resolución (HPTLC) y cuantificadas por espectroscopía de reflectancia, reportan que de los carotenos totales un 2.8% correspondía a la astaxantina

4.3.3 Perfil de aminoácidos

En la siguiente tabla se presentan los datos obtenidos del cromatograma de aminoácidos, sus tiempos de retención, que le permite identificarlo y su porcentaje en peso.

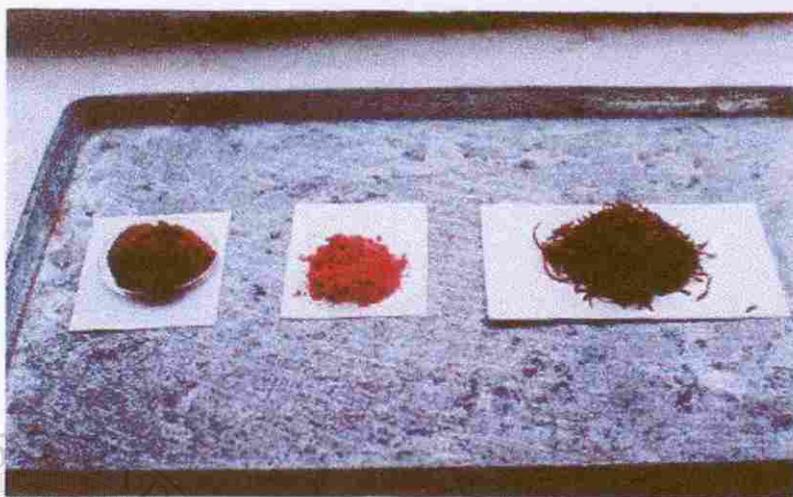


Figura 27.- De izquierda a derecha las Biomosas HPPR1B, HPPR2 y la dieta HPPR1 para los bioensayos.

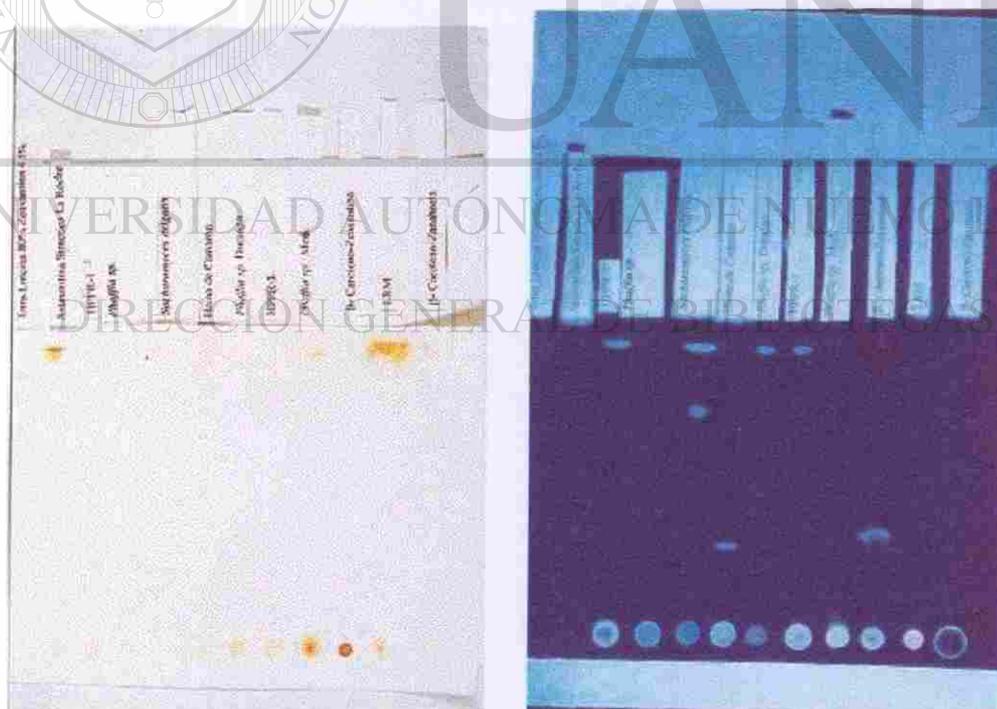


Figura 28.- Identificación de carotenos por cromatografía en capa delgada, observación directa y al UV.

Perfil de Aminoácidos

Número de Aminoácido	Tiempo de Retención	Nombre	Porcentaje en peso
1	7.79	Ácido aspártico	11.163
2	8.38	Treonina	5.780
3	11.08	Serina	6.237
4	13.01	Ácido Glutámico	12.732
5	14.04	Prolina	1.198
6	18.48	Glicina	10.245
7	19.95	Alanina	12.232
8	22.66	Cistina	0.612
9	25.39	Valina	6.083
10	26.82	Metionina	1.664
11	29.84	Isoleucina	4.581
12	30.65	Leucina	8.096
13	33.34	Tirosina	2.144
14	34.26	Fenilalanina	2.494
15	41.34	Histidina	1.702
16	44.34	Lisina	8.589
17	59.43	Arginina	3.298

* El Triptófano no se detectó, por lo tanto no fue cuantificado. El pico con tiempo de retención de 50, correspondió a un ion fosfato.

4.3.4 Digestibilidad de la proteína *in vitro*

Para la biomasa pigmentada se procesaron dos muestras (HPPR1 y HHPR2) y un control positivo la *Phaffia Merck*® en la siguiente tabla se muestran los resultados de digestibilidad, fibra y grasa en porcentaje en peso

% Digestibilidad <i>in vitro</i>	
HPPR1	51.56
HPPR2	97.35
<i>Phaffia</i> Merck®	82.21

ETAPA II - Evaluación Nutricional de la biomasa pigmentada HPPR1 en camarones blancos juveniles *Litopenaeus vannamei*

4.4 Bioensayo de crecimiento

4.4.1 Análisis proximal de ingredientes

Los resultados del análisis bromatológico de los ingredientes experimentales se muestran en la siguiente tabla. Los valores del porcentaje de grasa en la harinas de pescado y de camarón disminuyeron considerablemente como resultado de la delipidación y subsecuente despigmentación.

Análisis proximal de ingredientes en porcentaje (% en base húmeda)

Ingrediente	Proteína	Grasa	Fibra	Ceniza	ELN	Humedad
H. Pescado	71.93	9.30	0.58	14.60	1.56	1.99
H. Pescado1	74.58	0.41	0.22	14.73	1.33	8.70
Pasta Soya	46.12	0.89	2.23	6.86	39.52	4.37
H. Camarón	44.13	2.19	8.64	33.58	7.06	4.39
H. Camarón2	45.21	0.28	13.44	32.72	2.32	5.79
Gluten Trigo	75.36	0.91	0.12	1.56	11.42	5.46
H. Trigo	12.78	1.32	0.506	1.38	75.59	8.42

1. 2 Ingredientes delipidados y despigmentados

ELN = Extracto libre de nitrógeno

H. = Harina

4.4.2 Análisis proximal de las dietas

Los resultados del análisis proximal de las dietas experimentales se resumen en la siguiente tabla. Los porcentajes en base seca obtenidos para todos los parámetros fueron homogéneos, por lo que se consideran dietas isoproteicas, isolipídicas, isocalóricas y por igual la estabilidad de las dietas en el agua marina.

Análisis proximal de las Dietas experimentales del bioensayo de crecimiento (% en base húmeda)

Parámetros	D-HPPRI-10	D-Control-10
Humedad	8.2	9.5
Cenizas	5.6	5.0
Grasas	7.4	7.2
Proteína	31.4	31.4
Fibra	1.5	1.4
E.L.N	45.9	45.5
Kg calorías	434.33	430.79
p.m.s.	4.7	5.0

4.4.3 Evaluación biológica

4.4.3.1 Calidad de agua

Los parámetros físico-químicos del agua marina de la sala de zootecnia del programa de maricultura durante el transcurso del primer bioensayo fueron registrados durante 5 semanas (1 de aclimatización y 4 del bioensayo) dentro de los siguientes rangos: Temperatura de 25 a 29 C, salinidad de 35 a 36ppt., el pH de 8.3 a 8.6, amoníaco 0.1ppm, los nitritos de 0 a 0.15ppm y nitratos de 25 a 28ppm.

4.4.3.2 Parámetros biológicos

Los resultados promedio de las tasas de sobrevivencia, crecimiento, consumo, incremento y conversión alimenticia de las dos dietas experimentales. Después de los 14 y 28 días de experimentación se presentan en la siguiente tabla. Además los valores de la prueba "t" de Student para observar las diferencias.

Resultados promedio del bioensayo para evaluar crecimiento

Dietas Réplicas	Días	Control 5x10	HPPRI 4x10	Valor de t	Probabilidad
Tasa de Sobrevivencia	0-14	92	95	0.607	0.545
	DS	8.36	5.77		
DS	0-28	72	85	2.129	0.578
		10.95	5.77		
Tasa de Crecimiento	0-14	21.70	31.45	1.184	0.366
	DS	14.62	8.14		
DS	0-28	48.55	63.95	0.75	0.916
		24.22	22.62		
Tasa de Consumo	0-14	0.19	0.40	2.446	0.015*
	DS	0.09	0.17		
DS	0-28	0.47	0.71	1.601	0.343
		0.20	0.26		
Tasa de Incremento	0-14	0.12	0.180	1.315	0.348
	DS	0.08	0.05		
DS	0-28	0.27	0.370	1.134	0.84
		0.13	0.13		
Tasa de Conversión alimenticia	0-14	13.51	2.23	-0.810	0.05
	DS	27.44	0.81		
DS	0-28	2.04	2.08	0.045	0.839
		1.21	0.97		

* *Significativo a un nivel de significancia de 0.05.*

Los resultados demuestran que las tasas de sobrevivencia y crecimiento de 0-14 y 0-28 días de consumir la dieta experimental, no se observaron diferencias, a pesar que en los datos se muestra una tendencia de aumento. Por otra parte, se observan diferencias en un consumo mayor de la dieta experimental de los 0 a los 14 días ($P=0.015$), ver análisis estadístico en el anexo 2/1.

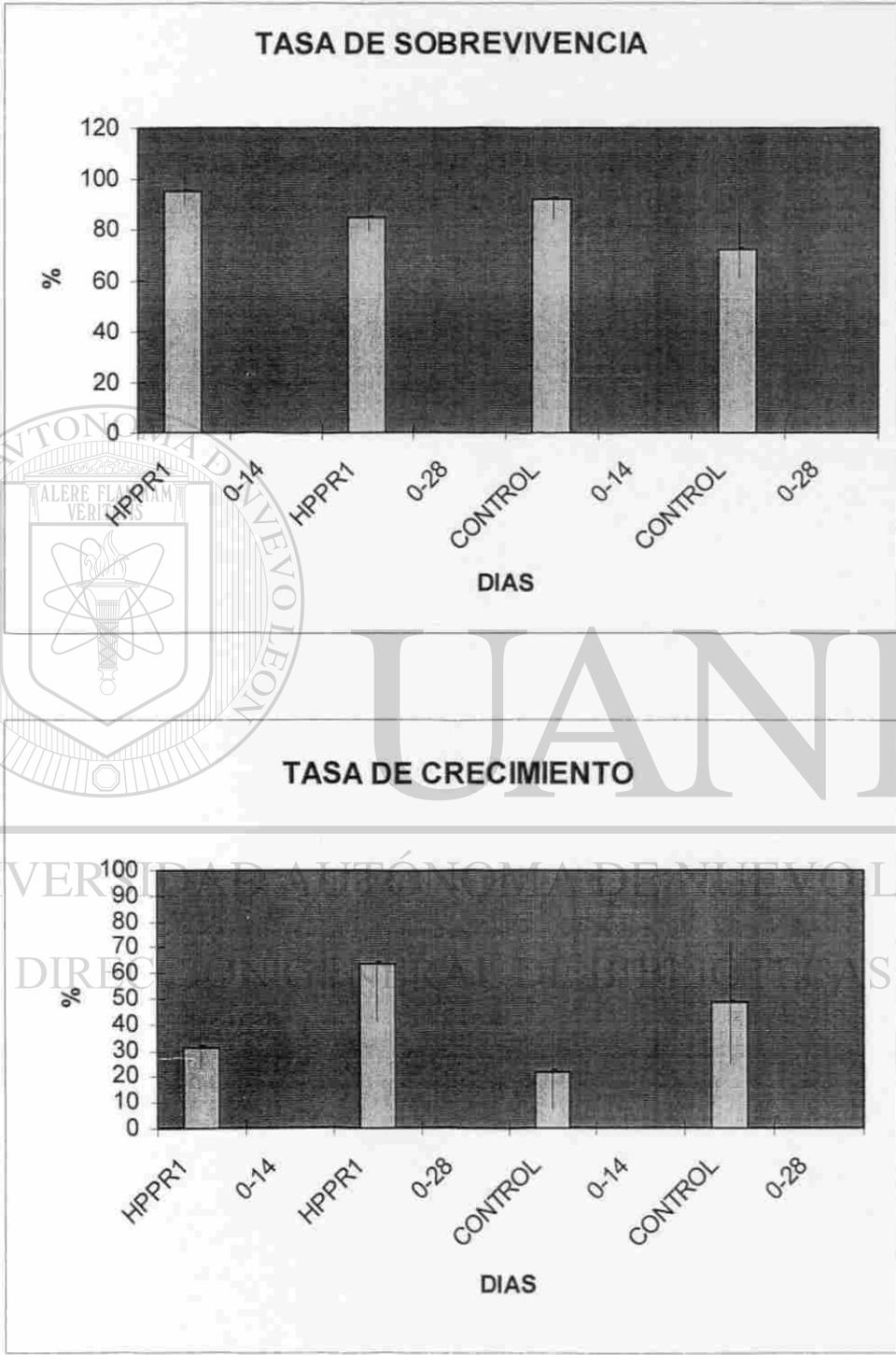


Figura 29.- Representación gráfica de las tasas de sobrevivencia (a) y crecimiento (b) del bioensayo para evaluar la biomasa como fuente proteica.

4.5 Bioensayo de pigmentación

4.5.1 Análisis proximal de los ingredientes

Se utilizaron los mismos ingredientes del bioensayo de crecimiento (4.4.1)

4.5.2 Análisis proximal de la dieta

Los porcentajes en base seca obtenidos para todos los parámetros fueron homogéneos. Por otra parte, cabe mencionar que en la formulación teórica se restringió a un 30% el aporte de proteína por los ingredientes. Sin embargo, en las dietas se encontraron valores mayores a los esperados, pero este aumento fue similar en todas ellas, por lo que se consideran dietas isoproteicas, isolipídicas, pero no en cuanto a calorías.

**Análisis proximal de las dietas experimentales del bioensayo de pigmentación
(Porcentaje en base húmeda)**

Parámetros	HPPR1	Phaffia Merck®	Control
Humedad	5.35	5.62	6.28
Cenizas	6.58	6.17	6.55
Grasas	7.96	7.69	7.5
Proteína	37.39	36.8	36.52
Fibra	1.1	0.86	1.03
ELN	41.62	42.85	42.12
Kg calorías	428.36	445.134	483.56
p.m.s	5.35	5.62	6.28

4.5.3 Evaluación nutricional

4.5.3.1 Calidad de agua

Los parámetros físico-químicos del agua marina de la Sala de Zootecnia del Programa de Maricultura durante el transcurso del segundo bioensayo fueron registrados durante cinco semanas (uno de aclimatización y cuatro del bioensayo) dentro de los siguientes rangos: Temperatura de 25 a 29 °C, salinidad de 35 a 36ppt., el pH de 8.3 a 8.6, amoníaco 0.1 ppm, los nitritos de 0 a 0.15 ppm y nitratos de 25 a 28 ppm.

4.5.3.2 Parámetros biológicas

Los resultados promedio de la tasas de sobrevivencia, crecimiento, consumo, incremento y conversión alimenticia de las tres dietas experimentales; al final del bioensayo (28 días) se presentan en la siguiente tabla. Además se incluyen los valores de *F* y probabilidad de la ANOVA.

Resultados promedio del bioensayo para evaluar pigmentación

Dietas Réplicas	Días	Control 4x10	HPPR1 4x10	Phaffia 4x10	Valores de <i>F</i> / Probabilidad
Tasa de Sobrevivencia	0-14	89.50	96.5	96.5	1.333
		7	7	7	0.311
DS	0-28	89.5	93	93	0.1111
		7	14	14	0.896
Tasa de Crecimiento	0-14	34.96	23.90	29.25	4.058
		4.98	6.72	4.52	0.055
DS	0-28	71.99	33.65	53.10	17.77
		9.52	11.97	3.73	0.001***
Tasa de Consumo	0-14	2.63	2.42	2.41	1.10
		0.33	0.21	0.12	0.37
DS	0-28	5.46	4.65	5.17	1.638
		0.87	0.60	0.31	0.247
Tasa de Incremento	0-14	0.87	0.65	0.65	1.77
		0.16	0.21	0.20	0.22
DS	0-28	1.79	0.91	1.37	13.17
		0.21	0.34	0.13	0.002***
Tasa de Conversión alimenticia	0-14	3.08	3.94	3.98	1.13
		0.6531	1.03	1.11	0.364
DS	0-28	3.04	5.72	3.80	3.15
		0.35	2.6	0.57	0.092

*** Altamente significativo a un nivel de significancia de 0.05.

Los resultados a los 0-28 días demuestran significativamente un aumento en la tasa de crecimiento e incremento en la dieta control, pero no para las dietas experimentales ($P=0.001$ y $P=0.002$ respectivamente), mientras que para la tasa de sobrevivencia, conversión alimenticia y consumo no se observaron diferencias entre las dietas, ver análisis estadístico en el anexo 2/2.

