



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS

CARRERA DE INGENIERÍA ZOOTÉCNICA

“CARACTERIZACIÓN FERMENTATIVA, BIOQUÍMICA Y MICROBIOLÓGICA DE
UN PREPARADO MICROBIANO NATIVO CON POTENCIAL USO EN
ANIMALES DOMÉSTICOS”

TRABAJO DE TITULACIÓN

Previa a la obtención del título de:

INGENIERA ZOOTECNISTA

AUTORA:

TAMIA ELIZABETH NOBOA ABDO

Riobamba – Ecuador

2015

Este Trabajo de Titulación fue aprobado por el siguiente Tribunal

Dr. César Antonio Camacho León.

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

PhD. Byron Leoncio Díaz Monroy.

DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Dra. M.C. Sonia Eliza Peñafiel Acosta.

ASESORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Riobamba, 18 de noviembre del 2015.

AGRADECIMIENTO

A la vida por darme tanto, a mis papis Patricito y Susi por sembrar en mi esa semilla para comprender que la vida es linda y siempre podemos hacer mejor las cosas por y para los demás, y para dejar este mundo un poquito mejor de como lo encontramos, por su amor, ternura y enseñanzas. A mis ñaños Linita por tu alegría y motivación y Santi por demostrarme que todo es posible, y por esas bellas personas que trajiste contigo Inti, Elliot y Narito.

A mi familia por ser la más genial y creer en mí, gracias Nonitos, Tia Sambita, y mi otra hermana de la vida Dani. Espero seguir caminando con ustedes el camino de vida, siempre juntos y felices.

A mi mejor amiga por siempre estar ahí conmigo Andrea Cabezas, y a mis amigos entrañables Andrés Mancheno, Carla Chauca, Rubén Peñafiel, Diego Pilco por todo su apoyo y los buenos momentos.

Al Ph.D. Byron Díaz por la apertura para realizar mi trabajo de titulación en el maravilloso mundo de los probióticos, a la Dra. M.C. Sonia Peñafiel por su asesoría, de igual forma al Ing. Rene Carvajal por todas las facilidades que me brindo en el laboratorio, y a todas las personas del LABIMA que me brindaron su apoyo y amistad.

A las personas que me tendieron la mano en la realización de esta tesis en la Facultad de Ciencias de la ESPOCH, B.Q.F. Diego Vinueza, Cristian Bravo, Dr. Carlos Pilamunga.

A todas las personas que han contribuido a mi formación profesional y personal a lo largo de mi vida, familiares, amigos, maestros, compañeros, etc.

Tamia Noboa

DEDICATORIA

A mi amada familia que es mi motor de motivación cada día, a la cual amo profundamente.

Tamia Noboa

CONTENIDO

	Pág.
Resumen	v
Abstract	vi
Lista de Cuadros	vii
Lista de Gráficos	viii
Lista de Anexos	ix
I. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
II. <u>REVISIÓN DE LITERATURA</u>	3
A. ALIMENTOS FUNCIONALES	3
B. LOS SIMBIÓTICOS	3
C. LOS PREBIÓTICOS	5
1. <u>Definición</u>	5
2. <u>Requisitos que deben cumplir las sustancias para ser prebióticos</u>	6
D. LOS PROBIÓTICOS	6
1. <u>Antecedentes de los probióticos</u>	7
2. <u>Propiedades de los probióticos</u>	7
a. Identificación de género, especie y cepa probiótica	8
b. Seguridad de los probióticos	8
(1) Estudios in vivo utilizando animales y humanos	9
(2) Viabilidad de las cepas declaradas en productos probióticos Comerciales	9
c. Etiquetado	9
3. <u>Propiedades de los probióticos en los animales</u>	10
a. Mecanismo de acción de los probióticos	11
b. Bacterias productoras de ácido láctico (BAL)	11
c. Producción de compuestos antibacterianos	12
d. Productos finales de la fermentación y la acidez intestinal	12
e. Antagonismo competitivo	12
4. <u>Beneficios de los probióticos en producción animal</u>	13
5. <u>Antibióticos vs. Probióticos</u>	14
6. <u>Uso de Probióticos como promotores de crecimiento</u>	15
7. <u>Riesgos en el uso de probióticos</u>	18
E. ÁCIDOS ORGÁNICOS	19
1. <u>Ácido láctico</u>	20

F. LEVADURAS	20
III. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	22
A. LOCALIZACIÓN DEL EXPERIMENTO	22
B. UNIDADES EXPERIMENTALES	22
C. MATERIALES Y EQUIPOS	23
a. Equipos de laboratorio	23
b. Reactivos	24
c. Materiales	24
D. TRATAMIENTOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL	25
E. MEDICIONES EXPERIMENTALES	26
a. <u>Evaluación fermentativa</u>	26
b. <u>Evaluación Bioquímica</u>	26
c. <u>Evaluación Microbiológica</u>	26
F. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	27
G. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	27
1. <u>Fase 1: Producción del Preparado Microbiano Nativo mediante fermentación líquida sumergida a escala de laboratorio</u>	27
2. <u>Fase 2: Dinámica de la fermentación para su evaluación fermentativa, bioquímica y microbiológica</u>	27
H. METODOLOGÍA DE EVALUACIÓN	29
1. EVALUACIÓN FERMENTATIVA	29
a. Determinación de Ácidos Orgánicos (Ácidos Láctico, Succínico, Propiónico, Butírico, Pirúvico y Acético) por el método de HPLC	29
b. Temperatura (°C)	31
c. Ph	31
d. Grados Brix: Cociente total de sacarosa (°Brix)	31
e. Densidad óptica por espectrofotometría	31
2. EVALUACIÓN BIOQUÍMICA	32
a. Nitrógeno total Kjehendal (%)	32
b. Nitrógeno Proteico y No Proteico	33
c. Enzimas proteasas Totales	33
d. Enzimas Amilasas Totales	34
3. EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA	35
a. Bacterias lácticas	35
b. Levaduras y Mohos	37
c. Bacterias Coliformes Totales	37

d.	Bacterias Aerobias Totales	38
e.	E. Coli	38
f.	Biomasa bacteriana	39
IV.	<u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	40
A.	CARACTERIZACION FERMENTATIVA DEL PREPARADO MICROBIANO NATIVO CON POTENCIAL USO EN ANIMALES DOMESTICOS	40
1.	<u>Ácidos Orgánicos</u>	40
2.	<u>Temperatura</u>	41
3.	<u>pH</u>	43
4.	<u>Grados Brix</u>	44
5.	<u>Densidad Óptica por espectrofotometría</u>	45
B.	CARACTERIZACION BIOQUIMICA DEL PREPARADO MICROBIANO NATIVO CON POTENCIAL USO EN ANIMALES DOMESTICOS	46
1.	<u>Nitrógeno Total</u>	46
2.	<u>Proteína (%)</u>	47
3.	<u>Enzimas proteasas Totales</u>	47
4.	<u>Enzimas Amilasas Totales</u>	47
C.	CARACTERIZACION MICROBIOLOGICA DEL MICROBIANO NATIVO CON POTENCIAL USO EN ANIMALES DOMESTICOS	48
1.	<u>Bacterias Acido Lácticas</u>	48
2.	<u>Levaduras y Mohos</u>	50
3.	<u>Coliformes Totales</u>	52
4.	<u>Aerobios Totales</u>	54
5.	<u>E coli</u>	55
6.	<u>Biomasa Bacteriana</u>	57
V.	<u>CONCLUSIONES</u>	58
VI.	<u>RECOMENDACIONES</u>	59
VII.	<u>LITERATURA CITADA</u>	60
	ANEXOS	73

RESUMEN

En los laboratorios de: Biotecnología y Microbiología Animal y de HPLC de la ESPOCH, se realizó la caracterización fermentativa, bioquímica y microbiológica de un preparado microbiano nativo para determinar su calidad y posibles propiedades probióticas. La primera fase consistió en una fermentación líquida sumergida en fermentadores rústicos de 10 L con cinco repeticiones, bajo esta formulación: jugo de caña 16 %, suero de leche 16 %, yogurt 1 %, urea 1 %, sal mineral 1 %, sulfato de amonio 0,2 % y agua 64,8 %. En la segunda fase se realizó un muestreo cronológico y dirigido a cada una de las repeticiones a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas de fermentación, para los análisis de laboratorio de cada uno de los indicadores. La fermentación fue de tipo aeróbica con producción de ácido láctico que se incrementó de 1,5% a 3,5 %, la temperatura promedio fue de 18,08°C, el pH descendió de 6,3 a 3,9, la densidad óptica por espectrofotometría fue de 26.02×10^9 UFC.ml⁻¹. Dentro de la evaluación bioquímica se encontraron valores promedio de Nitrógeno Total de 0,81 %, proteína 4,13 % y 68 UE.ml⁻¹ de enzimas proteasas. En la evaluación microbiológica se destacó la presencia de las bacterias ácido-lácticas y levaduras en $2,7 \times 10^7$ UFC.ml⁻¹ y $2,5 \times 10^7$ UFC.ml⁻¹ respectivamente. En base a los resultados, se recomienda el uso de este preparado en la alimentación de animales domésticos por sus posibles propiedades probióticas y realizar pruebas de campo en animales domésticos para su proyección comercial.

ABSTRACT

At the laboratories of Animal Biotechnology and Microbiology and HPLC, from ESPOCH, a fermenting, biochemical and microbiological characterization of a native microbial preparation was developed, in order to determine its quality and possible probiotic properties. The first phase was about a liquid fermentation sunk in rustic fermenters of 10 L with five repetitions based on this formulation: cane juice 16%, buttermilk 16%, yoghurt 1%, urea 1%, salt 1%, ammonium sulfate 0,2% and water 64,8%. On the second phase, it was done a chronological sampling and addressed to each one of the indicators. The fermentation was of aerobe type with production of lactic acid which raised from 1,5% to 3,5%, the average temperature was 18,08°C, pH decreased from 6,3 to 3,9 optical density for spectrophotometry was 26.02×10^9 CFU.ml⁻¹. Within the biochemical evaluation, it was found averages of Total Nitrogen of 0,81%, protein 4,13% and 68 UE.ml⁻¹ of protease enzymes. Regarding the microbiological evaluation, it was remarked the presence of lactic acid bacteria ad yeast in 2.7×10^7 CFU.ml⁻¹ and $2,5 \times 10^7$ CFU.ml⁻¹ respectively.

Based on the results, it is recommended the use of this preparation on domestic animals, feeding because of its possible probiotic properties and develop field tests on domestic animals for its trading.