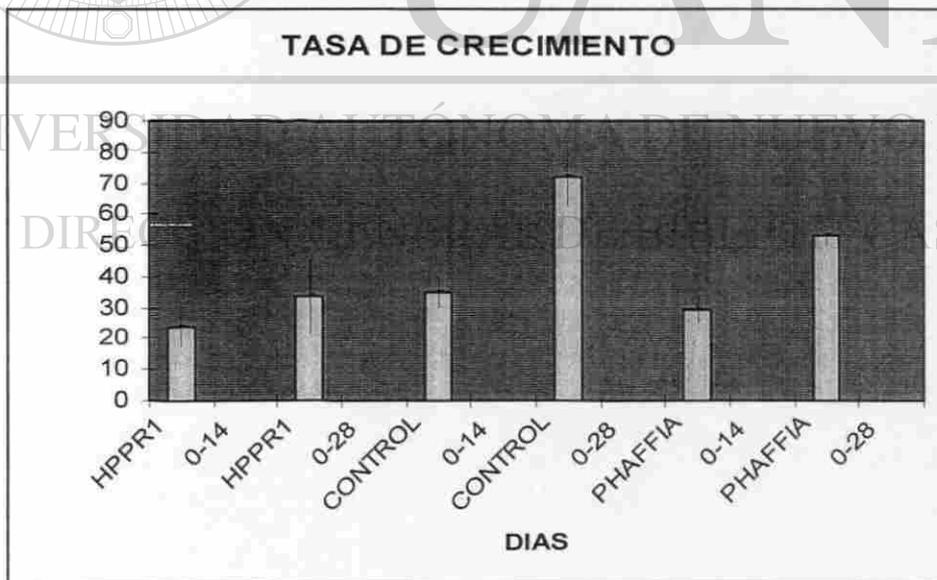
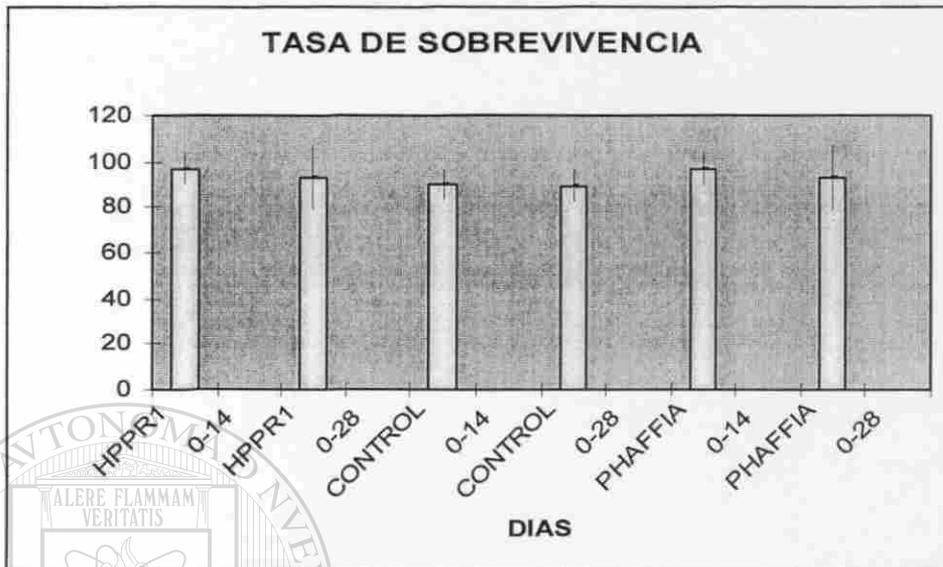


Figura 30.- Representación gráfica de las tasas de sobrevivencia (a) y crecimiento (b) del bioensayo para evaluar la biomasa como fuente de pigmentos.

4.5.4 Evaluación de pigmentación

4.5.4.1 Relación hepatosomática

El análisis estadístico indicó que no hubo diferencias significativas ($P = 0.292$), los valores de la relación hepatosomática fueron de menor a mayor, primero el control, seguido de HPPR1 y por último para la *Phaffia* (fig. 31 derecha); En la fig. 31 lado izquierdo, por apreciación visual, los hepatopáncreas fueron más pigmentados en los camarones alimentados con HPPR1 comparados con los controles.

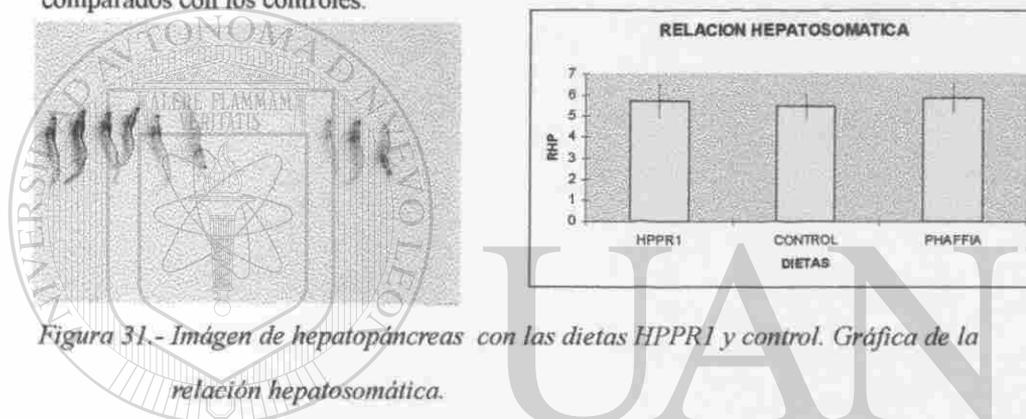


Figura 31.- Imagen de hepatopáncreas con las dietas HPPR1 y control. Gráfica de la relación hepatosomática.

4.5.4.2 Cuantificación de pigmentos

Para determinar la pigmentación en *L. vannamei*, se utilizaron dos métodos diferentes espectrofotométricos 1) absorción y 2) reflectancia. Después de los 28 días los camarones alimentados con las tres dietas: *Phaffia*, HPPR1 y Control, se formaron dos grupos, el primero se fraccionó en dos: A) crudos y B) cocidos, además, cada uno se subdividió en cabeza, exoesqueleto y músculo. Los pigmentos se extrajeron con acetona-hexano y se leyeron en un espectrofotómetro a 470 nm. La curva se realizó en metanol por lo cual los cálculos se realizaron con el coeficiente de astaxantina en hexano.

Los resultados se muestran en la fig.32. Al aplicar una ANOVA no se encontraron diferencias, aunque existió una tendencia de aumento de pigmentación para los camarones alimentados con las dietas de *Phaffia* y HPPR1 en todas las subdivisiones de ambas fracciones, crudas o cocidas del camarón, con la excepción de la cabeza cocida del control.

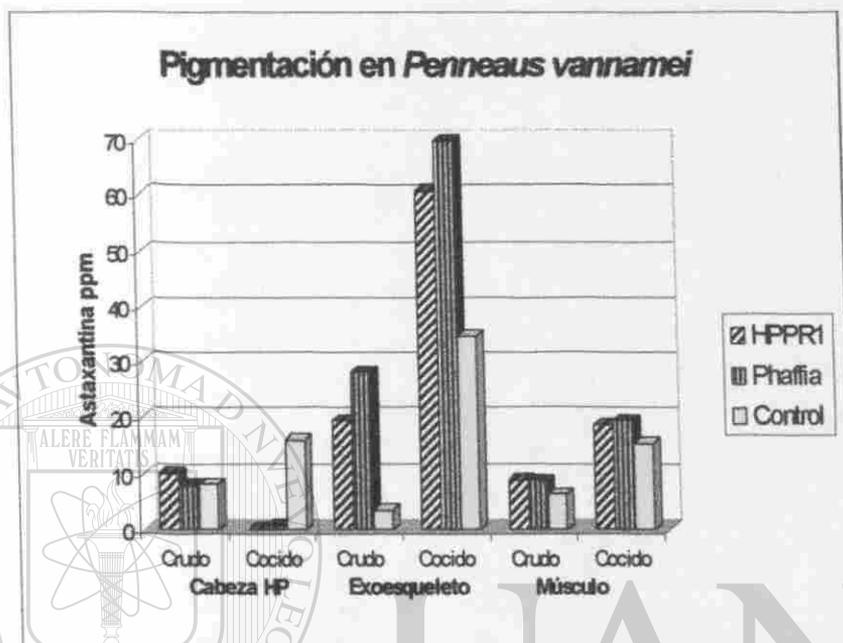


Figura 32.- Cuantificación de pigmentos por el método espectrofotométrico de absorción

En el segundo método, se compararon cuatro dietas: A: Control con dieta comercial suplementada con *artemia sp.*; B: HPPR1; C: Dieta control sin pigmentos; D: *Phaffia*. Se midió el color con un espectrofotómetro de reflectancia equipado con una lámpara de xenón, pulsado con una esfera para iluminación difusa y eliminar el efecto de direccionalidad, además un filtro UV y un adaptador en el área de exposición grande o pequeña para ser utilizado en el software Color Mentor(ver anexo II). Los resultados se analizaron, con los valores Z que representan la fuerza del pigmento. No se encontraron diferencias significativas ($P = 0.243$). Sin embargo, En las gráfica y fotografía de la fig. 34 se puede apreciar una tendencia en pigmentación mayor para el Control A, seguido de *Phaffia*, HPPR1 y por último la dieta C control sin pigmento adicional

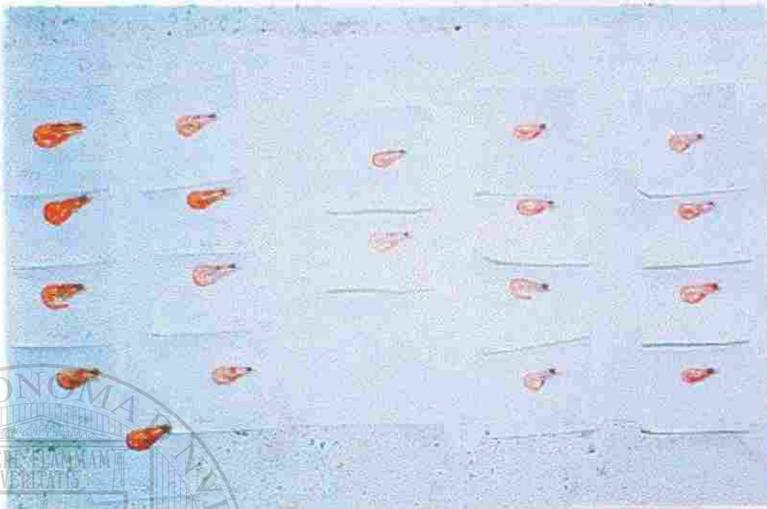


Figura 33.- Camarones cocidos: 9 HPPR1, 2 control, 8 contol-artemia

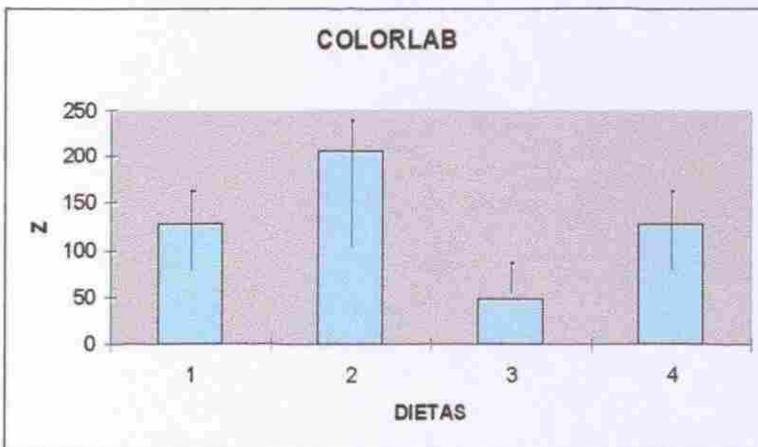


Figura 34.- Cuantificación de pigmentos por el método espectrofotométrico de reflectancia.

A continuación se muestran en la fig. 35 las gráficas con los estímulos por separado: la primera el sistema Lab, donde L representa la luminosidad; A, el color de verde a rojo y B, de azul a amarillo. En la segunda muestra la cromaticidad, el tono y brillantez.

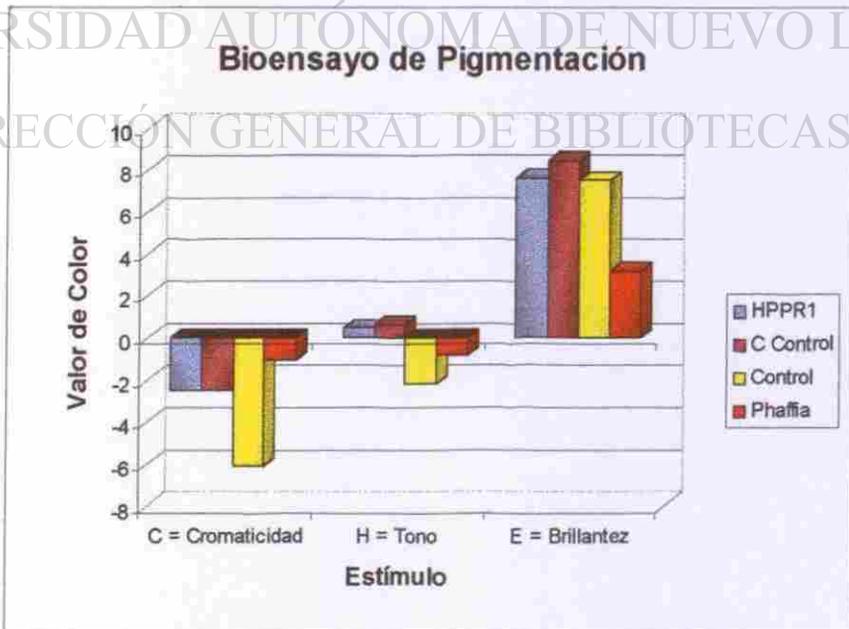
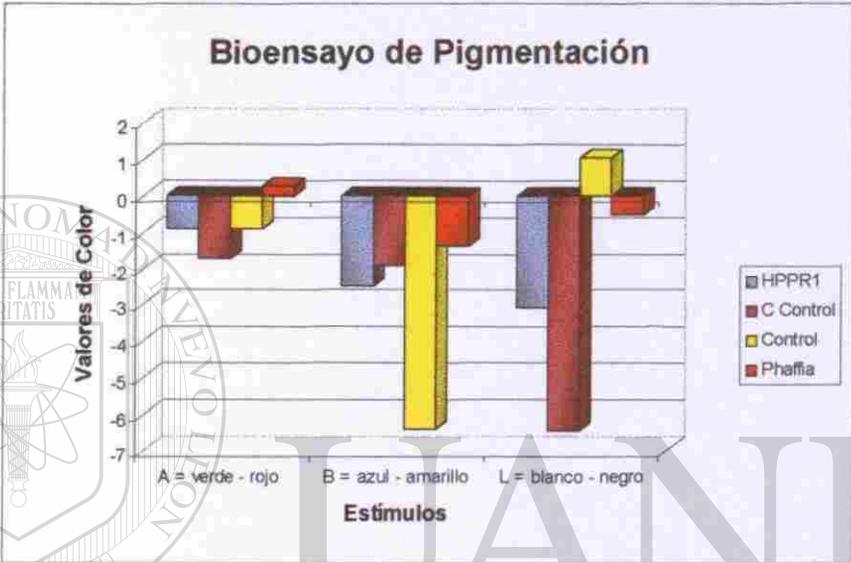


Figura 35.- Cuantificación de pigmentos por espectrofotometría de reflectancia (L^*a^*b)(L^*H^*C).

4.6 Bioensayo para medir la digestibilidad de la proteína

4.6.1 Análisis proximal de los ingredientes

Se utilizaron los mismos ingredientes del bioensayo I (4.4.1)

4.6.2 Análisis proximal de las dietas

En la siguiente tabla se muestran los resultados de los parámetros del análisis proximal de las tres dietas elaboradas para el Bioensayo de digestibilidad del ingrediente: biomásas de HPPR2 y *Phaffia*. La dieta control es mezclada con las biomásas en una proporción 70:30. Las dietas son isoproteicas, e isolipídicas y solo el porcentaje de cenizas es alto, mientras que los carbohidratos son bajos para la biomasa HPPR2.

Análisis proximal de la dietas HPPR2-30, Phaffia-30 y Control-30

Parámetros	HPPR1	<i>Phaffia</i> Merck®	Control
Humedad	4.57	8.72	5.59
Cenizas	15.096	6.32	6.82
Grasas	8.0	10.82	9.96
Proteína	30.485	30.5	32.375
Fibra	1.2	1.8	1.3
ELN	40.649	41.84	43.955

4.6.3 Digestibilidad de la proteína

Como resultados de este bioensayo se observó una diferencia en la cantidad en promedio de heces totales de 4 replicados recolectadas en diez días de las dietas control, *Phaffia* y HPPR1 de 0.432, 0.650 y 0.899g respectivamente. Los resultados de la digestibilidad de la proteína para la dieta HPPR2-30 fue significativa ($P=0.031$), pero no para la digestibilidad de la materia seca ($P=0.744$)

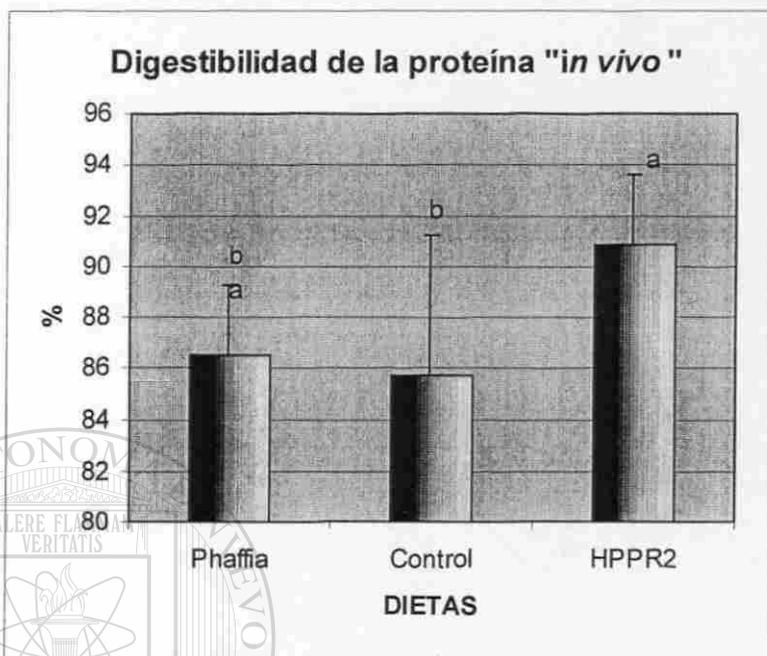


Figura 36.- Digestibilidad de la proteína "in vivo".

4.7 Bioensayo para medir la actividad inmunoestimulante

4.7.1 Evaluación nutricional

4.7.1.1 Calidad de agua

Los parámetros físico-químicos del agua marina de la Sala de Zootecnia del Programa de Maricultura fueron por igual a los otros bioensayos y también se verificó su calidad microbiológica.

4.7.1.2 Parámetros biológicos

Los resultados promedio de las tasas de sobrevivencia, crecimiento, conversión alimenticia, consumo, incremento y biomasa total de las cinco dietas experimentales al final del bioensayo (49 días) se presentan en la siguiente tabla. Además se incluyen los valores de F y probabilidad del análisis de ANOVA:

Resultados promedio bioensayo para evaluar inmunoestimulación

Diets Réplicas	Días	Control 8x10	HPPR1 4x10	Phaffia 8x10	Saccha. 8x10	Glucan 8x10	Valores de F/P
TS	0-14	90	95	95	93.75	90	0.3859
DS		10.6	10	5.77	7.44	13.09	
TS	0-28	76.25	83.3	92.5	82.5	75	1.0534
DS		19.95	11.54	5	11.54	17.72	
TS	0-49	5625	76.65	77.50	71.25	47.50	4.605
DS		15.06	23.09	9.57	13.56	15.85	0.006***
TC	0-14	188.610	174.935	179.677	179.678	180.416	0.4311
DS		20.82	13.36	34.98	14.15	12.85	
TC	0-28	326.275	292.713	315.592	313.785	324.437	0.4584
DS		17.46	60.33	56.31	42.29	38.83	
TC	0-49	540.162	484.936	589.447	540.230	532.338	1.542
DS		36.90	74.89	84.33	64.65	65.37	0.196
TCA	0-14	2.198	2.195	2.147	2.178	2.258	0.1445
DS		0.2941	0.2634	0.2910	0.1974	0.3009	
TCA	0-28	3.3075	3.2067	2.6975	3.0338	3.2363	0.4942
DS		1.1313	0.4546	0.4759	0.5685	0.6800	
TCA	0-49	3.9325	3.2667	3.1925	4.3450	5.2800	1.4936
DS		0.7962	0.6553	0.8405	1.0952	2.8527	0.2330
C	0-49	9.6100	7.2867	8.600	9.9313	12.4913	1.6702
DS		1.7547	1.8745	2.4794	1.986	5.8441	0.1871
I	0-49	2.4538	2.2267	2.6950	2.3225	2.4288	1.5751
DS		0.1805	0.3443	0.3854	0.2817	0.2922	0.2106
BT	0-49	18.04	20.04	24.22	19.83	14.91	2.869
DS		4.66	4.08	2.25	4.48	5.85	0.043*

* Significativo, *** Altamente significativo a un nivel de significancia de 0.05

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.

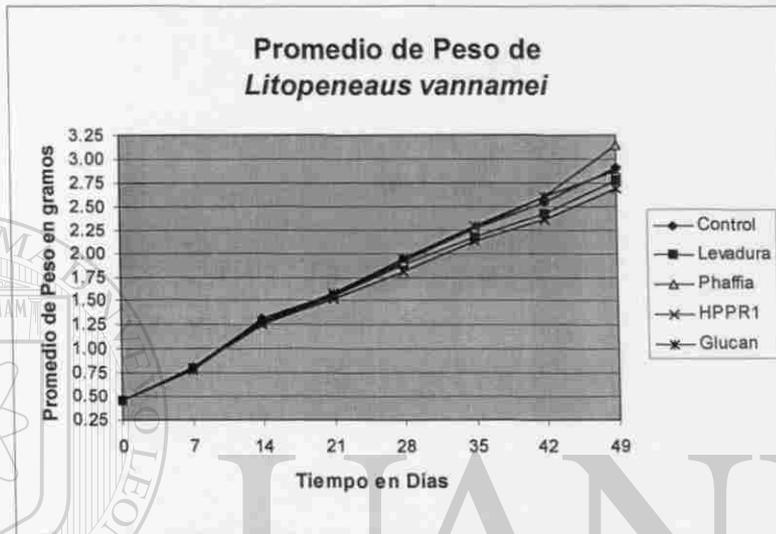


Figura 37.- Promedio de peso de *Litopenaeus vannamei*.

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 β -glucano, pero no cuando se compararon con los de control y con los otros dos tratamientos (fig. 38).

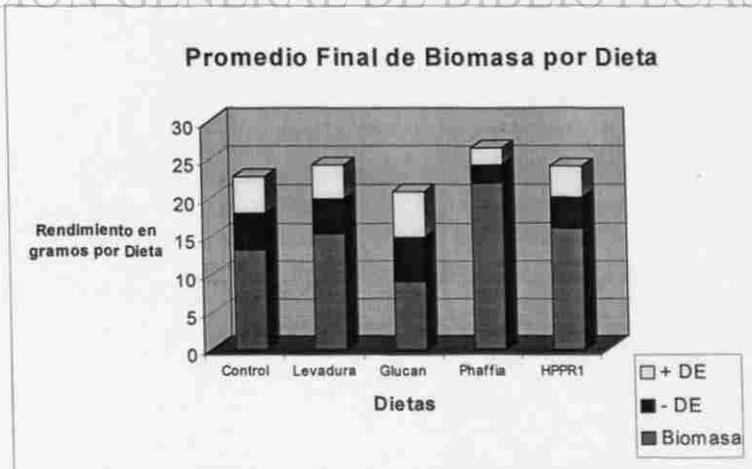


Figura 38.- Promedio final de biomasa de cada dieta.

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 β -glucano (fig. 39).

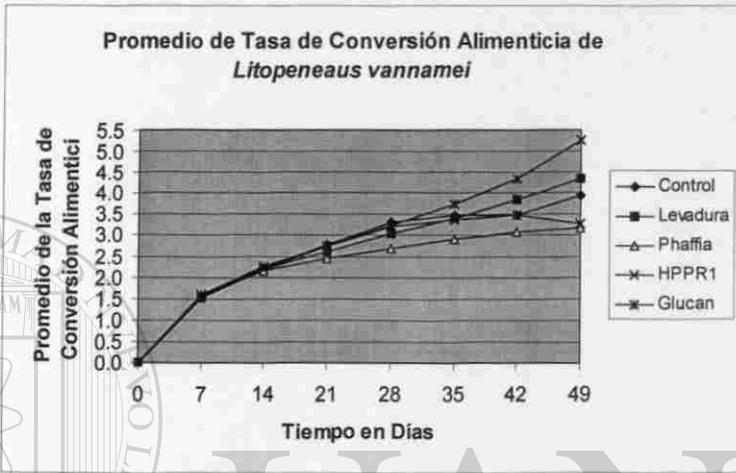


Figura 39.- Promedio de tasa de conversión alimenticia *L.vannamei*

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 β -glucano (47.5%), pero no a comparación de los animales alimentados con la dieta control (56.25%) (fig. 40).

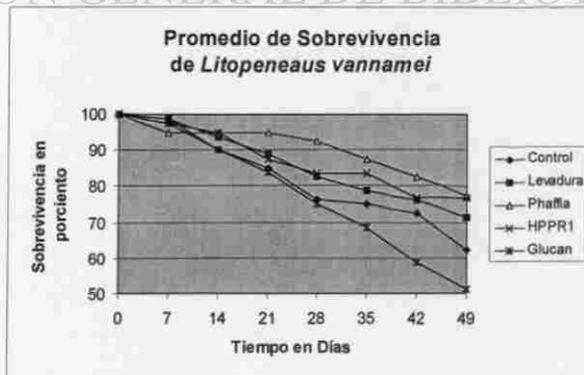


Figura 40.- Promedio de sobrevivencia de *L. vannamei*

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 β -glucano.

Los valores para la dieta de β -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.

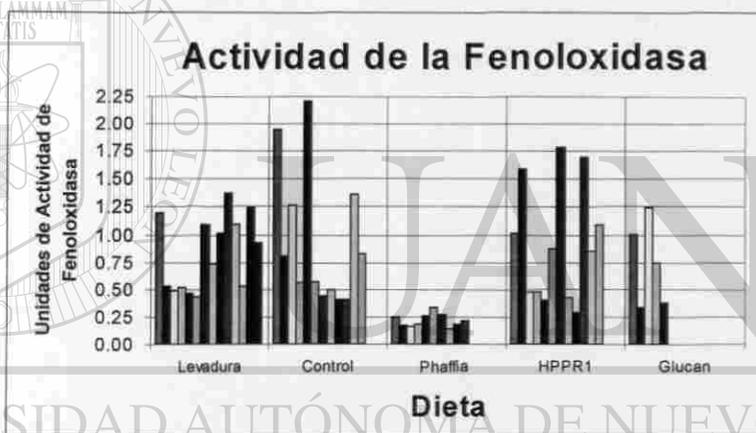


Figura 41.- Actividad de la fenoloxidasa en *L. vannamei*

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).

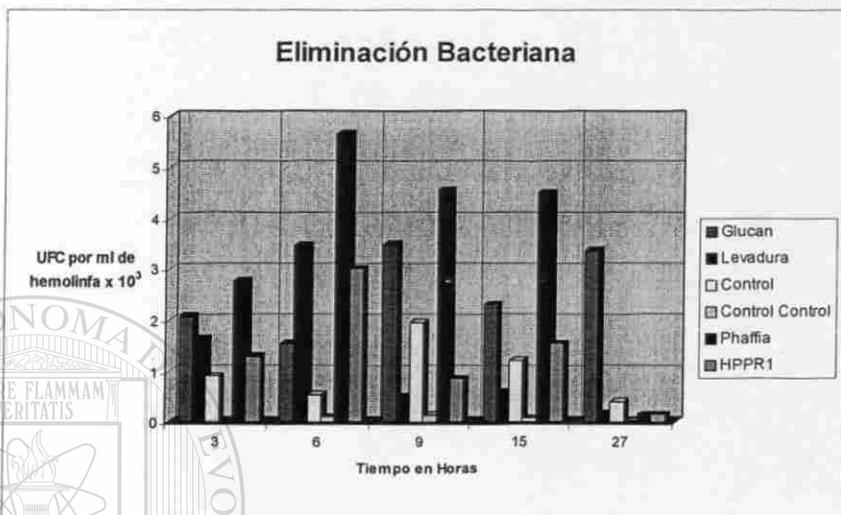


Figura 42.- Eliminación bacteriana en *L. vannamei*

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.

Análisis 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.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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 aeración, 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 periodos (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 An, 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 benéfica, 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 l medio mineral hasta obtener pigmentación aproximadamente 50 h; completandose 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 intermediarios 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 metodo 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, aldeídos 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 geranyl-geranyl 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 μ_{max} de 0.16. Los valores de μ (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 acetaldehído, 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 adición 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_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, Kla , 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 Kla , 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 periodos (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 HPPRI son comparables a los descritos en la literatura consultada; el contenido de proteína reportado para la levadura *Saccharomyces exiguus* 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 HPPRI 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 zootecnia 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 isocalóricas (Akiyama, 1991).

La estabilidad de las dietas cubrió las necesidades del camarón, la prueba de lexicación 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 palatabilidad 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 la 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 harvey* 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 β -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 exiguus*, 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 β -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 β -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 HPPK1 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 hepatopáncreas (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 administran 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 β -1,3 glucano, encontrado en las paredes de las células de las bacterias y hongos, dirige la melanización de la hemolinfa al activar la profenoloxidasas 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 β -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 profenoloxidasas a su forma activa. Al parecer el micelio en la biomasa HPPRI 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 β -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^{-7} g/cangrejo para disminuir efectivamente la cuenta de células en *Carcinus maenas* (Smith *et al.*, 1984).

Sung *et al.* (1994) estudiaron los efectos del β -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 β -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 β -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 β -glucano, para la trucha arcoiris, resultan en niveles inferiores de protección que a los 28 días. Parece que los compuestos como el β -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 exiguus*.

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_{1a} 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 o otros carotenos en la dieta. En cuanto la actividad de la fenoloxidasas, 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 fenoloxidasas, 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 había 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 (Torrissen, 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 Acuicultura. Ed. Asoc. Americana de Soya-, F.C.B. U. A. N. L.; Mty., N.L.; 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 acuicultura. Memorias del Primer Simposium Internacional de Nutrición y Tecnología de Alimentos para Acuicultura; 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.** Continous 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 Acuicultura. 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.** Aparent 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 Acuicultura. 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 Acuicultura de Soya-Programa de Maricultura, F.C.B. U. A. N. L.; Mty., N.L. Méx., p. 43-79.
- Alanís, G.G. y L. García-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 & Sones, p. 339-352.
- Álvarez, M.M., García, 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 exiguus* 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 (Cr₂O₃) 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 Biothechnology Simposium, 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., Tapio Palva, E., Iwanaga, S., Söderhäll, K., 1994. Structural and biological activity of a 1,3- β -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 Acuicultura. 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 Measurement 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 Acuicultura. 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 Acuicultura. Ed. Asoc. Americana de soya- Programa de Maricultura. F.C.B. U. A. N. L., Mty., N.L., Mex., p. 345-353.
- Costero, 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 Acuicultura. 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 fórmula 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., Ricque, 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 *Peneaus vannamei*. Primer Simposium Internacional de Nutrición y Tecnología de Alimentos para Acuicultura. 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 penaeid shrimps. Segundo Simposium Internacional de Nutrición Acuicola. 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. Proceeding 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 mop de contaminantes en las descargas de aguas residuales provenientes de las actividades de cultivo acuicola. Sept. 20 1994, p. 5-7.
- Debasque, M., Rollin, X., Devresse, B., Duray, A., Sorgeloos, P., 1995a. Evaluation of different yeast products and inmunostimulants 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 praws *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 Ricque, M. y Cruz-Suárez, L.E., 1992. Investigación del Programa Maricultura FCB/UANL. Memorias de la reunión sobre nutrición y biopatología acuicola. 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* whez 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 exiguus* crecida en etanol como principal fuente de carbono y energía. Tesis de maestria 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., Martinez, 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., Ljunngdhal, 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 Comparison and Quality* Ed, G. Flick, p. 305-360.
- Hardy, J., 1991.** Mixit-2+ Least-Cost Ration Balancy. Agricultural Software Consultants Inc. Second Printing. Kingville, Tx USA, 336 pp.
- He Haiqui, and A. Lawrence, 1993.** Vit. E requeriment 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*, **18**: 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 stored 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.

Koueman, E.W., Robert, D.G., 1985. Practical Laboratory Mycology 3ed. Williams & Wikins., p. 21-54.