LISTA DE CUADROS

N°		Pág.
1.	BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS USADAS COMO PROBIÓTICOS.	14
2.	CONDICIONES METEOROLÓGICAS ESPOCH.	22
3.	COMPOSICIÓN DEL PREPARADO MICROBIANO NATIVO.	25
4.	ESQUEMA DEL EXPERIMENTO.	25
5.	INDICADORES DETERMINADOS DURANTE LA EVALUACIÓN DE LA DINÁMICA DE LA FERMENTACIÓN EN LOS PREPARADOS MICROBIANOS.	28
6.	RESULTADOS DE LA TINCIÓN GRAM.	50

LISTA DE GRÁFICOS

N°		Pág.
1.	Evaluación de la Temperatura del preparado microbiano nativo con potencial uso en animales domésticos, durante diferentes periodos de tiempo.	42
2.	Evaluación del pH del preparado microbiano nativo con potencial uso en animales domésticos.	43
3.	Evaluación del Coeficiente de Sacarosa del preparado microbiano nativo con potencial uso en animales domésticos.	45
4.	Evaluación de las Bacterias Ácido lácticas del preparado microbiano nativo con potencial uso en animales domésticos.	49
5.	Evaluación de las Levaduras del preparado microbiano nativo con potencial uso en animales domésticos.	51
6.	Evaluación de los Coliformes totales del preparado microbiano nativo con potencial uso en animales domésticos.	53
7.	Evaluación de las Bacterias Aerobias Totales del preparado microbiano nativo con potencial uso en animales domésticos.	54
8.	Evaluación de <i>Escherichia coli</i> del preparado microbiano nativo con potencial uso en animales domésticos.	56

LISTA DE ANEXOS

N°

1. Resultado del análisis de los Ácidos Orgánicos.
2. Evaluación del contenido de ácido láctico cuantificado por HPLC (5.23 tiempo de retención) del PMN2 a las 96 horas.
3. Estadística descriptiva de la variable pH.
4. Estadística descriptiva de la variable Temperatura.
5. Estadística descriptiva de los Grados Brix.
6. Promedios de la Densidad óptica por espectrofotometría.
7. Estadística descriptiva de la evaluación de Bacterias Acido Lácticas.
8. Bacterias Ácido Lácticas Gram+ (Cocobacillus) encontradas en el PMN|
9. Estadística descriptiva de la evaluación de Coliformes Totales.
10. Estadística descriptiva de la evaluación de las Bacterias Aerobias.
11. Estadística descriptiva de la evaluación de *Escherichia coli*.
12. Resultado del análisis de los Ácidos Orgánicos.

I. INTRODUCCIÓN

En la producción animal es muy frecuente el uso de antibióticos como promotores de crecimiento, éstos fueron descubiertos a finales de 1940, cuando Stokstad y Jukes adicionaron residuos de clortetraciclina a la alimentación de pollos para facilitar la absorción de la vitamina B12, y generaron en ellos resultados importantes: ganancia en peso, alta resistencia a infecciones y una rápida conversión alimentaria, entre otras (Brezo, A.1999). Desde entonces el uso de antibióticos como promotores de crecimiento se extendió a otras especies animales, hasta que se incluyó directamente en el alimento (Stokestad, E. y Jukes, T. 1950).

Sin embargo, su empleo continuado generó preocupaciones a los consumidores debido a la cantidad de residuos que quedan en la carne de los animales y en sus productos, sin contar con la resistencia generada en algunas cepas bacterianas por la administración continuada. A partir de este momento se inició una búsqueda de alternativas de remplazo a los antibióticos promotores de crecimiento, y se postularon los probióticos como una alternativa viable, por ser un producto natural y sin riesgo para la salud del consumidor.

En la actualidad el concepto de nutrición ha evolucionado notablemente gracias a la investigación constante y al crecimiento de la información disponible, es así que nacen los Alimentos Funcionales, diseñados especialmente con componentes que pueden afectar funciones del organismo de manera específica y positiva, promoviendo un efecto fisiológico más allá de su valor nutritivo tradicional. Dicho efecto puede contribuir a la mantención de la salud y bienestar, a la disminución del riesgo de enfermar, o a ambas cosas.

Los probióticos son microorganismos vivos que ejercen de una forma u otra una acción beneficiosa sobre el hospedador, al administrarse en cantidades adecuadas. De acuerdo a los requisitos de la FAO, una cepa probiótica debe ser identificada a nivel de género, especie y cepa; en el estudio *in vitro* se ha de analizar la actividad antimicrobiana frente a patógenos, resistencia a las condiciones gastrointestinales y adherencia a la mucosa intestinal y células epiteliales. Además, para garantizar la seguridad se recomiendan pruebas de

resistencia a antibióticos, estudios epidemiológicos y de actividades metabólicas perjudiciales para la salud de quien

los ingiere. Dentro de los efectos saludables destacan la contribución nutricional, mejora de la digestibilidad, efecto positivo sobre el sistema inmunológico, mantenimiento de la microbiota intestinal normal, prevención de cáncer, reducción de infecciones respiratorias, reducción del colesterol sérico, mejora de la salud gástrica y coadyuvante en tratamientos con antibióticos.

Para la selección de una cepa probiótica a ser utilizada como microorganismo, el criterio fundamental es que la misma ejerza una acción benéfica en el huésped. El establecimiento de controles de calidad y criterios de selección para productos probióticos se considera una prioridad, debido a la rápida incorporación de estos productos en el mercado y su distribución en el ámbito internacional sin la existencia previa de una normativa comúnmente aceptada. Es evidente que los efectos sobre la salud pueden y deben ser verificados por métodos científicos que avalen y garanticen la eficacia y seguridad del agente que los produce. Por lo tanto no son aceptables alegaciones sobre salud que no se fundamenten en datos científicos. En consecuencia es necesario que exista la evidencia científica que demuestre que el consumo de un microorganismo determinado, produce un efecto saludable concreto para acreditar su categoría de probiótico.

Con el estudio y desarrollo de nuevos preparados microbianos nativos, los países latinoamericanos pueden desarrollar distintas alternativas que destaquen por sus propiedades saludables. Por lo señalado anteriormente, se plantearon los siguientes objetivos:

1. Determinar las características Fermentativas y Bioquímicas del Preparado Microbiano Nativo en estudio.
2. Realizar la identificación del grupo microbiológico de las bacterias presentes en el Preparado Microbiano Nativo.
3. Establecer el potencial uso del Preparado Microbiano Nativo en la alimentación de animales domésticos y su proyección comercial.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

A. ALIMENTOS FUNCIONALES

Según menciona Sarmiento, L. (2008), los alimentos funcionales son definidos por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), como aquellos que contienen componentes biológicos adicionales, con potencial de reducir el riesgo de enfermedad y favorecer la salud. Poseen efectos beneficiosos sobre una o más funciones en el organismo y se incluye alimentos que contienen minerales, vitaminas, ácidos grasos, fibra, alimentos con antioxidantes y probióticos.

El concepto de alimentos funcionales se introdujo en Japón, a finales de la década de los años 80 y desde entonces se ha expandido mundialmente por las características antes mencionadas. Desde los años 90, las autoridades de países como Japón, Estados Unidos de América y de la Unión Europea han ido estableciendo políticas reguladoras para los alimentos funcionales, las cuales presentan algunas variaciones dependiendo del país. La nueva regulación Europea sobre nutrición y salud entra con fuerza en el año 2007 (Walker, P. 2008).

Podemos destacar que es importante que los alimentos funcionales tengan evidencia científica de su efecto beneficioso, que garantice la presencia del componente funcional en el producto final en cantidad suficiente, en una forma asimilable por el organismo, y que en el momento del consumo ofrezca una cantidad significativa de la sustancia activa. Además, es fundamental que el consumidor comprenda los efectos beneficiosos que se expresan en la declaración (Sarmiento, L. 2008).

B. LOS SIMBIÓTICOS

Gotteland, M. (2010), manifiesta que el término “simbiótico” se refiere a un producto alimenticio que contiene, en forma combinada, probióticos y prebióticos, los cuales pueden actuar en forma sinérgica para modular la microbiota (flora) intestinal del consumidor e impactar positivamente sobre su salud. Cabe recordar que un prebiótico es un carbohidrato (generalmente una fibra soluble), no digerible en el intestino delgado y que en el colon estimula el crecimiento de poblaciones bacterianas de la microbiota que son reconocidas como beneficiosas para la salud del consumidor, principalmente bifidobacteria y lactobacilos. Los probióticos, por otra parte, son microorganismos inocuos que han sido seleccionados por sus propiedades específicas, que son incorporados a alimentos y que, una vez ingeridos, son capaces de sobrevivir en el tubo digestivo donde pueden regular la microbiota intestinal y ejercer sus actividades beneficiosas.

Ashwell, M. (2005), define a los simbióticos como una mezcla de probióticos y prebióticos destinada a aumentar la supervivencia de las bacterias que promueven la salud, con el fin de modificar la flora intestinal y su metabolismo, y el término debe reservarse exclusivamente para los productos que poseen verificación científica de la simbiosis, es decir en los cuales los prebióticos favorecen selectivamente a los probióticos adicionados en éste simbiótico en particular. Aún está poco estudiada esta combinación, que podría aumentar la supervivencia de las bacterias en su fase de tránsito intestinal y por tanto, aumentaría su potencialidad para desarrollar su función en el colon. Se ha descrito un efecto sinérgico entre ambos, es decir, los prebióticos pueden estimular el crecimiento de cepas específicas y por tanto contribuir a la instalación de una microflora bacteriana específica con efectos beneficiosos para la salud (Roberfroid, M. 2000).

Un ejemplo de este sinergismo lo constituye la relación de la cantidad de fibra dietética en la dieta con la microflora intestinal: una dieta pobre en fibra puede producir cambios en la ecología de la microflora intestinal y una disminución en la población de *Lactobacillus*, con aumento de bacteroides capaces de desdoblar los ácidos biliares secundarios en compuestos carcinogénicos, como el deshidronorcoleno y el metilcolantreno. La composición de la flora intestinal puede

ser modificada por la ingesta de alimentos suplementados con prebióticos, probióticos o ambos (simbióticos). Será importante profundizar en aquellas cepas de bacterias ácido lácticas que reporten mejores beneficios en una enfermedad determinada y la dosis efectiva para tales propósitos. Se debe tratar de que lleguen al intestino en cantidad suficiente como para implantarse y colonizar su superficie.

Es un compromiso el desarrollo de alimentos funcionales que aporten carbohidratos no digeribles que puedan proporcionar cantidades óptimas de sustrato para la nutrición y desarrollo de las bacterias del colon, activando la producción de AGCC, ácido láctico y energía (hasta el 30 % de las necesidades energéticas de una persona sana), (Redondo, L. 1999).