Kosbio, S., Teshima, S., Kanazawa, A., and T. Watso, 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 rodoszyma*. 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., Mohny, L.L., Natividad, J.N., Rykanyi, 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 rhodoszyma* 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 8ª 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. 1ª 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 Victom 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* Fabricius) 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 Acuicultura 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. Biotachnol. 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 praw *Penaeus japonicus* Reared Under Laboratory Conditions. Aquacultrue Engineering, 12: 203- 213.

Nelis, H.J., and D.E. Leebeer, P., 1989. Profiling and Quantitation of Bacterial Carotenoids by Liquid Chromatography and Photodiode Array Detection. Applied and Enviromental

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.

Olquin, C., 1993. Optimización de parámetros en cultivo continuo de *Saccharomyces exiguus* 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. Micronutrientes 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: Tópicos 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 Aquaculture 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.

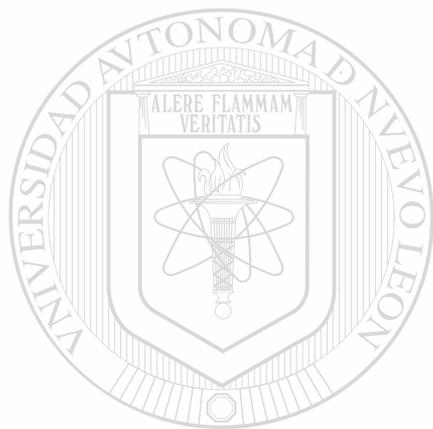
Ross, K.J., 1979. Biology of the Fungi Mc Graw Hill Inc., p. 239-241.

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.
- Sedmak, J.J., Weerasinghe, D.K., Joly, 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 Acuicultura. Secretaría de Pesca, Acuicultura , 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 mixed 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. β 1,3-glucan induced reactions in the shore crab, *Carcinus maenas*. *Comp. Biochem. Physiol.* 77A: 635-639.
- Söderhäll, K., 1981. Fungal cell wall β -1,3 glucans induce clotting and phenoloxidase attachment to foreign surfaces of crayfish hemocyte lysate. *Dev. Comp. Immunol.* 5: 565-573
- Söderhäll, K., 1982. Prophenoloxdase 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 β -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 CO₂ extraction of β - 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 Immunoestimulation. *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.
- Torrissen, 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.
- Torrissen, 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(1): 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. Teis de Maestría. Instituto Tecnológico de Durango, Durango, Dgo. México.
- Vincent, M., 1988.** Roles and Transformation des Pigments Carotenoides dans les Reseaux 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, β -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.

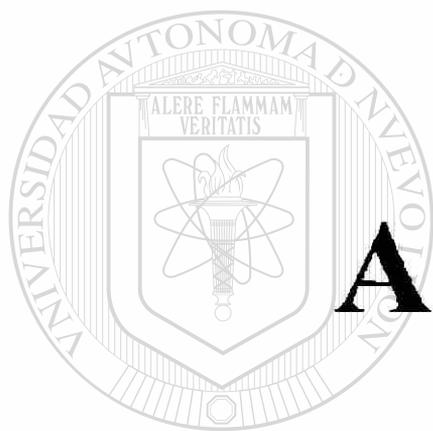


UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



ANEXOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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

Mario Moisés Álvarez, 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 (μ_{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 μ_{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 explicables 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 *Nocardia*, así como las levaduras del género *Rhodotorula* y los hongos *Cantharellus cinnebrannus*, *Phyllotopsis nodulans*, *Neurospora crassa* y algunas especies de *Fusarium* y *Phycomyces*. El pigmento denominado azul índigo, 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, imparten tonalidades atractivas a los huevos de éstas.

M.C. Mario Moisés Álvarez: Profesor-Investigador del Centro de Desarrollo Biotecnológico del ITESM Campus Monterrey. mmaalvar.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.

Microorgan.

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 miceliar, 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.

a 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 1250 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:	
(NH ₄) ₂ SO ₄	5.0 g
KH ₂ PO ₄	3.0 g
MgSO ₄	0.5 g
CaCl ₂	0.1 g
NaCl	0.1 g
Etilol al 96% peso	1% volumen
Compuestos traza:	
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.0280 mg
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.0140 mg
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.0250 mg
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.0240 mg
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0.0240 mg
MnSO ₄ .H ₂ O	0.0840 mg
Biotina	0.0002 mg
Tiamina	0.0400 mg

Se realizaron pruebas de crecimiento intermitente para determinar la sensibilidad de cultivos predominadas 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.

6.52

□ 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 vio 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).

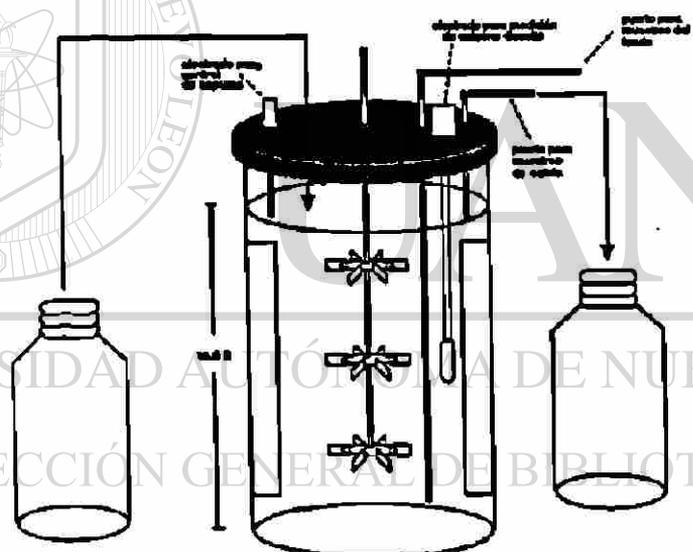
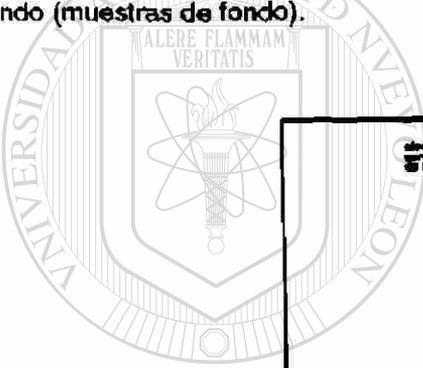


Figura 1. Representación esquemática del reactor tipo tanque utilizado durante el cultivo continuo de *S. exigus* y HPPR1.

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_{O_2} a distintas condiciones operativas.

Se realizó un análisis comparativo de coeficientes de transferencia de oxígeno a distintos flujos de alimentación. Las determinaciones de k_{O_2} se realizaron a flujos en el rango de 750-3000 ml/hr. y a condición estable de 1vvm de aireación. Las estimaciones fueron realizadas por el método dinámico [6 y 7], considerando que:

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

donde:

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

k_{O_2} 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/lt.

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.

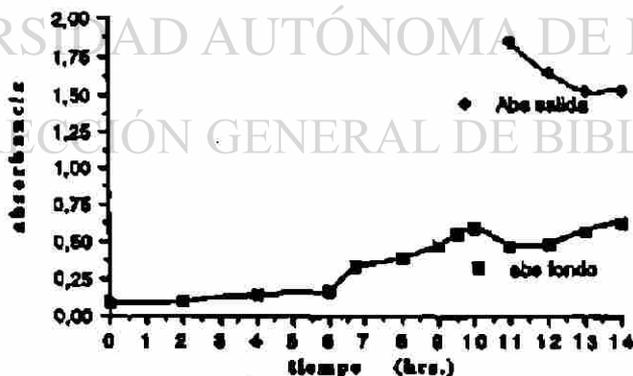


Figura 2. Perfil de concentración celular (expresada como absorbancia a 450 nm) respecto al tiempo, para las primeras 14 horas de operación de un cultivo de HPPR1 y *S. exigua* en un reactor de 14 lt. A t= 10.15 arrancó la operación continua.

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 tercer 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 $t=49.75$).

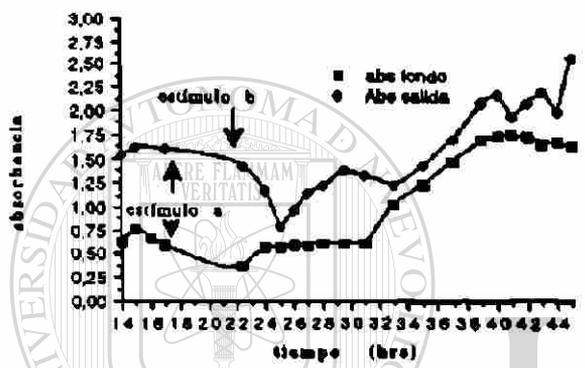


Figura 3. Perfil de concentración celular (expresada como absorbancia a 450 nm) respecto al tiempo, para el intervalo comprendido entre 14 y 44 horas de operación de un cultivo de HPPR1 y *S. exigus* en un reactor de 14 lt. El estímulo a consistió en un cambio de flujo volumétrico desde un valor de 490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

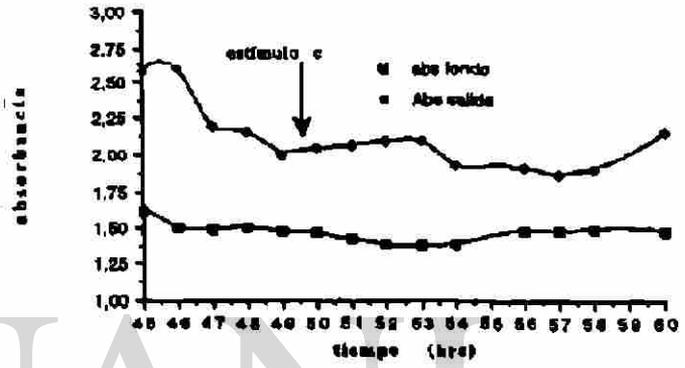


Figura 4. Perfil de concentración celular (expresada como absorbancia a 450 nm) respecto al tiempo, para el intervalo comprendido entre 45 y 60 horas de operación de un cultivo de HPPR1 y *S. exigus* en un reactor de 14 lt. El estímulo c consistió en la modificación del medio de cultivo, retirando los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

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

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:

$$1 - (T_{ao})(\mu_{max}) < 0 \quad (3)$$

...[8], donde:

- T_{ao} es el tiempo de residencia hidráulico del reactor, igual a 1/D,
- μ_{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.

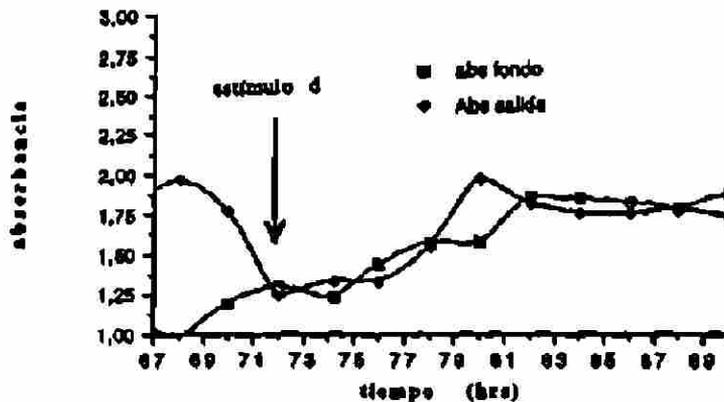


Fig 5 consistia en mod. de agitacion 300 -> 700 rpm

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 disimilitud 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%). Obsérvese sin embargo la repercusión negativa de un incremento de concentración de etanol hasta un nivel del 4% (t=117.5, figura 6).

Fig 6 # de impulsos

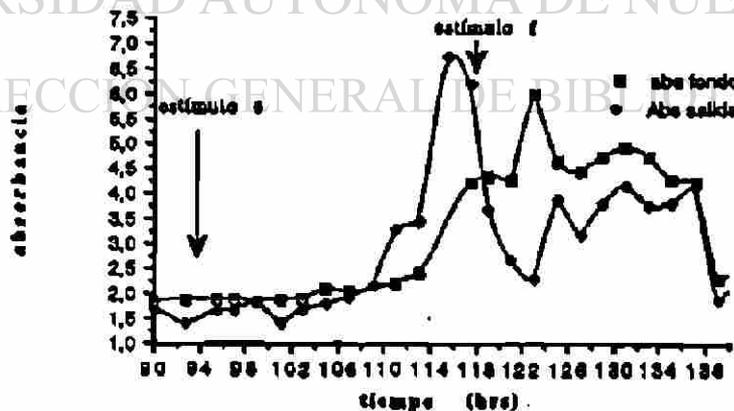


Figura 6. Perfil de concentración celular (expresada como absorbancia a 450 nm) respecto al tiempo, para el intervalo comprendido entre 87 y 89 horas de operación de un cultivo de HPPR1 y *S. exigus* en un reactor de 14 lt. Los estímulos e y f consistieron en incrementos en la concentración de etanol en el medio de cultivo hasta un 3% y 4% volumen respectivamente.

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%.

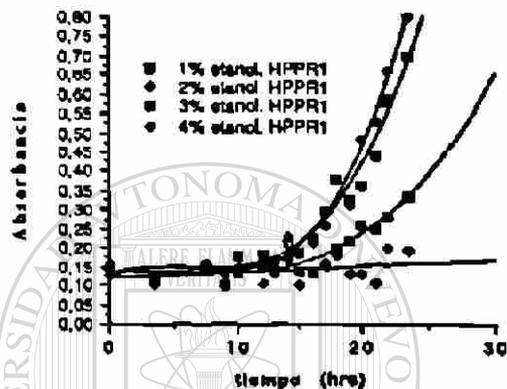


Figura 7. Perfil de concentración celular (expresada como absorbancia a 450 nm) respecto al tiempo, para el cultivo intermitente de HPPR1 en matraces Erlenmeyer de 1 L, a distintas concentraciones volumétricas de etanol.

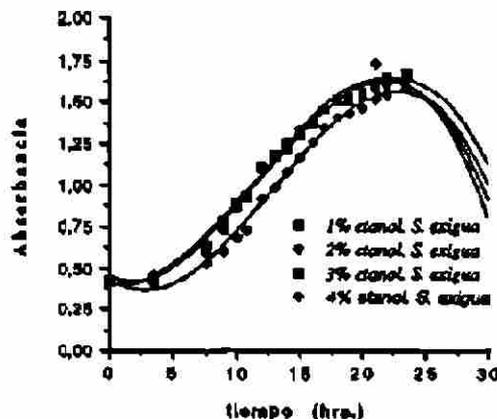


Figura 8. Perfil de concentración celular (expresada como absorbancia a 450 nm) respecto al tiempo, para el cultivo intermitente de *S. exigus* en matraces Erlenmeyer de 1 L, a distintas concentraciones volumétricas de etanol.

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 μ_{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%.

I/I

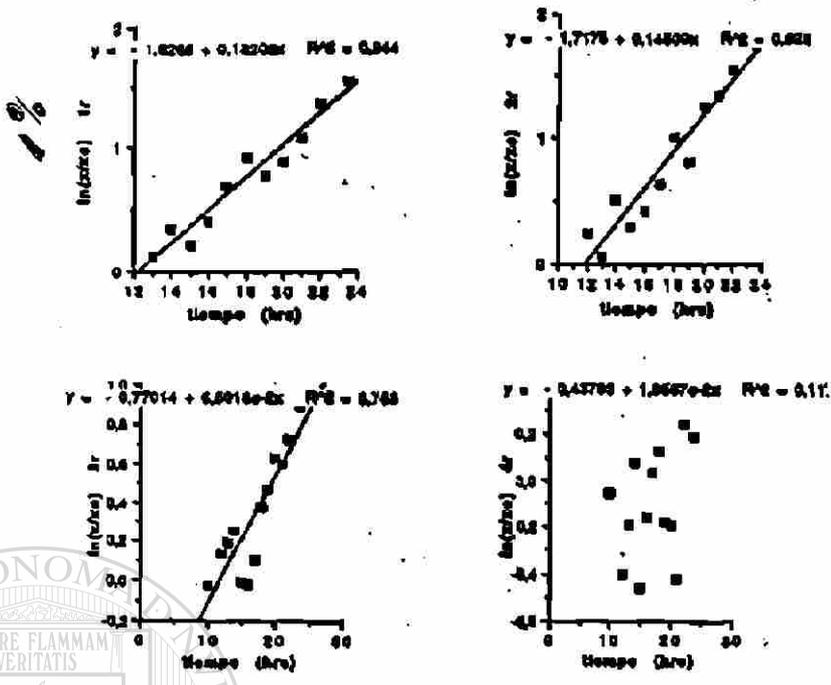


Figura 9. Determinación de tasas específicas de crecimiento (pendientes de la recta $\ln(x/x_0) = b + \mu x$), para diferentes concentraciones volumétricas de etanol en el medio, de un cultivo dominado por la cepa HPPR1. En la ordenada de cada gráfica se indica la concentración de etanol en porcentaje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

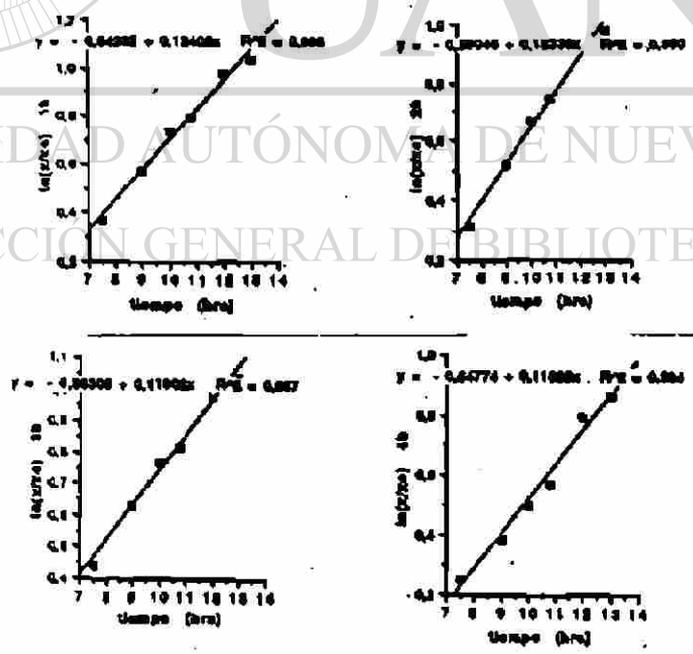


Figura 10. Determinación de tasas específicas de crecimiento (pendientes de la recta $\ln(x/x_0) = b + \mu x$), para diferentes concentraciones volumétricas de etanol en el medio, de un cultivo dominado por la cepa *S. exigus*. En la ordenada de cada gráfica se indica la concentración de etanol en porcentaje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

Cuadro 2. Tasa de crecimiento específica (μ)* 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%	0.063	0.110
4%	0.000	0.116

* μ expresada en 1/hr.

~ L. 0.145? 1.32

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 específica 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 línea 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 $(K_s, \mu_{\text{máx}})$.

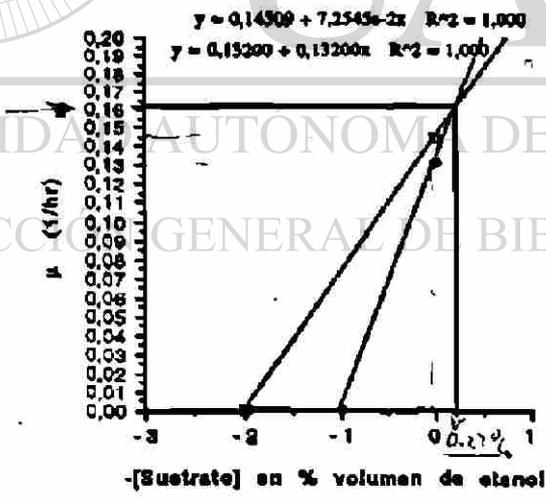


Figura 11. Determinación de los parámetros cinéticos K_s , $\mu_{\text{máx}}$ de la cepa HPPR1, por el método gráfico de Eisenthal y Cornish-Bowden [9].

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

pendiente? m.g/lt.wg - unidad de oxígeno

I/E

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

Flujo (ml/hr)	x (abs)	m_x (mg/(l·seg))	m^*	K_{La} (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

* de la
in
de 7/18
de 19

* m expresada en (mg/(l·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, propiciaría una tasa de dilución de 0.1428, aún inferior a la μ_{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 estén 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.

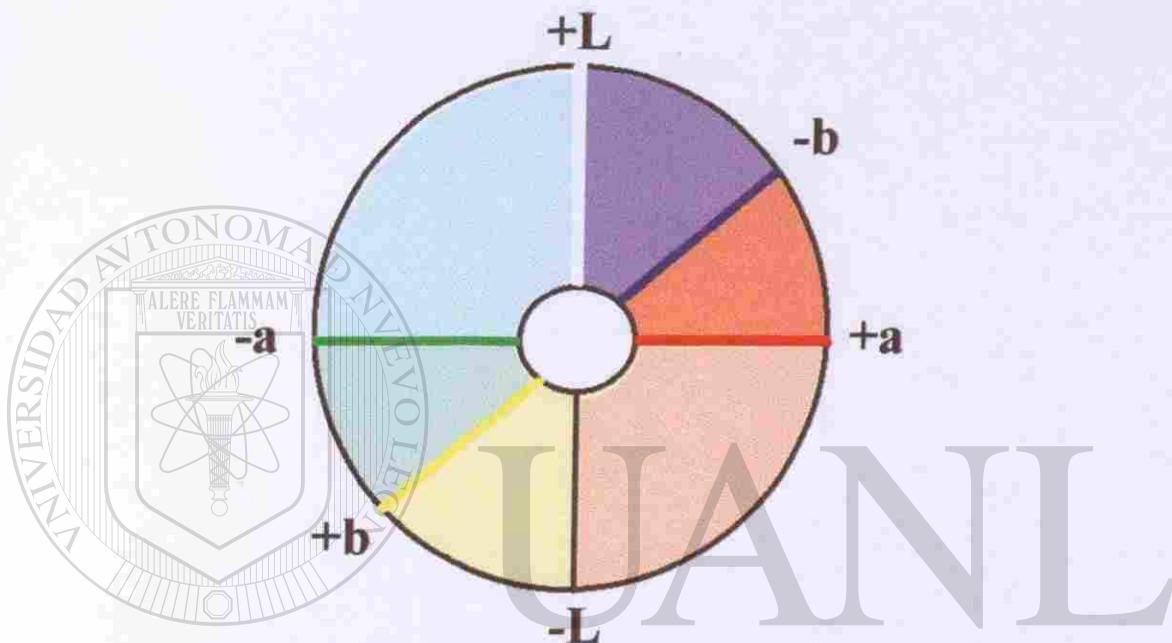
No hay indicio de que la remoción de elementos traza y vitaminas afecten significativamente el crecimiento de HPPR1.

Bajo las condiciones de cultivo en un reactor continuo tipo tanque de 10.5 l 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 $Y_{O_2/S}$ resultan necesarios para evaluar la factibilidad de cultivo de la cepa HPPR1 con fines comerciales.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

5. Bibliografía.

- [1] Murdock, D.; Ensley, B.D.; Serdar, 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.D.B.; Harrison, D.E.F. y S.G. Oliver. The Role of Pigmentation in the Growth and Survival of the Methanol-utilising Bacterium, *Pseudomonas exotoquens*. 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).

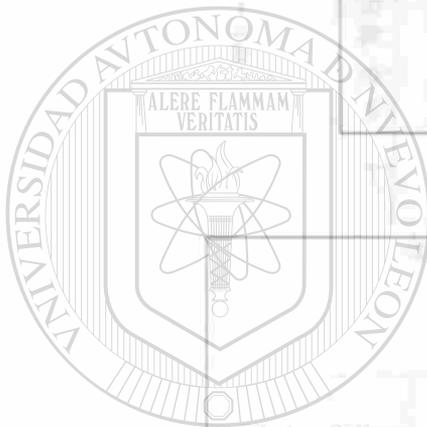
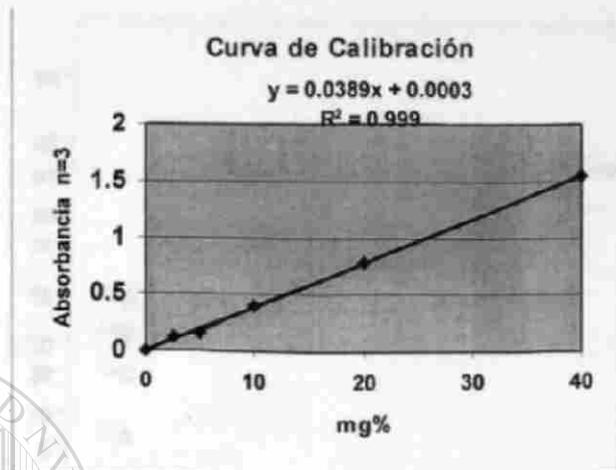


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

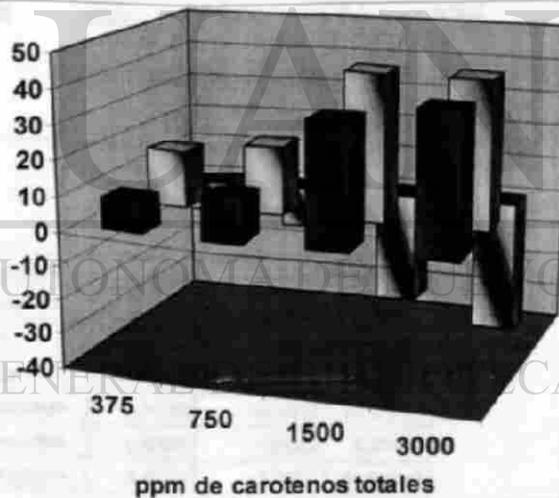
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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 rojicidad (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.



Unidades de color (Lab)

■ a ■ b ■ L

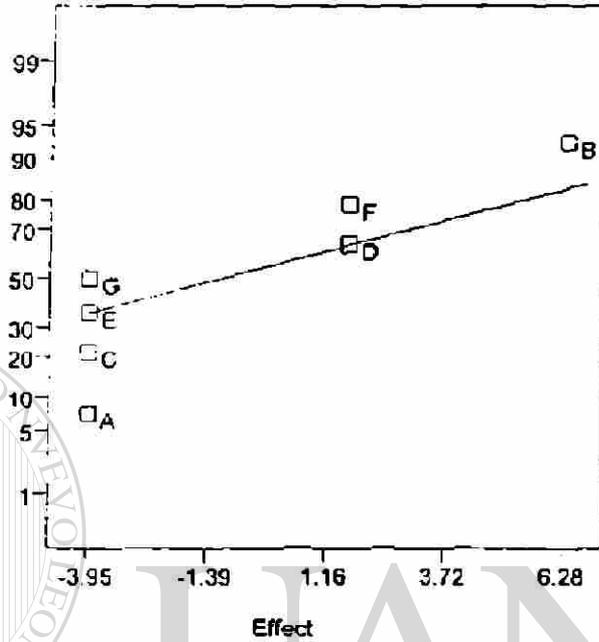


Curva patrón de biomasa pigmentada *Phaffia rodozyma*, ppm de carotenos totales/ unidades de color (Lab).

DESIGN-EASE Analysis

Response 1

% Protein



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	Dev Id	Run	Block	agitacion rpm Factor	VVM cc/min Factor	pH tones H Factor	Zdo. I ug./l Factor	vitaminas ug./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
8	8	3	1	500.00	1.00	3.00	1.00	0.00	1.00	0.00	200.00	2.03
2	2	4	1	700.00	1.00	3.00	0.00	0.00	0.00	1.00	200.00	2.51
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	91250.00	1	91250.0	1.02	0.3510
RESIDUAL	5347500.00	6	891250.0		
COR TOTAL	6258750.00	7			
ROOT MSE	944.06		R-SQUARED	0.15	
DEP MEAN	462.50		ADJ R-SQUARED	0.00	
C.V. Z	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	1	337.7757	-1.03	0.3510
A	-337.5000	1	333.7757		

Final Equation in Terms of Coded Factors

Response 1 =
 - 337.500 * A

Final Equation in Terms of Uncoded Factors

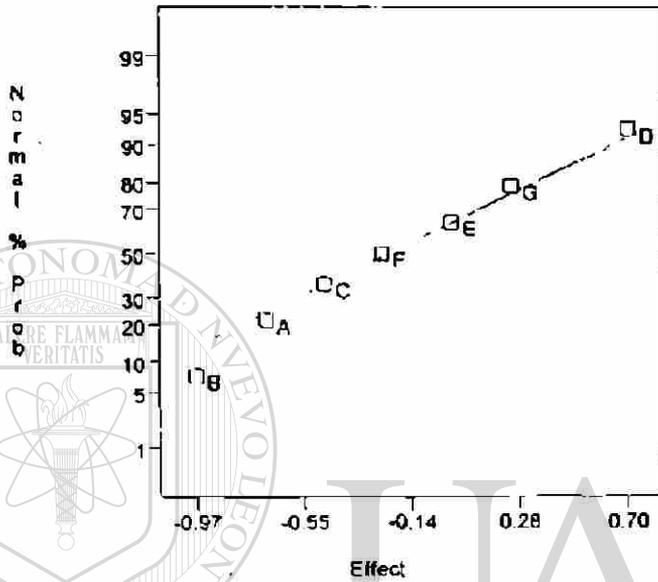
Response 1 =
 - 2487.500
 3.375 * agitation

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN DE ASESORIA TECNOLÓGICA

Obs ORD	ACTUAL VALUE	PREDICTED VALUE	RESIDUAL	LEVER	STUDENT RESID	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	1
2	2.00E+02	1.25E+02	7.50E+01	0.250	0.072	0.001	0.044	4
3	1.00E+02	8.00E+02	-7.00E+02	0.250	-0.856	0.122	-0.634	1
4	1.00E+02	8.00E+02	-7.00E+02	0.250	-0.856	0.122	-0.634	5
5	1.00E+02	1.25E+02	-2.50E+01	0.250	-0.031	0.000	-0.028	6
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	0.070	-0.702	7
8	2.00E+02	8.00E+02	-6.00E+02	0.250	-0.734	0.070	-0.702	3

DESIGN-EASE Analysis
Response 1



Term	Coefficient	Standardized Effect	Sum of Squares
A:Temp	-0.34977	-0.69953	0.978694
B:pH	-0.48589	-0.97137	1.587134
C:VVM	-0.23581	-0.47162	0.444347
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

Std	Gen M	Run	Block	A:Temp grados C Factor	B:pH pH Factor	C:VVM ml/min Factor	D:agitacion rpm Factor	E:NP propels Factor	F:flujo L/min Factor	G:LRM LRM Factor	Response 1 ppm Response	Response 2 gr l Response
4	4	1	1	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	3500.00	1.35
9	9	3	1	20.50	4.50	1.00	400.00	2.00	600.00	0.00	500.00	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	1.98

 Analysis of pigmento

SOURCE	SUM OF SQUARES	DF	MEAN SQUARE	F VALUE	PROB > F
MODEL	261.8013	4	65.200	1.24	0.0679
RESIDUAL	27.4424	3	9.147		
COR TOTAL	289.2437	7			
ROOT MSE	3.0243		R-SQUARED	0.91	
DEP MEAN	-1.4205		ADJ R-SQUARED	0.78	
C.V. %	-28.1640		PRED R-SQUARED	0.33	
Predicted Residual Sum of Squares (PRESS) =			135.146		

FACTOR	COEFFICIENT ESTIMATE	DF	STANDARD ERROR	T FOR H0	PROB > T
INTERCEPT	-1.820520	1	1.069314	-2.68	0.0638
A	-3.074346	1	1.069314	-3.27	0.0469
B	-3.492903	1	1.069314	-3.68	0.0330
D	3.074346	1	1.069314	3.27	0.0469
G	1.413026	1	1.069314	1.32	0.2781

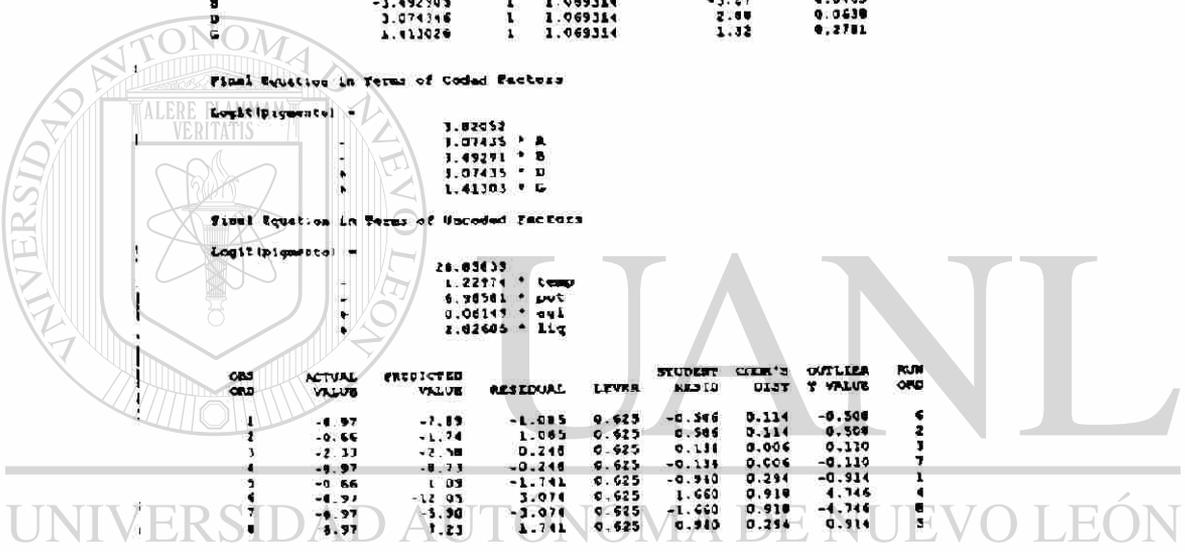
Final Equation in Terms of Coded Factors