La palabra simbiótico alude al sinergismo y se reserva para productos en los cuales los componentes prebióticos selectivamente favorecen a los componentes probióticos (Schrezenmeir, J. y De Vrese, M. 2001). Se han realizado numerosos estudios que han mostrado los beneficios de combinar FOS y galacto-oligosacáridos (GOS), con bacterias ácido-lácticas (Fooks, L. et al., 1999).

C. LOS PREBIÓTICOS

1. Definición

Según la revista de Bromatología y Nutrición: Scientific concepts of functional foods in Europe (1999), los prebióticos son ingredientes no digeribles de la dieta, que producen efectos beneficiosos estimulando selectivamente el crecimiento y/o actividad de uno o más tipos de bacterias en el colon, las que tienen a su vez la propiedad de elevar el potencial de salud del hospedero.

Son fundamentalmente fructo y galacto oligosacáridos (Torres, R. 1999). Incluida en este concepto está la fibra dietética. En 1976 Trowel la describió como diferentes compuestos de origen vegetal que presentan como común denominador el estar constituidos por macromoléculas no digeribles, debido a que las enzimas del intestino no pueden hidrolizarlas (Trowell, H. 1976).

Más recientemente se lo define como el citoesqueleto de los vegetales, una sustancia aparentemente inerte que puede ser fermentada por algunas bacterias, pero no desdoblada por las enzimas digestivas, por lo que resulta inabsorbible (Rojas, E. 1994).

2. Requisitos que deben cumplir las sustancias para ser prebióticos

Para que una sustancia (o grupo de sustancias), pueda ser definida como tal debe cumplir los requisitos siguientes:

- Ser de origen vegetal.
- Formar parte de un conjunto muy heterogéneo de moléculas complejas.
- No ser digerida por las enzimas digestivas.
- Ser parcialmente fermentada por las bacterias colónicas.
- Ser osmóticamente activa.

Toda fibra dietética llega al intestino grueso sin haber sido transformada digestivamente. Las bacterias del colon, con sus numerosas enzimas digestivas de gran actividad metabólica, la pueden digerir en mayor o menor medida en dependencia de su composición química y de su estructura (Maté, J. 1996).

D. LOS PROBIÓTICOS

Probiótico, derivado de bios, viene del griego y significa “por la vida”. Son considerados un ingrediente funcional en el alimento (Jankovic, I. *et al.* 2010). Según la FAO, son microorganismos vivos que ejercen una acción benéfica sobre la salud del huésped al ser administrado en cantidades adecuadas. A menudo el término se usa erróneamente para referirse a organismos comensales habituales sin sustentar sus beneficios en la salud o falsamente se limita a bacterias de origen humano (Foligné, B. *et al.* 2010). Los efectos beneficiosos deben demostrarse en animales y humanos (FAO y OMS, 2001; Azaïs-Braesco, V. *et al.*, 2010).

Como probióticos predominan las cepas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, aunque se emplean otros géneros como *Enterococcus*, *Streptococcus* y *Saccharomyces*. Las cepas probióticas pueden ser autóctonas o alóctonas (Quigley, E. 2010), cada una tiene características particulares y con diferente potencial beneficioso para la salud. La respuesta a la dosis suministrada aún no está claramente definida (Salminen, S. *et al.* 1999).

1. Antecedentes de los probióticos

Los efectos de las bacterias lácticas fueron descritos en 1857 por Pasteur. La base científica del concepto probiótico surgió cuando Elie Metchnikoff postuló la relación entre los fermentos de la leche y la longevidad analizando la dependencia entre los microbios intestinales y los alimentos ingeridos (Pot, B. y Tsakalidou, E. 2009; Jankovic, I. *et al.* 2010). Con esta premisa, fue posible adoptar medidas para modificar la microbiota del organismo humano y sustituir los microbios nocivos por microbios útiles (Metchnikoff, E. 1907).

Freter en 1950 mostró un amplio espectro de antibióticos que destruían la microbiota intestinal de ratones haciéndolos vulnerables a patógenos como *Salmonella* y *Shigella*. Estudios en Japón entre 1940 y 1950 sobre la especie *L. casei* y algunas especies de *Bifidobacterium* demostraron que estas bacterias eran capaces de proteger a ratones jóvenes de infecciones intestinales y realizaron muchos estudios asociados a los efectos saludables de estas bacterias lácticas. A partir de 1960 se acuñó la palabra probiótico para designar las sustancias producidas por microorganismos que promovían el crecimiento de otros microorganismos (Lilly, M. y Stillwell, R. 1965). Posteriormente, Fuller en 1989, lo definió como un suplemento alimentario microbiano vivo que afecta de forma beneficiosa al animal huésped a través de la mejora de su balance microbiano intestinal. Gibson (1999), realizó un cambio en el concepto, considerando que un probiótico es un microorganismo vivo que al ser ingerido en cantidades suficientes ejerce un efecto positivo en la salud más allá de los efectos

nutricionales tradicionales (Fooks, L. et al., 1999; Ljungh, A. y Wadström, T. 2009). Esta última definición fue adoptada por la FAO en el 2001.

2. Propiedades de los probióticos

La FAO proporciona una guía para evaluar las propiedades de los alimentos probióticos de forma sistemática. Entre las que se encuentran:

a. Identificación de género, especie y cepa probiótica

La caracterización de los productos probióticos a nivel de género, especie y cepa es fundamental para garantizar que se trata de un microorganismo inocuo y seguro denominado GRAS (Generally Regarded As Safe), en el estudio de sus efectos biológicos y clínicos (Braesco, A. et al. 2010). Por otra parte, la inclusión de todas las especies de BAL y Lactobacillus en un grupo probiótico es incorrecta.

b. Seguridad de los probióticos

Durante décadas, varias especies y cepas probióticas se han ensayado en individuos saludables y enfermos. Aún hoy en día, no hay total certeza de la seguridad de las mismas. Sin embargo, los probióticos son tratados como un alimento y no como un producto farmacéutico aunque tengan la propiedad de atenuar una enfermedad.

En Estados Unidos de América la FDA (Food and Drug Administration), es la entidad encargada de regular los productos probióticos. La categorización de estos productos es determinada en parte por el uso como alimento o ingrediente de alimento, alimento medicinal, suplemento dietético y producto biológico (Degnan, F. 2008), y emplean el sistema GRAS para evaluar la seguridad de los microorganismos empleados en la producción de alimentos. En Europa, la European Food Safety Authority (EFSA), los clasifica dentro de los productos nutricionales para darle un rango más alto y emplea el sistema Qualified

Presumption of Safety (QPS). Básicamente, solo los microorganismos identificados a nivel de cepa y cuyo uso histórico haya sido seguro pueden recibir la denominación de probiótico, de lo contrario se debe recurrir a estudios clínicos y de toxicidad (Havelaar, A. *et al.* 2010; Quigley, E. 2010). Algunos autores sugieren adoptar las recomendaciones de la declaración “Consolidated Standards of Reporting Trials” (CONSORT), con el fin de facilitar la validación de los resultados. Por tanto, la seguridad de un probiótico depende de la especie bacteriana de interés, la aplicación, el uso, la población objetivo, taxonomía, identificación y la caracterización fenotípica.

(1) Estudios in vivo utilizando animales y humanos

Con el propósito de demostrar las propiedades atribuidas a los probióticos se han definido modelos animales donde entran en acción mayor número de variables como la matriz del alimento, el procesamiento de la cepa probiótica y la interacción con la microbiota intestinal del hospedador (Quigley, E. 2010). Resultados de varios estudios clínicos han demostrado que determinadas cepas probióticas tienen capacidad de acortar la duración o reducir el riesgo de ciertas infecciones bacterianas y virales. Se está trabajando en identificar los mecanismos de acción de los probióticos y cómo estos pueden llegar a afectar los diferentes alimentos en los que se introducen (Allgeyer, L. *et al.* 2010; Jankovic, I. *et al.*, 2010).

(2) Viabilidad de las cepas declaradas en productos probióticos comerciales

Según explica Collado, M. (2004), el mantenimiento de la viabilidad de los microorganismos en un producto probiótico durante toda la vida útil es imprescindible porque condiciona su actividad. El número de células viables en el alimento al final de su vida útil debe ser de al menos 10^6 UFC/ml en productos con bifidobacterias. Algunos autores, recomiendan un consumo de 10^9 UFC/día para conservar los niveles suficientes (De Champs, C. *et al.*, 2003).

c. Etiquetado

Sarmiento, L. (2008), recomienda que un producto probiótico incorpore la siguiente información en su etiqueta:

1. Género, especie y nombre de la cepa para evitar confusiones sobre su funcionalidad.
2. Establecer el número mínimo de células viables.
3. Dosis recomendada en la que el probiótico es efectivo.
4. Condiciones adecuadas de almacenamiento.
5. Dirección de contacto con centros de información al consumidor.
6. Efectos beneficiosos claros sobre la salud del consumidor.

3. Propiedades de los probióticos en los animales

Zimmermann, B.*et al.* (2001), señalan que en la última mitad del siglo XX, se desarrollaron nuevos conceptos para promover la salud animal y asegurar el rendimiento en el crecimiento, eficiencia en la alimentación, y calidad del producto.

Los antibióticos fueron primero añadidos a los alimentos para proteger a los animales contra infecciones, pero los antibióticos también promueven el crecimiento, esta doble función produjo el uso amplio como un aditivo en la alimentación. Sin embargo, debido a preocupaciones de seguridad acerca de la transmisión de la resistencia a los antibióticos, el uso de los antibióticos en alimentación animal ha ido gradualmente declinando desde 1990 y han sido prohibidos completamente desde enero del 2006. Esta situación llevó a la proposición de alternativas, tales como los microorganismos probióticos (Brambilla, G. y De Filippis, S. 2005).

Los probióticos son microorganismos viables que aumentan la ganancia de peso y los rangos de conversión alimenticia (propiedades zootécnicas) y disminuyen la incidencia de diarrea (Simon, O. *et al.* 2001).

Zimmermann, B. *et al.* (2001), después de desarrollar algunos estudios han señalado que los probióticos incrementan el crecimiento en situaciones de estrés, como las encontradas en granjas reales a diferencia de los que ocurre en ensayos más controlados como los realizados en las universidades. Esto asume que los efectos en la salud y los efectos zootécnicos están estrechamente relacionados. La suplementación probiótica ha sido recomendada para el tratamiento o prevención de varias condiciones de estrés y enfermedades de un sinnúmero de especies.

a. Mecanismo de acción de los probióticos

El efecto benéfico de los probióticos se atribuye en general a mecanismos diferentes que a su vez pueden deberse a varias causas, a saber: a) A la exclusión competitiva de bacterias nocivas, ya sea por: (i) competencia por nutrientes, (ii) competencia por sitios de fijación en el intestino; o, (iii) aumento de la respuesta inmunológica del hospedero ; y b) Por aportes benéficos al proceso digestivo del hospedero, a través de: (i) aporte de macro y micronutrientes para el hospedero o (ii) aporte de enzimas digestivas (Hassan, A. y Frank, J. 2001).

b. Bacterias productoras de ácido láctico (BAL)

Las BAL son un grupo grande de bacterias con la característica común de producir ácido láctico como el principal producto final del metabolismo; se encuentran en la leche y en otros ambientes naturales. Las bacterias lácticas son Gram positivas, ácido tolerantes, soportan rangos de pH entre 4.8 y 9.6, lo que les permite sobrevivir naturalmente en medios donde otras bacterias no sobrevivirían. Las bacterias lácticas tienen formas de cocos o de bastoncitos y son catalasa negativa.

Las BAL sintetizan su ATP (Adenosin TriFosfato), en la fermentación láctica de los glúcidos, el ácido láctico es en algunos casos el único producto final

(homofermentación), y en otras ocasiones se produce además etanol, acetato y CO₂ (heterofermentación). Las bacterias lácticas son generalmente aerotolerantes, aunque algunas especies, como las que se encuentran en el intestino de los animales, son anaerobias estrictas. Incluso en presencia de O₂ no son capaces de llevar a cabo las fosforilaciones oxidativas (Bourgeois, C. y Larpent, J. 1995).

Las BAL requieren aminoácidos específicos, vitamina B y otros factores de crecimiento y son incapaces de utilizar hidratos de carbono complejos (Hassan, A. y Frank, J. 2001). Se demostró que las BAL reducían el crecimiento de gérmenes indeseables en el tracto intestinal. Esta reducción sería consecuencia tanto de la producción de compuestos antibacterianos, como la acidez intestinal originada o del antagonismo competitivo.

c. Producción de compuestos antibacterianos

Diversos autores han comprobado la reducción del número de gérmenes patógenos por las BAL mediante la producción de compuestos antibacterianos los cuales han sido denominados de muy diversas formas: *Lactobacillin*, *Lactolin*, *Lactobrevin*, *Acidolin* y *Acidophilin*. Las BAL pueden también producir sustancias que neutralizan los efectos adversos de un microorganismo al modificar su metabolismo, sin necesidad de destruirlo, pero si disminuyendo su población. Por ejemplo, cambios en la actividad enzimática no asociados con cambios en la composición de la flora intestinal.

d. Productos finales de la fermentación y la acidez intestinal

Las BAL poseen gran capacidad fermentativa, produciendo cantidades significativas de ácidos orgánicos (ácido acético, fórmico y láctico), a partir de carbohidratos simples, lo cual determina una acidez intestinal que limita el crecimiento especialmente de los gérmenes patógenos Gram negativos (Ten Brink, B. et al. 1987). Fuller, R. (1989), demostró que puede detenerse el

crecimiento de *E. coli* ajustando el pH de un medio de cultivo a 4.5 mediante la adición de ácido láctico o clorhídrico.

Años más tarde este mismo autor administrando yogurt (leche fermentada por *L. bulgaricus* y *S. termophilus*), a lechones destetados observó cómo descendía el recuento de *E. coli* en el estómago y duodeno afirmando que el efecto por el yogurt podría ser reproducido por leche acidificada por ácido láctico a un pH de 4.2.

e. Antagonismo competitivo

La importancia de la microflora indígena en el intestino como factor de resistencia natural frente a los microorganismos potencialmente patógenos, fue reconocida a finales del siglo XIX por Metchnikoff. Esta microflora indígena es muy estable. La penetración y colonización de microorganismos no indígenas o del medio y/o de otras especies animales es impedida por las BAL, las cuales compiten con otras bacterias en la colonización de zonas intestinales y en la utilización de sustancias nutritivas (Bibel, D. 1988). La competencia directa de los gérmenes bacterianos por los lugares de adherencia en la superficie epitelial del intestino, es un factor importante en la reducción de los microorganismos al inducir la exclusión de gérmenes patógenos (Scheleifer, J. 1985; Schneitz, C. et al., 1993).

4. Beneficios de los probióticos en producción animal

Los efectos potenciales de las bacterias probióticas según Samaniego y Sosa (2002), se resumen a continuación:

- Producción de nutrientes de especial importancia para la mucosa intestinal, tales como ácidos grasos, particularmente los de cadena corta y aminoácidos como: arginina, glutamina y cisteína.
- Producción de micronutrientes, especialmente vitaminas (algunas vitaminas del complejo B), antioxidantes y aminos (histamina, 5-HT, piperidina, tiramina,

cadaverina, pirrolidina, agmatina, espermidina y putrescina), muchos de los cuales son utilizadas por todo el organismo.

- Prevención del sobre crecimiento de microorganismos potencialmente patógenos.
- Estimulación del sistema de defensa inmuno intestinal, referido como sistema de tejido linfoide asociado al tracto.
- Eliminación de toxinas y sustancias innecesarias del lumen.
- Participación en la regulación de funciones intestinales, tales como: utilización de mucus, absorción de nutrientes, motilidad gastrointestinal y flujo de sangre, lo cual ocurre a través de la producción de ácidos grasos de cadenas cortas, hormonas, enzimas, poliaminas y citoquininas y óxido nitroso.
- Importancia del mecanismo de exclusión competitiva.

En el cuadro 1, aparece un listado de las bacterias ácido lácticas, usadas como probióticos.

Cuadro 1. BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS USADAS COMO PROBIÓTICOS.

Lactobacillus	Streptococcus	Bifidobacterium
L. acidophilus	S. cremoris	B. bifidum
L. casei	S. salivarius subsp. Thermophilus	B. adolescentes
L. delbrueckii subsp. bulgaricus	S. faecium	B. animalis
L. brevis	S. diacetylactis	B. infantis
L. cellobiosus	S. intermedius	B. longum

Fuente: Samaniego, L. Sosa, M. (2002).

5. Antibióticos vs. Probióticos

Durante varias décadas, los antibióticos se utilizaron como aditivos promotores del crecimiento animal, así como para eliminar los microorganismos indeseables que afectan su salud. Sin embargo, su uso indiscriminado ha provocado efectos

residuales en los alimentos y el desarrollo de cepas patógenas resistentes (Choct, M. 2001 y Blake, D. *et al.* 2003). Se adiciona a esto que la utilización de antibióticos daña el equilibrio ecológico de la flora gastrointestinal, por lo tanto, los animales son sensibles a contraer enfermedades. Por otra parte, la industria farmacéutica no es capaz de desarrollar antibióticos, suficientemente efectivos que compitan con el desarrollo de la resistencia microbiana (Ferket, P. *et al.* 2002).

Debido a las limitaciones que tiene el uso de los antibióticos, ha sido necesario buscar productos más seguros e inocuos. Se ha comprobado que el empleo de los probióticos estabiliza el ecosistema gastrointestinal, lo que determina el buen funcionamiento del tracto y, por tanto, el buen estado de salud del animal (Collins, M. y Gibson, G. 1999 y Castellanos, A. y Murguía, M. 1999).

A diferencia del término probiótico (para la vida), antibiótico significa contra la vida, y su acción en los microorganismos es inmediata. Sin embargo, el efecto de los probióticos no es inmediato, pero sí por un período más prolongado (Ouwehand, A. *et al.* 1999). Otro aspecto importante que diferencia a los probióticos de los antibióticos es que los primeros son inmunoestimulantes y los segundos, inmunodepresores. Es decir, que los principales mecanismos de acción de los probióticos se establecen con la creación de diferentes barreras defensivas (Marca, J. 1999).

Actualmente, en la Unión Europea se ha prohibido la utilización de antibióticos como promotores del crecimiento, solamente cuatro de estos productos fueron mantenidos hasta el 2006. Sin embargo, otros países como Estados Unidos manifiestan que no existen suficientes elementos que demuestren la resistencia microbiana, a pesar de que en los últimos años se ha prohibido el uso de antibióticos del tipo quinolonas (Gutiérrez, O. *et al.* 2002). Por lo tanto, el uso de los probióticos es una alternativa prometedora para el mundo, que cada día tiene una mayor cultura ecológica.

6. Uso de Probióticos como promotores de crecimiento

En varias investigaciones realizadas por Pollmand, D. (1986), en animales, se ha encontrado que los probióticos son una alternativa de remplazo a los promotores de crecimiento, ya que al ser administrados en cantidades adecuadas reducen la mortalidad y aumentan la conversión alimentaria mejorando la capacidad digestiva e incrementando el estado de salud del animal, sin contar que estimulan el crecimiento de los microorganismos benéficos y suprimen los patógenos por competición y producción de ácido láctico.

Como asevera Freitas, M. *et al.* (2003), los probióticos son más eficientes en las primeras semanas de vida de los animales; especialmente en mamíferos, en el período posterior al destete. Así mismo indica Vimala, Y. y Dileep, P. (2006), que las preparaciones probióticas pueden ser administradas inmediatamente después del nacimiento de los animales o en periodos en los que el productor espera la aparición de enfermedades o mezcladas con el alimento por periodos largos de tiempo.

En experimentos realizados por Wenk y colaboradores (1990), observaron que al alimentar pollos y cerdos con levaduras y *Lactobacillus sp*, incrementaba el crecimiento y la digestibilidad (Gambos, S. 1991). En 1986, Pollmand, D., resumió los resultados de diferentes investigaciones realizadas con alimentos iniciadores y terminadores en cerdos, y demostró una respuesta positiva sobre la ganancia diaria de peso (73 % de los ensayos revisados), y la eficiencia en conversión alimenticia (90 % de los ensayos revisados).

Freitas y colaboradores (2003), hallaron que con el uso de un probiótico comercial que contenía *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium* y *Saccharomyces cerevisiae*, se mejoró en un 5 % la ganancia en peso vivo y la tendencia de conversión alimenticia al ser comparado con el antibiótico comercial; resultados similares se encontraron en cerdos durante la etapa de crecimiento, atribuyendo

al éxito del probiótico la mejora de un 7 % en la digestibilidad de la proteína que contenían los cereales (Gambo, S. 1991).

Estudios realizados en el año 2010 han demostrado que el uso de mezclas de probióticos como promotores de crecimiento obtienen mejores resultados que los aditivos usando un solo probiótico (Gunther, K. 2003). Asimismo, Etleva, V. y colaboradores (2010), y Timmermana, H. y colaboradores (2004), evidenciaron que los ensayos usando probióticos combinados, incrementaron significativamente el peso final corporal y el peso diario en pollos de engorde.

En un estudio realizado por Gunther, K. (1995), donde se empleó un producto probiótico, en pollitos en crecimiento, se determinó que éste tuvo influencia en la ganancia de peso corporal y en la conversión alimenticia, lo que incrementó el primer indicador de 102,3 a 106,74 % y disminuyó el segundo de 98,42 a 95,26 % con respecto al grupo control.