Logit(pigmento) =
 3.82052
 - 3.07435 * A
 - 3.49291 * B
 + 3.07435 * D
 + 1.41303 * G

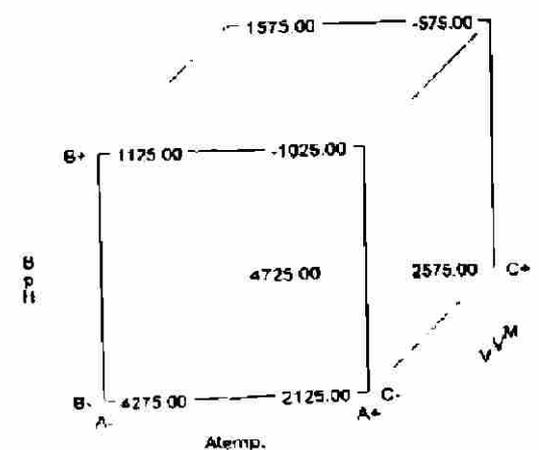
Final Equation in Terms of Uncoded Factors

Logit(pigmento) =
 28.85833
 + 1.22774 * Temp
 + 6.38581 * pH
 + 0.06145 * eq1
 + 2.02605 * Liq

OBS NO	ACTUAL VALUE	PREDICTED VALUE	RESIDUAL	LEVER	STUDENT RESID	COOK'S DIST	OUTLIER T VALUE	RUN ORG
1	-8.97	-7.89	-1.085	0.625	-0.346	0.114	-0.508	6
2	-0.66	-1.74	1.065	0.625	0.386	0.114	0.508	2
3	-2.33	-2.38	0.248	0.625	0.131	0.006	0.110	3
4	-8.97	-8.73	-0.248	0.625	-0.131	0.006	-0.110	7
5	-0.66	1.03	-1.741	0.625	-0.910	0.294	-0.914	1
6	-8.97	-12.03	3.074	0.625	1.660	0.918	4.746	4
7	-8.97	-3.90	-3.074	0.625	-1.660	0.918	-4.746	8
8	8.97	1.23	1.741	0.625	0.910	0.294	0.914	5



DESIGN-EASE Analysis
 Predicted Response 1



Analysis of Response 2

SOURCE	SUM OF SQUARES	DF	MEAN SQUARE	F VALUE	PROB > F
MODEL	0.009730	1	0.009730	0.07	0.8066
RESIDUAL	0.893336	6	0.148889		
COR TOTAL	0.903066	7			
ROOT MSE	0.385662		R-SQUARED	0.01	
MEAN	2.393375		ADJ R-SQUARED	-0.15	
C.V. 2	17.608283		PRED R-SQUARED	-0.76	
Predicted Residual Sum of Squares (PRESS) =			3.588352		

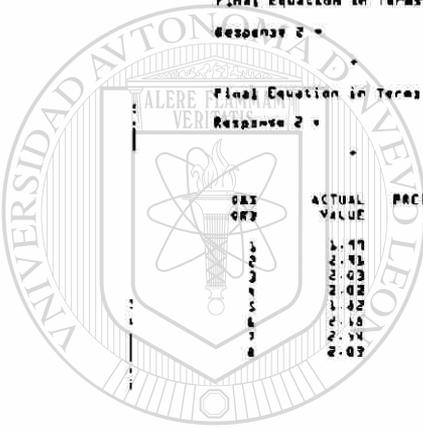
FACTOR	COEFFICIENT ESTIMATE	DF	STANDARD ERROR	T FOR HO COEFFICIENT=0	PROB > T
INTERCEPT	2.393375	1	0.134432		
1	0.024875	1	0.134432	0.26	0.8066

Final Equation in Terms of Coded Factors

Response 2 =
 $2.393375 + 0.024875 * A$

Final Equation in Terms of Uncoded Factors

Response 2 =
 $1.982125 + 0.000349 * \text{agitacion}$

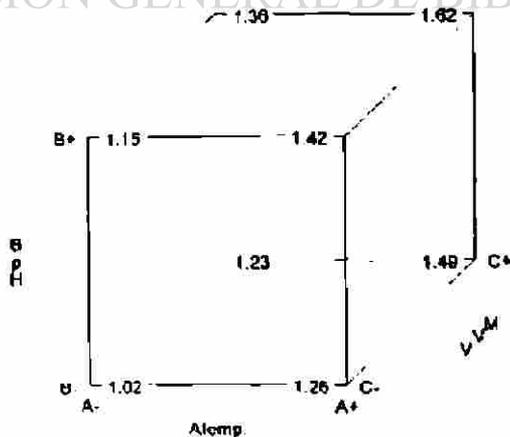


RUN ORO	ACTUAL VALUE	PREDICTED VALUE	RESIDUAL	LEVER	STUDENT RESID	COOK'S DIST	OUTLIER T VALUE
1	1.17	2.23	-0.492	0.250	-0.675	0.065	-0.162
2	2.43	2.23	0.447	0.250	2.055	0.704	3.446
3	2.03	2.16	-0.124	0.250	-0.373	0.023	-0.394
4	2.02	2.16	-0.140	0.250	-0.420	0.024	-0.370
5	1.42	2.23	-0.406	0.250	-1.236	0.246	-1.278
6	2.18	2.23	-0.044	0.250	-0.144	0.003	-0.122
7	2.34	2.16	0.166	0.250	0.160	0.024	0.202
8	2.07	2.16	-0.123	0.250	-0.367	0.022	-0.334

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DESIGN-EASE Analysis
 Predicted Response2 - 2

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



T-Test

Group Statistics

	TREATAME	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
CRECT52	HPPR1	4	85.0000	3.7733	2.8668
	CONTROL	8	72.0000	10.8645	4.8990

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
CRECT52	Equal variances assumed	34.1	.976	2.129	7	.071	13.0000	8.1062	-1.4368	27.4368
	Equal variances not assumed			2.268	6.254	.081	13.0000	8.6862	-1.7778	28.7778

Group Statistics

	TREATAME	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
CRECT54	HPPR1	4	98.0000	5.7735	2.8668
	CONTROL	8	92.0000	6.3695	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
CRECT54	Equal variances assumed	4.06	.046	807.	7	.363	3.0000	4.8475	-8.8472	14.8472
	Equal variances not assumed			835	6.915	.546	3.0000	4.7288	-8.2083	14.2083

T-Test

Group Statistics

	TREATAME	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
CRECT14	HPPR1	4	21.4575	8.1488	4.0743
	CONTROL	5	21.7600	16.6293	6.5408

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
CRECT14	Equal variances assumed	.834	.366	1.184	7	.275	9.7635	8.2345	-8.7181	28.2251
	Equal variances not assumed			1.208	6.116	.258	9.7335	7.7058	-8.8064	28.3151

Group Statistics

	TREATAME	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
CRECT28	HPPR1	4	63.9375	22.6267	11.3133
	CONTROL	8	44.3500	24.2297	18.0341

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
CRECT28	Equal variances assumed	.017	.898	975	7	.363	15.4015	15.8003	-25.8803	55.0783
	Equal variances not assumed			983	8.781	.359	15.4015	15.6843	-21.9054	52.7085

T-Test

Group Statistics

TRATAMIE	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
PRECAT4 HPPAT	4	2.2323	.8108	.4034
CONTROL	5	13.5100	37.4431	13.2728

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	
									Lower	Upper
PRECAT4	Equal variances assumed	5.222	.068	-.810	7	.445	-11.2775	13.9207	-44.1948	21.6468
	Equal variances not assumed			-.815	4.809	.410	-11.2775	12.2798	-45.3418	22.7869

Group Statistics

TRATAMIE	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
PRECAT2 HPPAT	4	2.0775	9.713	4.870
CONTROL	5	2.0840	1.2080	0.194

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	
									Lower	Upper
PRECAT2	Equal variances assumed	.044	.833	.045	7	.965	3.350E-02	7.463	-1.7312	1.7882
	Equal variances not assumed			.048	4.908	.965	3.350E-02	7.287	-1.6854	1.7314

T-Test

Group Statistics

TRATAMIE	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
PRECON14 HPPAT	4	4.025	1.709	0.847E-02
CONTROL	5	19.10	6.082E-02	3.873E-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	
									Lower	Upper
PRECON14	Equal variances assumed	10.182	.013	2.448	7	.044	2128	8.889E-02	7.082E-03	4184
	Equal variances not assumed			2.267	4.228	.082	2128	8.345E-02	4.24E-02	4878

Group Statistics

TRATAMIE	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
PRECON2 HPPAT	4	7.125	2584	294
CONTROL	5	4860	2944	3.158E-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	
									Lower	Upper
PRECON2	Equal variances assumed	1.034	.341	1.401	7	.151	2488	1838	1175	8105
	Equal variances not assumed			1.585	3.884	.174	2488	1583	-1488	8398

T-Test

Group Statistics

	TRATAMIE	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
CREINC14	HPPR1	4	.1800	4.690E-02	2.345E-02
	CONTROL	5	.1202	7.998E-02	3.577E-02

Independent Samples Test

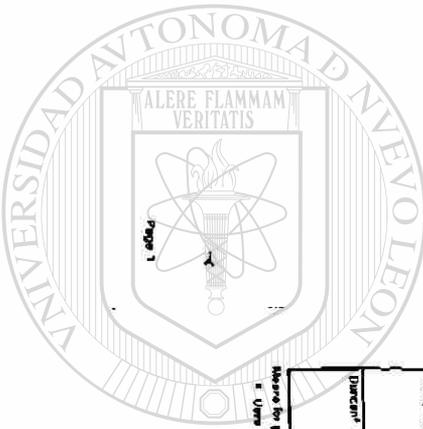
	Levene's Test for Equality of Variances	F	Sig.	t-Test for Equality of Means						
				t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
CREINC14	Equal variances assumed	1.011	.348	1.315	7	.230	5.980E-02	4.549E-02	-4.78E-02	.1674
	Equal variances not assumed			1.398	6.562	.207	5.980E-02	4.277E-02	-4.27E-02	.1623

Group Statistics

	TRATAMIE	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
CREINC28	HPPR1	4	.3700	.1265	6.325E-02
	CONTROL	5	.2700	.1351	6.042E-02

Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances	F	Sig.	t-Test for Equality of Means						
				t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
CREINC28	Equal variances assumed	.044	.840	1.134	7	.294	1.000E-01	8.820E-02	-.1086	.3096
	Equal variances not assumed			1.143	6.755	.292	1.000E-01	8.746E-02	-.1084	.3084



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
 DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

FIGURA 1

Descripción

Muestra	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
PHASE A	4	65.000	7.0000	3.5000	61.5014	107.4986	60.00	100.00
PHASE B	4	68.000	7.0000	3.5000	64.5014	108.4986	60.00	100.00
TOTAL	12	66.500	7.2000	2.0011	64.5043	98.4957	60.00	100.00

Test of Homogeneity of Variances

Source	df	SS	MS	F	Sig.
Between Groups	1	.500	.500	.000	.983
Within Groups	9	441.000	49.000		
Total	10	441.500			

ANOVA

FIGURA 2

Between Groups	(Corrected) Total	Corrected Deviation	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	1	1	53.333	2	26.667	7.078	.011
2	2	2	50.000	1	50.000	13.889	.001
3	3	3	47.667	1	47.667	13.215	.002
4	4	4	44.000	1	44.000	12.222	.003
Total	10	10	195.000	11			

FIGURA 3

Treatment	N	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
CONTROL	4	80.000	1	80.000	11.111	.004
PHASE A	4	80.000	1	80.000	11.111	.004
PHASE B	4	80.000	1	80.000	11.111	.004
Total	12	240.000	11			

Mean for groups in homogeneous subsets are displayed
 a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000

Gravimetry

Descripción

Muestra	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
PHASE A	4	63.000	14.0000	7.0000	56.0014	113.9986	40.00	100.00
PHASE B	4	68.000	14.0000	7.0000	61.0014	115.9986	40.00	100.00
TOTAL	12	65.500	14.1433	4.0357	61.4643	109.5357	40.00	100.00

Test of Homogeneity of Variances

Source	df	SS	MS	F	Sig.
Between Groups	1	1.000	1.000	.000	.983
Within Groups	9	132.000	14.667		
Total	10	133.000			

ANOVA

FIGURA 4

Between Groups	(Corrected) Total	Corrected Deviation	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	1	1	22.500	2	11.250	1.67	.203
2	2	2	24.500	1	24.500	3.57	.068
3	3	3	18.500	1	18.500	2.71	.113
4	4	4	17.500	1	17.500	2.57	.118
Total	10	10	83.000	11			

FIGURA 5

Treatment	N	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
CONTROL	4	80.000	1	80.000	11.111	.004
PHASE A	4	80.000	1	80.000	11.111	.004
PHASE B	4	80.000	1	80.000	11.111	.004
Total	12	240.000	11			

Mean for groups in homogeneous subsets are displayed
 a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000

ORDWAY

Des: Andrew

FIG 1C14

	M	Mean	Sum	Deviation	Std Error	95% Confidence Interval			
						Lower Bound	Upper Bound	Lower Bound	Upper Bound
PHASE1A	4	28.2500	2.5373	22.0827	26.4813	73.19	28.59	26.59	73.19
PHASE1	4	23.8013	0.7241	19.2910	24.8020	18.02	30.21	18.02	30.21
CONTROL	4	24.9650	4.9443	27.0238	42.8561	29.05	41.73	29.05	41.73
TOTAL	12	28.3725	5.5518	33.8778	33.7250	18.02	41.73	18.02	41.73

Test of Homogeneity of Variances

FIG 1C14

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.599	2	9	.212

ANOVA

FIG 1C14

Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2	72.428	4.059	.032
Within Groups	17	10.426	2.785	.115
Total	19	118.854	5.850	.037

FIG 1C14

TREATMENT	N	Sum of Squares	df	Mean Square
PHASE1A	4	23.8000	2	11.9000
PHASE1	4	24.9650	2	12.4825
CONTROL	4	29.2500	2	14.6250

Means for groups in homogeneous subsets are displayed
a. Uses harmonic mean Sample Size = 4.000

ORDWAY

Des: Andrew

FIG 1C18

	M	Mean	Sum	Deviation	Std Error	95% Confidence Interval			
						Lower Bound	Upper Bound	Lower Bound	Upper Bound
PHASE1A	4	33.0813	3.7307	1.8964	47.1512	19.2435	83.92	58.92	19.2435
PHASE1	4	23.8025	1.8745	5.24171	34.5880	42.7982	32.14	59.89	42.7982
CONTROL	4	11.9075	9.8209	4.7824	59.8283	61.1487	59.89	62.01	61.1487
TOTAL	12	22.9375	18.2987	3.7472	61.2984	64.5380	30.14	62.01	61.1487

Test of Homogeneity of Variances

FIG 1C18

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.237	2	9	.603

ANOVA

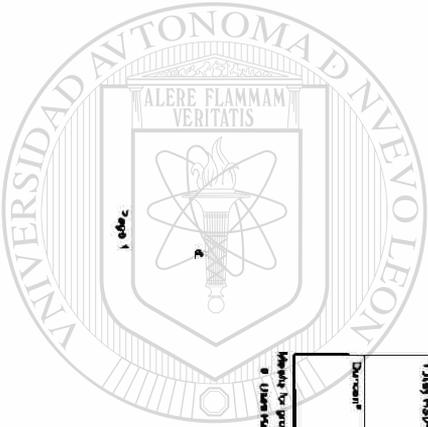
FIG 1C18

Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2	74.8171	17.771	.001
Within Groups	17	7.3684	8.809	.017
Total	19	82.1855	26.580	.001

FIG 1C18

TREATMENT	N	Sum of Squares	df	Mean Square
PHASE1A	4	33.0813	2	16.5406
PHASE1	4	1.8745	2	.9372
CONTROL	4	13.9625	2	6.9812

Means for groups in homogeneous subsets are displayed
a. Uses harmonic mean Sample Size = 4.000



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

OSWBY

PIOTC1A1

Descriptives

PROCTC1A1	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval			Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound	Mean		
CONTROL	4	3.8450	1.0331	3.106	2.2011	6.3648	2.84	4.83	
PIOTC1A1	4	3.0950	0.531	2.0449	1.2482	2.747	2.47	3.78	
Total	8	3.4700	.7200	3.0577	2.4597	4.5139	2.72	5.16	

Test of Homogeneity of Variances

PIOTC1A1

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
4.188	2	6	.190

ANOVA

Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.811	1.011	1.24	.304
Within Groups	481	1.011	4.72	.499
Total	10.243			

PIOTC1A2

TREATY	N	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
CONTROL	4	3.0850	3	1.028	1.24	.304
PIOTC1A2	4	3.0450	3	1.015	1.24	.304
Total	8	6.1300	7			

Levene's Test for Homogeneity of Variance: a. R Squared = .100 (Sig. = .428)

OSWBY

PIOTC2A

Descriptives

PROCTC2A	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval			Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound	Mean		
CONTROL	4	6.7175	2.6826	1.3022	2.688	8.8016	2.83	9.46	
PIOTC2A	4	3.2625	3.187	2.488	1.2008	5.3242	2.83	9.46	
Total	8	4.9900	3.4319	3.0235	2.3318	7.6514	2.83	9.46	