Shubert, R. y Flackowsky, G. (1999), también estudiaron el efecto de una cepa de *Bacillus cereus* en pollos de ceba y encontraron una inhibición de bacterias indeseables en el intestino. Además, demostraron menor peso relativo de los órganos digestivos, asociado a mayor rendimiento en las aves. En otro experimento, estos autores evaluaron el efecto del probiótico Toyoceryn en pollos de ceba. Para ello, suministraron 50 y 100 mg/kg en la dieta y comprobaron que el peso final fue superior en 1.5 % y 2.1 % en animales tratados con respecto al control; asimismo, la conversión mejoró en 1,2 % y 2 %, y la mortalidad disminuyó a 2,7 % y 4,5%, con respecto al control.

Capcarova, M. *et al.* (2011), usaron una mezcla de probióticos de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis*, *Streptococcus thermophilus* y *Enterococcus faecium*, en pollos de engorde y obtuvieron un aumento del calcio y el potasio, y decrecimiento de los triglicéridos, además de un aumento del peso.

Saminem, S. (1998), en un estudio demostró que la microbiota bacteriana genera compuestos útiles para la nutrición del individuo; dentro de los compuestos que produce están los ácidos grasos de cadena corta que aportan energía, además de vitaminas como K y del grupo B, y algunos aminoácidos esenciales como lisina. También, Onifade, A. (1997), mediante un estudio, determinó el efecto de una dieta complementada con una cepa de levadura *S. cerevisiae* en pollos de engorde, donde los grupos tratados mostraron una mejor ganancia de peso vivo, conversión alimentaria y mayor rendimiento de canal.

Como indica García, P. *et al.* (2002), obtuvieron una disminución del colesterol total, de las lipoproteínas de baja densidad y de la grasa abdominal en pollos de engorde que consumieron hidrolizado enzimático de crema de levadura *S. cerevisiae*. Por otra parte, en un experimento llevado a cabo por Ramírez, B. *et al.* (2005), con pollitas de remplazo de la ponedora comercial en los primeros 42 días de edad, se comprobó que en el grupo donde se administraron *Lactobacillus* spp., se produjo un aumento significativo del peso vivo promedio de las pollitas a los siete días en comparación con grupo control, el cual fue superior a los 42 días con un incremento del peso vivo promedio del 7,77 % y una mejora del 14 % en la conversión alimenticia, así como la reducción de la mortalidad en un 2,1 %.

Todos estos estudios en pollos de engorde apoyan estudios recientes (Ashayerizadeh, A. *et al.*, 2009), donde se examinó el efecto de los probióticos y prebióticos como promotores de crecimiento como aditivos en pollos de engorde, sin poner en riesgo la salud del consumidor.

Existen varios estudios de probióticos en otras especies, dentro de los cuales se nombrarán algunos:

Strompfová, Lauková y Ouwehand, en 2004, aislaron una cepa de *Lactobacillus* (AD1); tras la administración oral a perros que sufrían enfermedades del tracto gastrointestinal, encontraron que redujo el nivel más alto de colesterol en el suero de la alanina aminotransferasa. En terneros de ceba, se administró

Saccharomyces cerevisiae y *Aspergillus oryzae* y se observó un incremento en la ganancia diaria de peso hasta en un 20 % (González, A. 1998).

Como mencionan Bogut, L. *et al.* (1998), en lo referente a los peces y crustáceos, los estudios efectuados con BAL han reportado efectos positivos en el crecimiento, sobrevivencia y eliminación de patógenos en ellos.

Por todos los resultados encontrados, se evidencia que los probióticos son una de las alternativas al remplazo de antibióticos promotores de crecimiento, cuyos resultados dejan una estela de lo que podría ser un futuro con nuevos aditivos naturales y múltiples beneficios.

7. Riesgos en el uso de probióticos

Todos estos microorganismos no parecen suponer un riesgo para la salud pero hay que tener en cuenta la posibilidad de efectos secundarios, como la inducción de resistencias a los antibióticos o que ellos mismos se comporten como agentes patógenos. Actualmente no existe una normativa que regule la fabricación de estos productos, de forma que muchos de los alimentos etiquetados como bioalimentos no contienen ni el número ni el tipo de microorganismos que afirman (Hamilton, J. 1996). Por lo tanto y ante la avalancha de este tipo de productos, es necesario establecer pronto unos criterios que los regulen y así evitar posibles fraudes (Larkin, M. 1999).

Extensos estudios (histológicos, hematológicos, química sanguínea, peso de órganos y el resto de análisis sanitarios), realizados en animales, usando dosis 10 veces superiores a las recomendadas, demuestran que no hay reacciones adversas (Drisko, J. *et al.*, 2003).

D. ÁCIDOS ORGÁNICOS

Los ácidos orgánicos están formados por uno o más grupos carboxilo (R-COOH), como grupo funcional, pudiéndoles denominar también ácidos carboxílicos. En comparación con los ácidos inorgánicos, como el clorhídrico, el fosfórico o el sulfúrico, los ácidos orgánicos se consideran ácidos relativamente débiles o blandos (BASF, 2015.). Según Arroyo, P. (2011), los ácidos orgánicos son aquellos compuestos que resultan de la oxidación potente de los alcoholes primarios o de la oxidación moderada de los aldehídos.

Es importante señalar que los ácidos ejercen sobre los microorganismos dos tipos de efectos distintos, aunque estrechamente relacionados. En primer lugar, existe un efecto antimicrobiano debido a la acidez en sí, esto es, por un declive del pH extracelular. El segundo tipo, más importante en la práctica, es el efecto antimicrobiano específico debido a la forma no disociada, que atraviesa la membrana celular, y causa una disminución del pH intracelular.

Todos los microorganismos tienen un pH óptimo de crecimiento y un intervalo de pH fuera del cual les resulta imposible proliferar. Esto se refiere al pH del medio o extracelular, ya que el pH intracelular tiene que estar necesariamente cerca de la neutralidad, incluso el de los organismos que crecen mejor en pH ácidos (acidófilos). El mantenimiento de estas condiciones adecuadas de pH se consigue mediante diversos mecanismos de homeostasis.

1. Ácido láctico

El ácido láctico, también conocido por su nomenclatura oficial ácido 2-hidroxi-propanoico o ácido α -hidroxi-propanoico, es un compuesto químico que desempeña importantes roles en diversos procesos bioquímicos, como la fermentación láctica. El ácido láctico es utilizado en varios productos como regulador de acidez. Aunque puede obtenerse de la lactosa (azúcar de la leche), la mayor parte del ácido láctico empleado comercialmente deriva del uso de bacterias como la *Bacillus acidilacti*, *Lactobacillus delbrueckii* o *Lactobacillus bulgaricus* para fermentar fuentes de carbohidratos (Galatro, D. 2014).

E. LEVADURAS

Las levaduras son organismos unicelulares en el sector biotecnológico industrial. Son esenciales en la producción de algunos alimentos y bebidas. También pueden estar involucradas en la degradación de algunos alimentos (Senses, S. 2005).

Según mencionan (Schrezenmeir, J. y de Vrese, M. 2001), las levaduras han constituido una importante fuente para la obtención de productos con actividad probiótica. Estos productos están compuestos por cepas vivas que pueden ser utilizadas al igual que los derivados de sus paredes. Estos últimos manifiestan una comprobada actividad inmunoestimulante al ser utilizados en los animales de granja, mejoran los procesos de la fisiología digestiva y contribuyen a la obtención de mejores resultados productivos.

Como indica (Morales, J. 2004), entre las principales especies de levaduras empleadas como probióticos se encuentran las siguientes: *Saccharomyces boulardii* (reconocida como líder), *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* y *Kluyveromyces fragilis*. Los aditivos de levaduras han sido empleados como alimento animal por más de cien años, así como para la prevención de enfermedades.

Las levaduras constituyen una importante fuente para la obtención de productos con actividad probiótica, bien sea como cepas vivas o utilizando derivados a partir de sus paredes celulares. Estos preparados han manifestado una comprobada actividad inmunoestimulante en animales de granja, así como mejoras en los procesos de la fisiología digestiva, contribuyendo a obtener mejores resultados productivos (Schrezenmeir, J. y de Vrese, M. 2001). La levadura viva *S. cerevisiae* se recomienda para la alimentación animal en dosis de 1 g por cada 100 Kg de peso (Dawson, K. A. 1993). Es considerado primordial que la levadura permanezca metabólicamente activa para que resulte funcional y estimule el

crecimiento y la actividad bacterial para degradar la fibra e incrementar la producción de ácidos orgánicos (acético, propiónico y láctico), como menciona (Stanley, V. *et. al.*, 1993).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

A. LOCALIZACIÓN DEL EXPERIMENTO

La presente investigación se desarrolló en los laboratorios de: Biotecnología y Microbiología Animal “LABIMA” de la Facultad de Ciencias Pecuarias y en el de HPLC de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH, localizados en el Km 1 ½ de la Panamericana Sur. Las condiciones meteorológicas se detallan (cuadro 2).

Cuadro 2. CONDICIONES METEOROLÓGICAS.

PARÁMETROS	PROMEDIO
Temperatura (°C)	13,20
Humedad Relativa (%)	66,46
Precipitación (mm)	550,80
Heliofania (h/luz)	165,15

Fuente: Estación Agro meteorológica de la F.R.N. de la ESPOCH. (2014).

B. UNIDADES EXPERIMENTALES

En la presente investigación el tamaño de la Unidad Experimental fue de 10 litros del preparado microbiano nativo, elaborados por fermentación sumergida en fermentadores rústicos en el laboratorio, con cinco repeticiones dando un total de 5 unidades experimentales (50 litros).

C. MATERIALES Y EQUIPOS

Laboratorio de Biotecnología y Microbiología Animal de la FCP y Laboratorio de HPLC FC-ESPOCH

Se utilizaron las instalaciones del laboratorio de Biotecnología y Microbiología Animal (LABIMA), de la FCP y el Laboratorio de HPLC de la Facultad de Ciencias– ESPOCH, en donde se cuenta con los siguientes equipos y materiales:

a. Equipos de laboratorio

- Termómetro.
- Potenciómetro.
- Brixómetro.
- Equipo de Macro Kjeldahl.

- Matracas Erlenmeyer.
- Centrifuga.
- Estufa.
- Balanza digital.
- Vidriería de laboratorio.
- Caja para cultivo anaeróbico.
- Microscopio.
- Cuenta colonias.
- Refrigerador.
- Hielera.
- Espectrofotómetro.
- HPLC.
- Baño María.
- Bomba de vacío.
- Computadora.

b. Reactivos

- Agar MRS para bacterias ácido lácticas.
- Ácido sulfúrico.
- Cloruro de bario.
- Fosfato di básico.
- Agua bidestilada grado HPLC.
- Ácido láctico.
- Ácido succínico.
- Ácido propiónico.
- Ácido butírico.
- Ácido acético.
- Caseína.
- Ácido tricloro acético.

- Alcohol cetona.
- Azul de metileno.
- Yodo.
- Agua peptonada.

c. Materiales

- 5 botes de plástico con capacidad para 12 litros.
- 3M™ Placas Petrifilm™ para el Recuento de E.coli/Coliformes.
- 3M™ Placas Petrifilm™ para el Recuento de levaduras y Mohos.
- 3M™ Petrifilm™ Placas para Recuento de Aerobios.
- Frascos plásticos para muestras.
- Marcadores para etiquetar muestras.
- Materiales de limpieza.
- Suero de leche.
- Sal mineral.
- Jugo de caña.
- Yogurt.
- Sulfato de amonio.
- Urea.
- Agua.

D. TRATAMIENTOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL

La presente investigación pretendió caracterizar un preparado microbiano nativo (S3), que resultó ser el mejor de una investigación previa denominada “FORMULACIÓN, PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE TRES SIMBIÓTICOS NATIVOS DESTINADOS PARA LA ALIMENTACIÓN ANIMAL”, el S3 fue elaborado mediante la combinación de fuentes naturales de microorganismos como son: el suero de leche, yogurt y el jugo de caña, más la adición de cuatro ingredientes (urea, sal mineral, sulfato de amonio y agua), como se detalla (cuadro 3).

Cuadro 3. COMPOSICIÓN DEL PREPARADO MICROBIANO NATIVO.

SIMBIOTICO	Suero De Leche	Yogurt	Jugo De Caña	Urea	Sal Mineral	Sulfato de Amonio	Agua
S3	16%	1%	16%	1%	1%	0,2%	64,8%

El esquema del experimento para la presente investigación se presenta (cuadro 4).

Cuadro 4. ESQUEMA DEL EXPERIMENTO.

Tratamientos	Repeticiones	TUE	Total
T. Único	5	10	50

TUE: Corresponde al Tamaño de la Unidad Experimental.

E. MEDICIONES EXPERIMENTALES

Las variables experimentales que se evaluaron en esta investigación fueron:

a. Evaluación fermentativa

- Ácido Láctico (%).
- Ácido succínico (%).
- Ácido Propiónico (%).
- Acido Butírico (%).
- Ácido acético (%).
- Grados Brix (°B).
- Temperatura (°T).

- pH (pH).
- Densidad óptica por espectrofotometría (%).

b. Evaluación Bioquímica

- Nitrógeno Total (%).
- Proteína (%).
- Enzimas Proteasas totales.
- Enzimas Amilasas totales.

c. Evaluación Microbiológica

- Levaduras (UFC/ml).
- Hongos Filamentosos (UPC/ml).
- Bacterias aerobias totales (UFC/ml).
- Bacterias Acido Lácticas (UFC/ml).
- Bacterias Coliformes totales (UFC/ml).
- Biomasa Bacteriana (gramos).

F. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados experimentales fermentativos, bioquímicos y microbiológicos fueron sometidos a los siguientes análisis:

- Estadística descriptiva: media, desviación estándar, varianza, porcentajes e histogramas de frecuencias.
- Análisis de Correlación.

G. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

1. Fase 1: Producción del Preparado Microbiano Nativo mediante fermentación líquida sumergida a escala de laboratorio

Se elaboró el preparado microbiano nativo en fermentadores rústicos del laboratorio con una producción de 10 litros del producto en cada repetición.

Para la elaboración del PMN se colocaron los ingredientes antes detallados en el bote plástico, mezclando convenientemente para evitar la presencia de grumos, esta preparación permaneció por 48 a 72 horas a una temperatura ambiente (18 °C promedio en la ciudad de Riobamba). Esta mezcla, después del tiempo indicado, produjo una fermentación ácida, predominantemente láctica. Las cantidades empleadas se repitieron cinco veces en fermentadores rústicos de laboratorio.

2. Fase 2: Dinámica de la fermentación para su evaluación fermentativa, bioquímica y microbiológica

Los indicadores de evaluación de la dinámica de la fermentación se muestran a continuación (cuadro 5).

Cuadro 5. INDICADORES DETERMINADOS DURANTE LA EVALUACIÓN DE LA DINÁMICA DE LA FERMENTACIÓN EN LOS PREPARADOS MICROBIANOS.

Indicadores	Horas				
	0	24	48	72	96
	X	X	X	X	X
Hongos filamentosos	X	X	X	X	X
Levaduras	X	X	X	X	X
Bacterias aerobias totales	X	X	X	X	X
Bacterias ácido lácticas	X	X	X	X	X
Bacterias coliformes	X	O	O	O	X
Biomasa bacteriana	X	X	X	X	X

pH	X	X	X	X	X
Temperatura	X	X	X	X	X
Grados Brix	O	O	O	O	X
Densidad óptica	X	O	O	O	X
Ácido láctico	X	O	O	O	X
Ácido pirúvico	X	O	O	O	X
Ácido succínico	X	O	O	O	X
Ácido propiónico	X	O	O	O	X
Ácido acético	X	O	O	O	X
Ácido butírico	O	O	O	O	X
Enzimas proteasas totales	O	O	O	O	X
Enzimas amilasas totales	X	O	O	O	X
Proteína	X	O	O	O	X
Nitrógeno total	X	O	O	O	X

X: Determinación realizada.

O: Determinación no realizada.

Se aplicó un muestreo dirigido y cronológico, considerando las 5 réplicas del tratamiento de fermentación, para esto se tomaron muestras de 400 ml de cada recipiente o repetición a las 24, 48,72 y 96 horas con una agitación previa de tres a cinco minutos, tratando de que la muestra provenga del centro del recipiente. En todo el proceso de muestreo se aplicaron buenas prácticas de laboratorio para minimizar el riesgo de contaminación ambiental. Estas muestras se colocaron en recipientes estériles de vidrio con tapa rosca y etiquetados inmediatamente, además se refrigeraron hasta iniciar los análisis correspondientes (máximo en 30 minutos).

H. METODOLOGÍA DE EVALUACIÓN

La metodología de la evaluación se determinó de la siguiente manera:

1. EVALUACIÓN FERMENTATIVA

a. Determinación de Ácidos Orgánicos (Ácidos Láctico, Succínico, Propiónico, Butírico, Pirúvico y Acético) por el método de HPLC

Preparación de la fase móvil:

- Se preparó la fase móvil mezclando agua bi-destilada grado HPLC con ácido fosfórico 0.2 M.
- Inmediatamente se procedió a agitar y filtrar con la ayuda de un Kitazato y una bomba de vacío.
- Se desgasificó la fase móvil en un Baño de Ultrasonido y se colocó en un frasco estéril y ámbar para su posterior uso.

Determinación de condiciones del HPLC:

Las muestras fueron analizadas en un equipo Shimadzu LC-10Ai con autoinyector, con una columna C18 de 15 centímetros, las condiciones del HPLC con las que se aplicó el análisis fueron las siguientes:

- Flujo de inyección: 0,6 ml/min.
- Temperatura: 29°C.
- Fase móvil: Ácido Fosfórico 0.2 M a un pH de 2,5.
- Detector UV: onda de 210nm.
- Concentración de los estándares de 200ppm.

Preparación de los estándares

- Los estándares de los ácidos orgánicos a analizar (Ácidos Láctico, Succínico, Propiónico, Butírico, Pirúvico y Acético) se los diluyó en la fase móvil a una concentración de 200ppm.
- Luego fueron filtradas con un filtro de 0,4 μ m.

Preparación de las muestras

- El pretratamiento de la muestra para determinar ácidos orgánicos se realizó según Holloway *et al.*(1989) que consistió en colocar 1 g de muestra, se le agregó 25 ml de ácido sulfúrico 0,25 M.
- La mezcla fue hervida en un baño de agua por 10 min, después enfriada y llevada a un volumen de 100 ml.
- La muestra diluida fue filtrada por papel filtro No. 542 y filtrada nuevamente por un poro de 0,4 μm para ser analizada por el HPLC.

Análisis en el HPLC

- Se encendió el equipo y se esperó hasta que se acondicione con los parámetros antes mencionados.
- Se corrieron los estándares y posteriormente las muestras colocándolas en las celdas para HPLC.

Interpretación de los resultados

- Una vez analizadas las muestras, se determinaron de acuerdo a los tiempos de retención, cada uno de los picos de los estándares y las muestras, lo que ayudó a calcular las áreas de cada uno y con ello su cantidad.

b. Temperatura (°C)

La temperatura del Preparado Microbiano Nativo se determinó con la ayuda de un termómetro digital, siendo medido en grados Celsius a las 0, 24, 48, 72, 96 horas, homogenizando previamente el preparado.

c. pH

Para la determinación del pH se utilizó el pH metro a las 0, 24, 48, 72, 96 horas de la siguiente manera:

- Se encendió el pHmetro y se colocó el sensor en una solución buffer de pH conocido para que se estabilice.
- Se homogenizó el PMN agitación previamente y se procedió a medirlo anotando las medidas.

d. Grados Brix: Cociente total de sacarosa (°Brix)

Los grados Brix se determinaron a las 0, 24, 48, 72, 96 horas de la siguiente manera:

- Se homogenizó el Preparado Microbiano Nativo, se tomó una muestra del centro del recipiente con la ayuda de una pipeta Pasteur.
- Se colocó una gota en el brixómetro y se realizó la lectura en la escala.

e. Densidad óptica por espectrofotometría

Para la determinación de la densidad óptica por espectrofotometría, se tomaron las muestras únicamente a las 96 horas de la manera siguiente:

- Se prepararon los 10 tubos de ensayo de la escala de McFarland, y se procedió a medirlos en el espectrofotómetro a una onda de 550nm.
- Se preparó el blanco y además se extrajeron las muestras de 10 ml del PMN homogenizado y se midieron en el espectrofotómetro.
- Se procedió a hacer una curva de calibración con las medidas tomadas de los preparados de McFarland y de acuerdo a esto se estimó la carga bacteriana.