Test of Homogeneity of Variances

PIOTC2A

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
4.188	2	6	.190

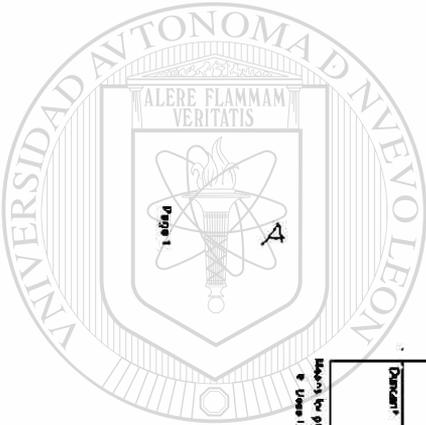
ANOVA

Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	18.201	7.600	1.80	.022
Within Groups	484	1.010	4.72	.499
Total	502.201			

PIOTC2B

TREATY	N	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
CONTROL	4	3.0225	3	1.007	1.24	.304
PIOTC2B	4	3.1125	3	1.037	1.24	.304
Total	8	6.1350	7			

Levene's Test for Homogeneity of Variance: a. R Squared = .100 (Sig. = .428)



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Drumway

Descriptive

PROCCO#2	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval				Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound	Lower Bound	Upper Bound		
PROCCO#2	4	5.1725	.8070	1.535	4.8081	5.8369	4.1768	5.468	4.176	5.468
PROCCO#2	4	5.1725	.8070	1.535	4.8081	5.8369	4.1768	5.468	4.176	5.468
PROCCO#2	4	5.1725	.8070	1.535	4.8081	5.8369	4.1768	5.468	4.176	5.468
PROCCO#2	4	5.1725	.8070	1.535	4.8081	5.8369	4.1768	5.468	4.176	5.468
Total	12	5.1725	.8070	1.535	4.8081	5.8369	4.1768	5.468	4.176	5.468

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3.842	3	9	.791

ANOVA

Source	(Corrected)	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	Linear	102	1	102	3.842	.071
Within Groups	Linear	1119	9	124.333		
Total		1221	10			

PROCCO#1

TREATMENT	N	Sum of Squares		df	Mean Square	F	Sig.
		Between Groups	Within Groups				
PROCCO#1	4	4.8325	2.720	1	1.206	0.343	
PROCCO#1	4	5.1725	2.720	1	1.206	0.343	
PROCCO#1	4	5.1725	2.720	1	1.206	0.343	
PROCCO#1	4	5.1725	2.720	1	1.206	0.343	
Total	16	20.35	12				

Approx. the groups in homogeneous subsets are displayed
a. Value is significant. Mean Sample Size = 4.000

Drumway

Descriptive

PROCCO#4	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval				Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound	Lower Bound	Upper Bound		
PROCCO#4	4	2.4175	1.154	.577	1.740	3.095	1.140	2.695	1.140	3.095
PROCCO#4	4	2.4175	1.154	.577	1.740	3.095	1.140	2.695	1.140	3.095
PROCCO#4	4	2.4175	1.154	.577	1.740	3.095	1.140	2.695	1.140	3.095
PROCCO#4	4	2.4175	1.154	.577	1.740	3.095	1.140	2.695	1.140	3.095
Total	12	2.4175	1.154	.577	1.740	3.095	1.140	2.695	1.140	3.095

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.785	3	9	.201

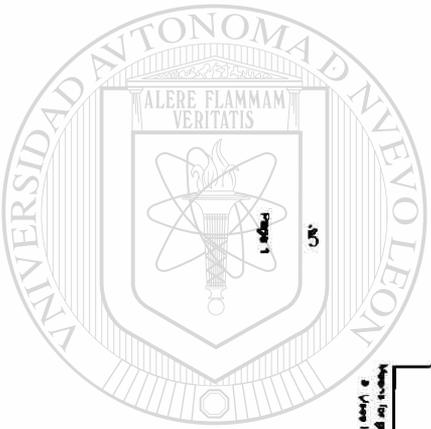
ANOVA

Source	(Corrected)	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	Linear	1.02	1	1.02	0.343	0.561
Within Groups	Linear	11.19	9	1.243		
Total		12.21	10			

PROCCO#1

TREATMENT	N	Sum of Squares		df	Mean Square	F	Sig.
		Between Groups	Within Groups				
PROCCO#1	4	2.4175	1.425	1	0.606	0.443	
PROCCO#1	4	2.4175	1.425	1	0.606	0.443	
PROCCO#1	4	2.4175	1.425	1	0.606	0.443	
PROCCO#1	4	2.4175	1.425	1	0.606	0.443	
Total	16	9.67	12				

Approx. the groups in homogeneous subsets are displayed
a. Value is significant. Mean Sample Size = 4.000



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Oneway

Descriptives

TRATAMIENTO	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
PRAFEFA	4	13750	1343	6726.02	11803	15815	122	154
HPPEFI	4	8150	3384	1682	3797	14503	54	130
CONTROL	4	17950	2415	1060	14458	21133	150	198
Total	12	12617	4316	1293	10524	15179	58	185

Test of Homogeneity of Variances

PRINC28

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3.172	2	9	.001

ANOVA

Between Groups	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Total	1560	2	773	13.172	.002
Within Groups	360	1	.360	5.987	.037
Total	1197	1	1.187	20.347	.001
Corrected Total	330	9	3.667		
Within Groups	2973	11			

PRINC28

TRATAMIENTO	N	Sum of Squares		
		1	2	3
PRAFEFA	4	9150	13750	
HPPEFI	4	13750	17950	
CONTROL	4	839	835	
Corrected Total		8150	13750	17950
Total		1000	1000	1000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
 a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

Oneway

Descriptives

TRATAMIENTO	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
PRAFEFA	4	6475	2043	1022	3233	8772	45	87
HPPEFI	4	6525	2065	1043	3207	9843	45	87
CONTROL	4	8725	1834	6185.02	8125	11325	71	105
Total	12	7242	2092	5847.02	5311	8553	45	105

Test of Homogeneity of Variances

PRINC14

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.128	2	9	.385

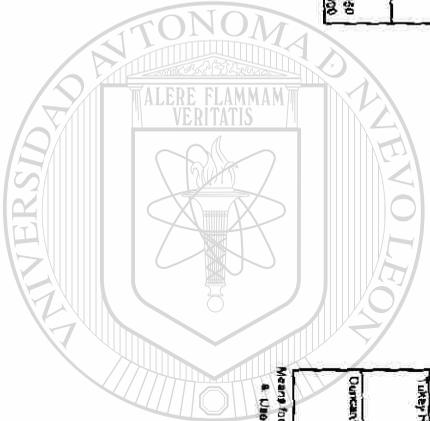
ANOVA

Between Groups	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Total	132	2	66.00	1.770	.225
Within Groups	101	1	101	2.713	.134
Total	3092.02	1	3092.02	826	.387
Corrected Total	316	9	35.111		
Within Groups	498	11			

PRINC14

TRATAMIENTO	N	Sum of Squares		
		1	2	3
PRAFEFA	4	6475	6475	
HPPEFI	4	6525	6525	
CONTROL	4	8725	8725	
Corrected Total		6475	6475	278
Total		5335	5335	8725
Corrected Total		149		

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
 a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.



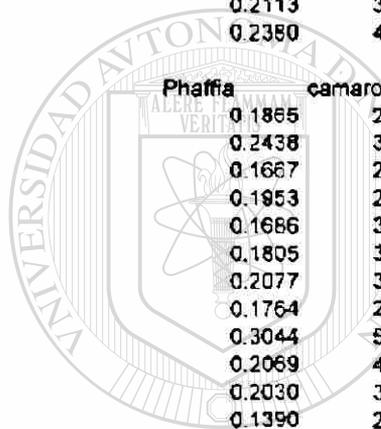
Hoja1

HPPR1 H	camaron E	R Hpsomatica	color Lab
0.1918	3 6578	5 24359	97.608
0.1989	3 2939	6 03843	93.827
0.1674	3 1870	5 25259	65.502
0.1954	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	

Phaffa	camaron E	R Hpsomatica	color Lab
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 7513	

Control	camaron E	R Hpsomatica	color Lab
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	93.15
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 2613	
0.1708	4 2651	3 9859	
0.1360	2 5412	5 3518	
0.1173	2 4070	4 8733	

control cont 85.66
125.289
1781.846
261.657



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



ontrol

2	-2.68	-9.44	2.61	-9.59	-2.08	10.18	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
5	-0.07	-5.49	-3.2	-4.95	-2.37	6.35	113.893
	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	0.6	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	-0.67	-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	-0.96	-1.55	-3.42	3.88	93.627
	1.87	-3.16	-1.65	-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	
4	-2.25	-2.41	-4.82	-3.27	0.69	5.86	125.289
	-2.59	-2.9	-1.67	-3.81	0.78	4.23	
5	-5.19	-3.84	-10.3	-5.82	2.8	12.15	171.846
	-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	Unweighted	.136	1	.136	.267	.608
		Weighted	.173	1	.173	.341	.563
		Deviation	1.123	1	1.123	2.209	.146
Within Groups			18.306	35	.508		
Total			19.602	38			

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

RHP

		N	Subset for alpha = .05
			1
Tukey HSD ^{a,b}	CONTROL	13	5.4400
	HPPR1	12	5.7278
	PHAFFIA	14	5.8729
	Sig.		.283
Duncan ^{a,b}	CONTROL	13	5.4400
	HPPR1	12	5.7278
	PHAFFIA	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	78.3083	35.4677	28.4677	226.4353	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	281.66
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	11549.621	2	5774.761	1.635	.228
Within Groups			52989.255	15	3532.617		
Total			69409.618	18			

COLORLAB

		N	Subset for alpha = .05
Tukey HSD ^{a,b}	CONTROL	5	77.8760
	HPPR1	5	126.9620
	PHAFFIA	5	131.4440
	C CONTROL	4	161.1150
	Sig.		.183
Duncan ^{a,b}	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

RESULTADOS DE DIGESTIBILIDAD

Dieta

Phaffia	% Cromo dieta	% Cromo en heces	% Proteina heces	% Proteina dieta	% D.P.D	MEDIA	desvest	% 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	6.889	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		
CONTROL										
5A	1.000	3.234	24.875	31.442	75.537	85.714	5.515	69.079	81.471	5.878
5B	1.000	4.518	23.884	31.442	83.187			77.865		
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	18.746	31.442	92.500			87.421		
8B	1.000	7.888	18.959	31.442	92.356			87.323		
HPPR										
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		

Onweby

DMS

Descriptive

	N	Mean	Std. Deviation	95% Confidence Interval					Minimum	Maximum
				Sum of Squares	Lower Bound	Upper Bound	Lower Bound	Upper Bound		
HPPRT1	8	43.2450	2.3528	1.5051	80.3323	65.7047	79.14	82.27		
CONROL	8	45.25	2.4943	7.0053	78.5316	66.3836	69.01	87.42		
PIAFEFIA	8	47.1843	2.2428	7.0053	80.2384	84.1011	79.40	86.69		
Total	24	82.2248	3.9720	81.008	81.4773	81.9318	69.01	86.27		

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.507	2	21	.242

DMS

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	124.112	2	62.056	6.113	.011
Within Groups	17.031	21	.811	7.108	.390
Total	141.143	23			

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a. Using harmonic Mean Sample Size = 8.000

ANOVA

Between Groups	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
TRATAMIE	10.040	2	5.020	2.78	.072
CONROL	3.099	1	3.099	1.68	.207
PIAFEFIA	8.861	1	8.861	4.93	.037
Total	21.999	23			

Onweby

DP

Descriptive

	N	Mean	Std. Deviation	95% Confidence Interval					Minimum	Maximum
				Sum of Squares	Lower Bound	Upper Bound	Lower Bound	Upper Bound		
HPPRT1	8	39.8412	2.1124	38.0000	41.6824	38.1178	38.07	44.20		
CONROL	8	36.4126	2.1184	38.0000	34.7462	38.0802	34.27	40.42		
PIAFEFIA	8	38.8737	2.5171	38.0000	41.0813	40.2862	37.38	42.50		
Total	24	37.8551	3.1589	38.0000	41.8170	38.5122	35.84	44.20		

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.507	2	21	.218

ANOVA

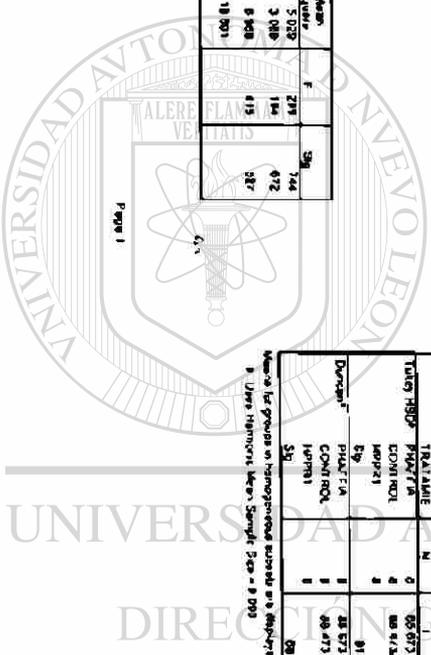
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	124.112	2	62.056	6.113	.011
Within Groups	17.031	21	.811	7.108	.390
Total	141.143	23			

DP

Between Groups	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
TRATAMIE	65.6731	2	32.8365	3.113	.051
CONROL	10.4731	1	10.4731	1.013	.325
PIAFEFIA	48.0269	1	48.0269	4.613	.041
Total	124.163	23			

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a. Using Harmonic Mean Sample Size = 8.000

DP



BIOENSAYO · ACTIVIDAD INMUNOESTIMULANTE

acuario	no.	dieta	dieta	no.	x O	n7	x7	incp7	food7	cons 7	tc7	tca7	sob7
A1	1	Control	1	10	0.46	9	0.88	0.43	5.04	0.56	93.23	1.32	90
A9	7	Control	1	10	0.46	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	0.46	10	0.77	0.32	5.15	0.52	69.37	1.62	100
D4	28	Control	1	10	0.46	10	0.76	0.30	5.13	0.51	66.08	1.70	100
D6	30	Control	1	10	0.46	9	0.79	0.32	4.93	0.55	70.27	1.63	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	69.48	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	82.14	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	65.45	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	0.46	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

BIENSAYO - ACTIVIDAD INMUNOESTIMULANTE

x14	incp14	n14	food14	cons14	tc14	tca14	sob14	n21	x21	inp21	food21	cons21
1.35	0.90	9	15.3	1.81	198.33	2.02	90	9	1.62	1.17	25.200	2.80
1.42	0.96	8	20.6	2.57	209.24	2.67	80	8	1.68	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	25.500	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	21.565	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		1.76	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	1.69	1.23	24.770	2.75
1.08	0.63	10	15.0	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	2.16	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	18.3	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	178.56	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	24.93	3.12
0.06137	0.06		0.341	0.2532	12.8521789	0.3	13.09		0.1344	0.13194	0.4467082	0.7868

BIENSAYO - 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	2.58	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	0.68136	17.728		0.2222

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
1.82	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	423.350
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
1.86	46.34	5.15	428.265	2.64	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	2.51	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	5.68	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	5.56	488.937
1.76	42.495	7.08	386.111	4.02	60	5	2.53	2.08	53.055	10.61	455.702
1.82	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	23.39
3.28	80	6	3.05	2.59	69.550	11.59	567.40	4.47	60	18.30
3.16	70	7	2.84	2.36	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	16.61
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
3.48	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	54.17	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	60	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

BICM148

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
				Lower Bound	Upper Bound		
HPPR1	3	20.0487	4.0770	8.8197	30.7187	15.37	22.86
CONTROL	8	18.0488	4.6674	14.1487	21.8904	9.66	23.39
PHAF1A	4	24.2350	2.2450	20.8527	27.7973	21.82	28.85
Saccha	8	19.8313	1.5837	16.0983	23.5782	12.86	28.00
glicem	3	14.8075	5.8461	10.0201	19.7945	7.57	24.38
Total	31	18.8384	5.2814	16.7511	20.9256	7.57	26.00

BICM148

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.990	4	26	.382

ANOVA

Between Groups	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Linear	258.234	4	64.659	2.839	.043
Term	34.845	1	34.845	1.512	.224
Weighted	52.094	1	52.094	2.333	.139
Deviation	204.140	3	68.047	3.047	.048
Within Groups	550.098	26	22.330		
Total	808.803	30			

BICM148

Category	N	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
CONTROL	8	14.8075	1	14.8075	1.633	.216
Saccha	8	18.8313	1	18.8313	2.141	.157
HPPR1	3	20.0487	1	20.0487	2.281	.121
PHAF1A	4	24.2350	1	24.2350	2.747	.101
glicem	3	14.8075	1	14.8075	1.633	.216
CONTROL	8	18.0488	1	18.0488	2.041	.163
Saccha	8	19.8313	1	19.8313	2.241	.141
HPPR1	3	20.0487	1	20.0487	2.281	.121
PHAF1A	4	24.2350	1	24.2350	2.747	.101
Total	31	119	1	119	13.333	.003

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.