2. EVALUACIÓN BIOQUÍMICA

a. Nitrógeno total Kjehendal (%)

Para la obtención del Nitrógeno total se tomaron muestras en las horas 0 y 96; el método consistió en:

- Pesar 1 g de muestra, en el tubo Kjeldahl, adicionar 7g de K_2SO_4 y 0,22g de $CuSO_4$, y agregar 25 ml de H_2SO_4 .
- Colocar los tubos Kjeldahl en el Speeddigester.
- Encender el Speeddigester correr la digestión por 2 horas.
- Al final de la digestión automática se confirmó el mensaje “digestión finalizada”.
- Conectar el tubo al bulbo de la Unidad de Destilación y, sumergir la punta que baja del condensador en una solución de ácido estandarizado (H_2SO_4 0,2N) y añadir de 5 a 7 gotas de indicador rojo de metilo en el receptor, girando el Erlenmeyer para mezclar el contenido completamente.
- Colarse en el programa 2 de la Unidad de destilación que está debidamente programado para trabajar a una potencia de 70% y un tiempo de 7 min.
- Presionar Reagent 1 que deberá estar programado para enviar 50 ml de agua desionizada.
- Presionar Reagent 2 que deberá estar programado para enviar 100 ml de NaOH al 40 %.
- Presionar Start para su debida destilación hasta que haya sido destilado los 7 min.
- Quitar el recipiente y sacudir la punta de la manguera del condensador.
- Estandarizar cada solución estándar con estándares primarios.
- Titular el exceso de H_2SO_4 estandarizado 0,2N en el destilado con la solución de NaOH estandarizado 0,2N.
- Registrar datos.

b. Nitrógeno Proteico y No Proteico

Esta técnica permite reconocer la porción de nitrógeno de origen proteico y no proteico de los materiales analizados. Puede aplicarse a todo tipo de materiales.

Procedimiento:

Pese 2 g de muestra con más de 25% de proteína cruda, 1g para rangos de 25 – 50% de proteína y 0.5g para materiales con más de 50% de proteína cruda. Transfírela a un matraz Kjeldahl y agregue aproximadamente 50 ml de agua

destilada, unos pocos gránulos de antiebulente y una o dos gotas del antiespumante.

Calentar a ebullición durante 30 minutos (teniendo cuidado de que no se seque). Cuando la muestra esté todavía caliente agregue 2 ml de la solución de sulfato de aluminio y potasio, mezcle perfectamente y caliente a ebullición, adicione 50 ml de la solución de acetato de cobre mezclando perfectamente bien y deje enfriar. Filtre usando vacío. Lave el matraz y el precipitado con 50 ml de agua destilada fría.

Para evaluar el nitrógeno proteico analice el residuo por medio de la marcha de nitrógeno total de Kjeldahl. El nitrógeno no proteico se analiza por medio de la misma técnica a partir del líquido filtrado. Los resultados respectivos de los sólidos y líquidos por medio de Kjeldahl ofrecerán directamente los datos de nitrógeno proteico (NP) y no proteico (NNP) respectivamente.

c. Enzimas proteasas Totales

La actividad proteolítica fue determinada con el método de Kunitz (1947), que se describe a continuación.

Reactivos:

- a) Solución de caseína al 1% en solución amortiguadora de fosfatos 0,05 M, pH 7,5.
- b) Solución de ácido tricloro acético al 5%.

Procedimiento:

Se prepararon tres series de tubos: 3 Blancos, 3 Testigos y 3 Tubos de reacción.

Los blancos se prepararon con 2 ml de la solución de caseína al 1% y se agregaron 3 ml de solución de ácido tricloroacético al 5%.

A los tubos testigo se agregó 1,9 ml de solución de caseína al 1% + 3 ml de solución de ácido tricloroacético al 5%; finalmente se adicionó 0,1 ml del cultivo (PMN).

Los tubos de reacción se prepararon con 1,9 ml de solución de caseína al 1%, se adicionó 0,1 ml del cultivo (PMN) y se incubaron durante 20 minutos a 40⁰C en un baño de temperatura controlada. La reacción fue detenida por adición de 3 ml de solución de ácido tricloroacético al 5%.

Todos los tubos (blancos, testigo y de reacción), se centrifugaron en una centrífuga a 3000 rpm durante 15 minutos y se determinó la absorbancia del sobrenadante a 280 nm en celdas de cuarzo en el espectrofotómetro Shimadzu UV- 160 A.

Los resultados se trataron y se reportaron en UE/ml de cultivo. Una unidad de actividad enzimática (UE), fue definida como la cantidad de enzima que produce un aumento en 0,001 unidades de absorbancia por minuto.

d. Enzimas Amilasas Totales

Se determinó la actividad de la enzima α -amilasa utilizando el método reportado por Bird y Hopkins (1954), basado en la utilización de una solución con 0,5 ml de una solución buffer de cloruro-acetato 0,15 M a pH 5 y 0,5 ml de una disolución con almidón al 0,1%, a la cual se adicionó 10 μ L del extracto enzimático, incubándose durante 8 min a 37⁰C. La reacción fue detenida con 4,5 ml de una solución I2/IK. La absorbancia se midió a una longitud de onda de 580 nm, reportando la actividad de la α -amilasa en unidades amilolíticas (UA/ml), las cuales se definen como la capacidad de hidrolizar 0,1 mg de almidón.

3. EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA

a. Bacterias lácticas

Para el análisis de las bacterias ácido lácticas se tomaron las muestras en las 0, 24, 48, 72 y 96 horas; el método consistió en:

Preparación y esterilización del material de vidrio

- Se lavó el material del laboratorio con detergente, se enjuagó con abundante agua de la llave y al final con agua destilada. Se secó el material de vidrio.
- Se colocaron los tubos y las cajas Petri en las bolsas de esterilización.
- Se introdujeron al autoclave por 15 minutos a 121°C.

Preparación del medio de cultivo

- Se siguieron las instrucciones del fabricante que fueron 70 g del medio en 1000 ml de agua destilada.
- Se agitó la mezcla en el agitador magnético hasta su completa disolución y se rotuló.
- Se esterilizó en el autoclave a una temperatura de 121 °C durante 15 minutos.
- En la cabina de flujo laminar, una vez estéril el medio, se distribuyó en las cajas Petri estériles, aproximadamente 20 ml por caja, se dejó en reposo hasta que solidificó.

Dilución del Preparado Microbiano Nativo a la 10^{-3}

- Se colocaron tres tubos de ensayo con 9 ml de agua destilada, se tomó un ml de PMN y se colocó en el primer tubo de ensayo.
- Se homogenizó en el Vortex por el lapso de 30 segundos.
- Se tomó la pipeta y se extrajo 1ml del primer tubo y se pasó al segundo tubo, de igual manera se homogenizó por 30 segundos en el Vortex.
- Se tomó la pipeta y se extrajo un ml del segundo tubo y se lo pasó al tercer tubo, se homogenizó 30 segundos en el Vortex.

Técnica por difusión de superficie de placa

- Se tomó en una pipeta 1 ml de muestra diluida correctamente (10^{-3} o 10^{-6}), se realizó el vertido en la caja Petri y se homogenizó la muestra en forma de 8 para una buena distribución de la muestra.
- Se llevó a la estufa y se incubó por 24-48 horas, a 37°C, colocadas las placas en forma invertida en una caja de anaerobiosis.
- Se contabilizaron las colonias y representaron en UFC por ml.

Una vez obtenidas las colonias de BAL se hace un cultivo puro de bacterias en agar MRS y con estos cultivos puros la tinción Gram de la siguiente forma:

1. Obtener 5 portaobjetos limpios.
2. Preparar un frotis de cada uno de los PMN.
 - a. Colocar una pequeña gota de agua en el centro de un portaobjetos limpio. Es necesaria muy poca cantidad de agua.
 - b. Flamear el asa de siembra y dejar enfriar. Tomar, en condiciones asépticas, una pequeña cantidad del cultivo bacteriano en medio sólido y transferirlo a la gota de agua. Remover la mezcla con el asa de siembra hasta formar una suspensión homogénea que quede bastante extendida para facilitar su secado.
 - c. Esperar hasta que el líquido se evapore o acelerar su evaporación acercando el portaobjetos a la llama del mechero. En este caso hay que tener mucha precaución de no calentar demasiado el portaobjetos pues las células pueden deformarse o romperse.
3. Teñir con cristal violeta agregando suficiente colorante y dejar que actúe durante 1 minuto.
4. Lavar suavemente con agua.
5. Inundar suavemente con el mordiente, yodo de Gram, y dejar actuar durante 1 minuto.
6. Lavar suavemente con agua.
7. Decolorar con alcohol etílico al 95%.
8. Lavar suavemente con agua.
9. Agregar la safranina para la tinción de contraste.
10. Lavar suavemente con agua.
11. Secar la preparación.
12. Examinar al microscopio con el objetivo 100X de inmersión de aceite.

b. Levaduras y Mohos

Para las levaduras y mohos se tomaron muestras en las 0, 24, 48, 72 y 96 horas; el método consistió en:

- Se preparó la muestra y las diluciones de los PMN (10^{-3} y 10^{-6}).
- Se colocó la placa Petrifilm™ Levaduras y Mohos 3M en la Cabina de Flujo Laminar y se levantó la película superior.
- Con la micropipeta perpendicular a la placa, se colocó 1ml de cada una de las muestras en el centro de cada una de las placas previamente identificadas.
- Se dejó caer la película superior sobre la muestra, cuidando que no se formen burbujas.
- Se colocó suavemente el dispersor plástico por el lado liso sobre la lámina superior, cubriendo el inóculo, y esperando dos minutos hasta que se solidifique el gel.
- Se incubaron las placas en la estufa a 25°C por 48 horas.
- Posteriormente se realizó el recuento de Unidades Formadoras de Colonia que en el caso de las levaduras se presentaron como puntos definidos de un color azul-verdoso.
- Se realizó el reporte de las UFC/ml, teniendo en cuenta la dilución aplicada.

c. Bacterias Coliformes Totales

Para las Coliformes totales se tomaron muestras en las 0, 24, 48, 72 y 96 horas; con el método que se detalla a continuación:

- Se preparó la muestra y las diluciones de los PMN (10^{-3} y 10^{-6}).
- Se colocó la placa Petrifilm™ Coliformes 3M en la Cabina de Flujo Laminar y se levantó la película superior.
- Con la micropipeta perpendicular a la placa, se colocó 1ml de cada una de las muestras en el centro de cada una de las placas previamente identificadas.
- Se dejó caer la película superior sobre la muestra, cuidando que no se formen burbujas.
- Se colocó suavemente el dispersor plástico por el lado liso hacia arriba, cubriendo el inóculo, y esperando dos minutos hasta que se solidifique el gel.
- Se incubaron las placas en la estufa a 37,5°C por 48 horas.