PES048

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
				Lower Bound	Upper Bound		
HPPR1	3	2.6500	3.422	1.6298	3.5301	2.43	3.07
CONTROL	8	3.1700	4.055	2.8310	3.5090	2.64	4.05
PHAF1A	4	3.1500	3.803	2.5446	3.7551	2.73	3.61
Saccha	8	2.7775	2.801	2.5435	3.0117	2.40	3.25
glicem	3	3.1000	3.182	2.6505	3.5495	2.35	3.68
Total	31	3.0008	4.283	2.8495	3.1577	2.35	4.05

PES048

ANOVA

Between Groups	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Linear	1.104	4	.276	1.633	.186
Term	9.817E-02	1	9.817E-02	.569	.438
Weighted	2.458E-03	1	2.458E-03	.015	.905
Deviation	1.102	3	.367	2.173	.119
Within Groups	4.380	26	.168		
Total	5.580	30			

PES048

Category	N	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
CONTROL	8	2.7775	1	2.7775	16.33	.001
Saccha	8	3.1800	1	3.1800	19.26	.000
HPPR1	3	3.1500	1	3.1500	19.26	.000
PHAF1A	4	3.1700	1	3.1700	19.26	.000
glicem	3	2.6900	1	2.6900	16.33	.001
CONTROL	8	2.7775	1	2.7775	16.33	.001
Saccha	8	3.1800	1	3.1800	19.26	.000
HPPR1	3	3.1500	1	3.1500	19.26	.000
PHAF1A	4	3.1700	1	3.1700	19.26	.000
glicem	3	2.6900	1	2.6900	16.33	.001
CONTROL	8	2.7775	1	2.7775	16.33	.001
Saccha	8	3.1800	1	3.1800	19.26	.000
HPPR1	3	3.1500	1	3.1500	19.26	.000
PHAF1A	4	3.1700	1	3.1700	19.26	.000
glicem	3	2.6900	1	2.6900	16.33	.001
CONTROL	8	2.7775	1	2.7775	16.33	.001
Saccha	8	3.1800	1	3.1800	19.26	.000
HPPR1	3	3.1500	1	3.1500	19.26	.000
PHAF1A	4	3.1700	1	3.1700	19.26	.000
glicem	3	2.6900	1	2.6900	16.33	.001
CONTROL	8	2.7775	1	2.7775	16.33	.001
Saccha	8	3.1800	1	3.1800	19.26	.000
HPPR1	3	3.1500	1	3.1500	19.26	.000
PHAF1A	4	3.1700	1	3.1700	19.26	.000
glicem	3	2.6900	1	2.6900	16.33	.001
CONTROL	8	2.7775	1	2.7775	16.33	.001
Saccha	8	3.1800	1	3.1800	19.26	.000
HPPR1	3	3.1500	1	3.1500	19.26	.000
PHAF1A	4	3.1700	1	3.1700	19.26	.000
glicem	3	2.6900	1	2.6900	16.33	.001
CONTROL	8	2.7775	1	2.7775	16.33	.001
Saccha	8	3.1800	1	3.1800	19.26	.000
HPPR1	3	3.1500	1	3.1500	19.26	.000
PHAF1A	4	3.1700	1	3.1700	19.26	.000
glicem	3	2.6900	1	2.6900	16.33	.001
CONTROL	8	2.7775	1	2.7775	16.33	.001
Saccha	8	3.1800	1	3.1800	19.26	.000
HPPR1	3	3.1500	1	3.1500	19.26	.000
PHAF1A	4	3.1700	1	3.1700	19.26	.000
glicem	3	2.6900	1	2.6900	16.33	.001
CONTROL	8	2.7775	1	2.7775	16.33	.001
Saccha	8	3.1800	1	3.1800	19.26	.000
HPPR1	3	3.1500	1	3.1500	19.26	.000
PHAF1A	4	3.1700	1	3.1700	19.26	.000
glicem	3	2.6900	1	2.6900	16.33	.001
CONTROL	8	2.7775	1	2.7775	16.33	.001
Saccha	8	3.1800	1	3.1800	19.26	.000
HPPR1	3	3.1500	1	3.1500	19.26	.000
PHAF1A	4	3.1700	1	3.1700	19.26	.000
glicem	3	2.6900	1	2.6900	16.33	.001
CONTROL	8	2.7775	1	2.7775	16.33	.001
Saccha	8	3.1800	1	3.1800	19.26	.000
HPPR1	3	3.1500	1	3.1500	19.26	.000
PHAF1A	4	3.1700	1	3.1700	19.26	.000
glicem	3	2.6900	1	2.6900	16.33	.001
CONTROL	8	2.7775	1	2.7775	16.33	.001
Saccha	8	3.1800	1	3.1800	19.26	.000
HPPR1	3	3.1500	1	3.1500	19.26	.000
PHAF1A	4	3.1700	1	3.1700	19.26	.000
glicem	3	2.6900	1	2.6900	16.33	.001
CONTROL	8	2.7775	1	2.7775	16.33	.001
Saccha	8	3.1800	1	3.1800	19.26	.000
HPPR1	3	3.1500	1	3.1500	19.26	.000
PHAF1A	4	3.1700	1	3.1700	19.26	.000
glicem	3	2.6900	1	2.6900	16.33	.001
CONTROL	8	2.7775	1	2.7775	16.33	.001
Saccha	8	3.1800	1	3.1800	19.26	.000
HPPR1	3	3.1500	1	3.1500	19.26	.000
PHAF1A	4	3.1700	1	3.1700	19.26	.000
glicem	3	2.6900	1	2.6900	16.33	.001
CONTROL	8	2.7775	1	2.7775	16.33	.001
Saccha	8	3.1800	1	3.1800	19.26	.000
HPPR1	3	3.1500	1	3.1500	19.26	.000
PHAF1A	4	3.1700	1	3.1700	19.26	.000
glicem	3	2.6900	1	2.6900	16.33	.001
CONTROL	8	2.7775	1	2.7775	16.33	.001
Saccha	8	3.1800	1	3.1800	19.26	.000
HPPR1	3	3.1500	1	3.1500	19.26	.000
PHAF1A	4	3.1700	1	3.1700	19.26	.000
glicem	3	2.6900	1	2.6900	16.33	.001
CONTROL	8	2.7775	1	2.7775	16.33	.001
Saccha	8	3.1800	1	3.1800	19.26	.000
HPPR1	3	3.1500	1	3.1500	19.26	.000
PHAF1A	4	3.1700	1	3.1700	19.26	.000
glicem	3	2.6900	1	2.6900	16.33	.001
CONTROL	8	2.7775	1	2.7775	16.33	.001
Saccha	8	3.1800	1	3.1800	19.26	.000
HPPR1	3	3.1500	1	3.1500	19.26	.000
PHAF1A	4	3.1700	1	3.1700	19.26	.000
glicem	3	2.6900	1	2.6900	16.33	.001
CONTROL	8	2.7775	1	2.7775	16.33	.001
Saccha	8	3.1800	1	3.1800	19.26	.000
HPPR1	3	3.1500	1	3.1500	19.26	.000
PHAF1A	4	3.1700	1	3.1700	19.26	.000
glicem	3	2.6900	1	2.6900	16.33	.001
CONTROL	8	2.7775	1	2.7775	16.33	.001
Saccha	8	3.1800	1	3.1800	19.26	.000
HPPR1	3	3.1500	1	3.1500	19.26	.000
PHAF1A	4	3.1700	1	3.1700	19.26	.000
glicem	3	2.6900	1	2.6900	16.33	.001
CONTROL	8	2.7775	1	2.7775	16.33	.001
Saccha	8	3.1800	1	3.1800	19.26	.000
HPPR1	3	3.1500	1	3.1500	19.26	.000
PHAF1A	4	3.1700	1	3.1700	19.26	.000
glicem	3	2.6900	1	2.6900	16.33	.001
CONTROL	8	2.7775	1	2.7775	16.33	.001
Saccha	8	3.1800	1	3.1800	19.26	.000
HPPR1	3	3.1500	1	3.1500	19.26	.000
PHAF1A	4	3.1700	1	3.1700	19.26	.000
glicem	3	2.6900	1	2.6900	16.33	.001
CONTROL	8	2.7775	1	2.7775	16.33	.001
Saccha	8	3.1800	1	3.1800	19.26	.000
HPPR1	3	3.1500	1	3.1500	19.26	.000
PHAF1A	4	3.1700	1	3		

Descriptives

TSP40	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
TSP40	31	16.9881	2.71640	1.3303	19.7980	13.3164	6.0000	26.0000
CONTROL	8	66.2500	15.0584	5.3243	43.1640	89.8420	30.0000	80.0000
PLANTIA	8	77.5000	8.5743	4.7871	62.7862	92.7348	70.0000	80.0000
Secueta	8	87.5000	13.3888	4.7848	76.7118	98.5901	50.0000	100.0000
Group	8	87.5000	15.5114	5.5987	74.2873	100.7127	30.0000	100.0000
Total	31	62.6904	18.8333	3.3707	55.1183	69.2429	30.0000	100.0000

Test of Homogeneity of Variances

TSP40	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
CONTROL	.871	4	26	.500
PLANTIA	.871	4	26	.500
Secueta	.871	4	26	.500
Group	.871	4	26	.500

ANOVA

Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4328.832	1082.208	6.656	.004
Within Groups	601.333	150.333	3.828	.043
Total	794.944	254.982	2.521	.015
Corrected Total	349.033	113.011	5.056	.001
Adjusted R Squared	384.367	120.864	2.246	.011
Total Variance	1070.344	34.527	3.1	

TSP40

TSP40	N	Sum of Squares		
		1	2	3
Between Groups	8	87.6300	18.2500	18.2500
CONTROL	8	86.2500	71.2500	71.2500
Secueta	8	71.2500	70.0000	70.0000
PLANTIA	8	77.5000	77.5000	77.5000
Group	8	114	118	118
Within Groups	8	67.0000	18.2500	71.2500
CONTROL	8	69.2500	71.2500	71.2500
Secueta	8	71.2500	70.0000	70.0000
PLANTIA	8	77.5000	77.5000	77.5000
Group	8	114	118	118
Total	31	338	422	538

Adjusted R Squared = .08

Adjusted R Squared = .08
 a. R Squared for groups in homogeneous subsets are displayed.
 b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error rates are not guaranteed.

Descriptives

TSP45	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
TSP45	31	4.2287	2.843	.5096	3.7144	5.0430	1.0000	10.0000
CONTROL	8	2.4518	1.609	.5385	1.9117	2.9921	1.0000	4.0000
PLANTIA	8	2.8960	2.014	.6982	2.1978	3.5942	1.0000	5.0000
Secueta	8	2.3225	1.9902	.6970	1.6255	3.0195	1.0000	4.0000
Group	8	2.4218	2.021	.6984	1.7234	3.1199	1.0000	4.0000
Total	31	4.4278	2.916	.5214	3.3863	5.4692	1.0000	10.0000

Test of Homogeneity of Variances

TSP45	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
CONTROL	.971	4	26	.440
PLANTIA	.971	4	26	.440
Secueta	.971	4	26	.440
Group	.971	4	26	.440

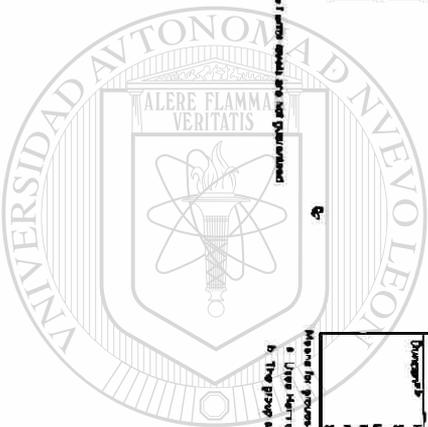
ANOVA

Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	500	125	1.375	.317
Within Groups	1.571E+02	3.928E+01	4.60	.008
Total	8.658E+04	2.793E+06	0.11	.917
Corrected Total	499	1.55	2.086	.125
Adjusted R Squared	2.084	7.839E+02	7.086	
Total Variance	7.584	24.464	2.1	

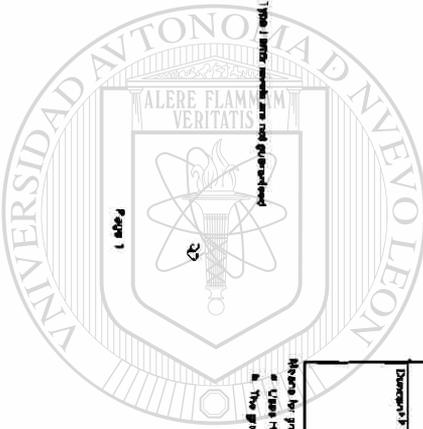
TSP45

TSP45	N	Sum of Squares		
		1	2	3
Between Groups	8	1.2267	1.3215	1.3215
CONTROL	8	1.2267	1.3215	1.3215
Secueta	8	1.2267	1.3215	1.3215
PLANTIA	8	1.2267	1.3215	1.3215
Group	8	1.2267	1.3215	1.3215
Within Groups	8	1.2267	1.3215	1.3215
CONTROL	8	1.2267	1.3215	1.3215
Secueta	8	1.2267	1.3215	1.3215
PLANTIA	8	1.2267	1.3215	1.3215
Group	8	1.2267	1.3215	1.3215
Total	31	2.4534	2.6430	2.6430

Adjusted R Squared = .017
 a. R Squared for groups in homogeneous subsets are displayed.
 b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error rates are not guaranteed.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
 DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
 DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TC448

Descripción

Descripción	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper		
HOPPERI	3	3 2587	0 252	0 1313	3 0004	3 516	3 111	3 516
CIENFUELA	4	3 2025	0 268	0 1313	2 7864	3 624	2 42	3 42
Sancti Spiritus	4	3 2025	0 268	0 1313	2 7864	3 624	2 42	3 42
Sancti Spiritus	4	3 2025	0 268	0 1313	2 7864	3 624	2 42	3 42
Sancti Spiritus	4	3 2025	0 268	0 1313	2 7864	3 624	2 42	3 42
Total	21	3 2284	0 2723	0 1313	2 8892	3 5673	2 50	3 571

ANOVA

TC448

Source	(Groupings)	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	Unweighted	16 722	4	4 175	1 604	213
Within Groups	Weighted	6 458	17	0 379	3 219	677
Total	Overall	23 180	21			

TC448

Group	Mean	Std. Deviation	Subst for
HOPPERI	3 2587	0 252	1
CIENFUELA	3 2025	0 268	2
Sancti Spiritus	3 2025	0 268	3
Sancti Spiritus	3 2025	0 268	4
Sancti Spiritus	3 2025	0 268	5
Total	3 2284	0 2723	6

ANOVA for groups in homogeneous ANOVA is displayed
 a. List of Homogeneous Means Summary Size = 6 217
 b. The group lists are unsorted. The harmonic means of the groups listed are used. Type 1 error levels are not guaranteed.

TC49

Descripción

Descripción	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper		
HOPPERI	3	104 5307	14 6542	43 2473	164 8141	138 22	57 16	57 16
CIENFUELA	4	115 6116	17 1616	51 0 6163	179 2082	139 29	101 44	101 44
Sancti Spiritus	4	107 4135	14 3723	42 0842	172 7508	139 32	88 41	88 41
Sancti Spiritus	4	107 4135	14 3723	42 0842	172 7508	139 32	88 41	88 41
Sancti Spiritus	4	107 4135	14 3723	42 0842	172 7508	139 32	88 41	88 41
Total	21	104 5307	14 6542	43 2473	164 8141	138 22	57 16	57 16

ANOVA

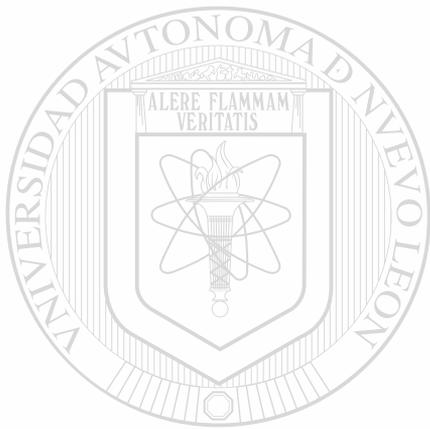
TC49

Source	(Groupings)	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	Unweighted	70645 310	4	17 661	148	3 09
Within Groups	Weighted	12349 985	17	726 467	603	444
Total	Overall	83045 295	21			

TC49

Group	Mean	Std. Deviation	Subst for
HOPPERI	104 5307	14 6542	1
CIENFUELA	115 6116	17 1616	2
Sancti Spiritus	107 4135	14 3723	3
Sancti Spiritus	107 4135	14 3723	4
Sancti Spiritus	107 4135	14 3723	5
Total	104 5307	14 6542	6

ANOVA for groups in homogeneous ANOVA is displayed
 a. List of Homogeneous Means Summary Size = 5 277
 b. The group lists are unsorted. The harmonic means of the groups listed are used. Type 1 error levels are not guaranteed.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