- Posteriormente se realizó el recuento de Unidades Formadoras de Colonia que presentaron un color rojo con presencia de gas.
- Se realizó el reporte de las UFC/ml, teniendo en cuenta la dilución aplicada.

d. Bacterias Aerobias Totales

Para la determinación de las bacterias aerobias totales se tomaron muestras a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas; con el siguiente método:

- Se preparó la muestra y las diluciones de los PMN (10^{-3} y 10^{-6})
- Se colocó la placa PetrifilmTM Aerobios 3M en la Cabina de Flujo Laminar y se levantó la película superior
- Con la micropipeta perpendicular a la placa, se colocó 1ml de cada una de las muestras en el centro de cada una de las placas previamente identificadas.
- Se dejó caer la película superior sobre la muestra, cuidando que no se formen burbujas
- Se colocó suavemente el dispensor plástico por el lado liso hacia arriba, cubriendo el inoculo, y esperando dos minutos hasta que se solidifique el gel
- Se incubaron las placas en la estufa a 37,5°C por 48 horas.
- Posteriormente se realizó el recuento de Unidades Formadoras de Colonia que en el caso de las levaduras se presentaron como puntos de color rojo.
- Se realizó el reporte de las UFC/ml, teniendo en cuenta la dilución aplicada.

e. *E coli*

Para las *E. coli* se tomaron muestras en las 0, 24, 48, 72 y 96 horas; con el método que se detalla a continuación:

- Se preparó la muestra y las diluciones de los PMN (10^{-3} y 10^{-6}).
- Se colocó la placa PetrifilmTM Coliformes y E Coli. 3M en la Cabina de Flujo Laminar y se levantó la película superior.
- Con la micropipeta perpendicular a la placa, se colocó 1ml de cada una de las muestras en el centro de cada una de las placas previamente identificadas.

- Se dejó caer la película superior sobre la muestra, cuidando que no se formen burbujas.
- Se colocó suavemente el dispersor plástico por el lado liso hacia arriba, cubriendo el inóculo, y esperando dos minutos hasta que se solidifique el gel.
- Se incubaron las placas en la estufa a 37,5°C por 48 horas.
- Posteriormente se realizó el recuento de Unidades Formadoras de Colonia que presentaron un color rojo con presencia de gas.
- Se realizó el reporte de las UFC/ml, teniendo en cuenta la dilución aplicada.

f. Biomasa bacteriana

Para la Biomasa Bacteriana se tomaron muestras en las 0 y 96 horas; el método consistió en:

- Tomar una muestra homogénea de 10 ml para centrifugar a 1000 rpm durante 10 minutos.
- Separar los sedimentos, y tomar el líquido para centrifugar 3000 rpm durante 20 minutos.
- El sedimento se re suspendió y se colocó 10 ml de agua destilada para volver a centrifugar a 3000 rpm por 10 minutos.
- Se llevó a la estufa a una temperatura de 60° C por 48 horas y se procedió a pesar en mg/ml para luego ser calculada en porcentaje.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. CARACTERIZACION FERMENTATIVA DEL PREPARADO MICROBIANO NATIVO CON POTENCIAL USO EN ANIMALES DOMESTICOS

1. Ácidos Orgánicos

Al evaluar el contenido de los ácidos orgánicos por HPLC tanto en la evaluación inicial como en la evaluación final, podemos resaltar que hubo únicamente la presencia de ácido láctico en las diferentes repeticiones que tiene un tiempo de retención de 5,23 minutos (anexo 2). Mediante el análisis de la estadística descriptiva, para el día inicial en el PMN tenemos un promedio de 1,45%, esta cantidad puede deberse al yogurt que se le agrega como parte de los ingredientes del preparado, este valor se incrementa con el paso de los días, teniendo a las 96 horas un promedio de 3,5% de ácido láctico, resultante de la presencia de las bacterias ácido lácticas que sintetizan este ácido como parte de su metabolismo. La presencia de este ácido en altas concentraciones es beneficioso ya que actúa como un conservante del producto y evita la proliferación de microorganismos patógenos.

Existen diversos géneros de BAL, sin embargo, estas son agrupadas como homofermentadoras o heterofermentadoras basado en el producto final de su fermentación. Las homofermentadoras como *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pedococcus*, *Vagococcus* y algunos *Lactobacillus* poseen la enzima aldolasa y producen ácido láctico como el producto principal de la fermentación de la glucosa utilizando la vía de la glucólisis (Embden-Mayerhof) (Axelsson, 1998). Por su parte, las del género *Leuconostoc* son heterofermentadoras y convierten hexosas a pentosas por la vía 6-fosfogluconato-fosfocetolasa, produciendo en el proceso además ácido láctico, cantidades significantes de otros productos como acetato, etanol y CO₂ (Carr, F. y col., 2002). En este caso tendríamos la presencia de bacterias del grupo homofermentadoras con gran producción de ácido láctico.

La acción conservadora de las BAL es debido a la inhibición de un gran número de microorganismos patógenos y dañinos por varios productos finales de la fermentación. Estas sustancias son ácidos: láctico, acético, etc. (Shirai y col., 1996).

La acumulación de ácido láctico y otros ácidos orgánicos producidos por las BAL, reduce el pH del ambiente con efecto inhibitorio de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. En ese sentido, el ácido láctico puede penetrar con mayor facilidad la pared celular microbiana donde el pH más alto del contenido celular promueve la disociación, dando lugar a la liberación de iones de hidrogeno y el anión correspondiente; de modo que, ambos iones interfieren en el metabolismo e inhiben el crecimiento celular (Vazquez y col., 2009). Cuando el oxígeno está presente, las BAL pueden producir peróxido de hidrogeno, el cual genera radicales hidroxilo que causan peroxidación a los lípidos de la membrana y susceptibilidad de la célula microbiana de muchos microorganismos (Ouweland, A.1999).

En las bacterias ácido lácticas su metabolismo productor de energía es estrictamente fermentativo, formando principalmente ácido láctico a partir de azúcares. Existen de dos tipos: las *homofermentadoras* que convierten la glucosa en ácido láctico vía glucólisis (Embden-Mayerhoff), y las *heterofermentadoras* que la convierten en una mezcla de ácido láctico, etanol, dióxido de carbono y otros productos volátiles mediante la ruta de la pentosa fosfato. La capacidad fermentativa varía de acuerdo a la especie. La mayor parte de bacterias lácticas forman entre 0,5 y 1,5% de ácido láctico, pero algunas alcanzan niveles del 3% (Bylund, G.2003).

2. Temperatura

La temperatura presentó variaciones dentro de las 96 horas de evaluación, es así que la temperatura inicial del PMN tuvo una media de 18,16 °C, dentro de las primeras 24 horas la temperatura tuvo un ligero incremento a 18,26 °C, mientras que a las 48 horas se detectó la temperatura más alta del PMN con una media de 19,10 °C, a las 72 horas la temperatura tuvo un importante descenso a 17,48 °C, y finalmente la temperatura a las 96 horas terminó siendo la más baja con 17,34 °C, como podemos apreciar (gráfico 1).

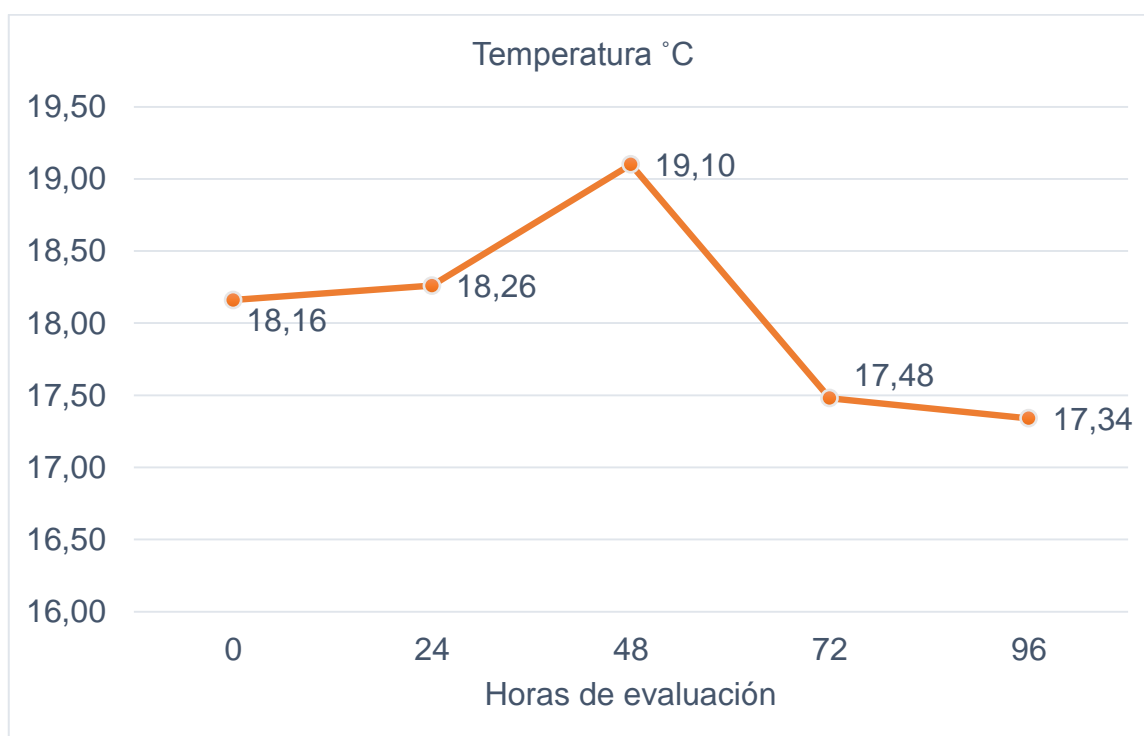


Gráfico 1. Evaluación de la temperatura del Preparado Microbiano Nativo con potencial uso en animales domésticos, durante diferentes periodos de tiempo.

Se menciona que la temperatura es uno de los parámetros ambientales más importantes que condicionan el crecimiento y la supervivencia de los microorganismos. La temperatura afecta a la velocidad de crecimiento. Cada bacteria (y suponiendo que el resto de condiciones ambientales se mantienen constantes) muestra una curva característica de tasa de crecimiento en función de la temperatura (Iáñez, E. 2005).

La fermentación aerobia se caracteriza por una reacción de síntesis o de asimilación, consistente en el aprovechamiento de elementos nutritivos, de materia orgánica, a los microorganismos. En este proceso se produce un rápido aumento de la temperatura que representa la retención de calor producido por la explosión del crecimiento microbiano que degrada los sustratos simples contenidos en la materia orgánica, estimulando el crecimiento de la microflora mesófila. A medida que se reduce la actividad microbiana se pierde más calor del sistema del que se genera. El material se enfría, llegando a la estabilización del mismo o maduración (Enciclopedia Medioambiental, 2015).

3. pH

El pH durante las 96 horas de evaluación tuvo notables cambios, es así que al inicio tuvo una media de 6,30, para las primeras 24 horas tuvo un descenso a 5,54, a las 48 horas se registró el mayor descenso de pH a 4,08, para las 72 hora siguientes disminuyó a 3,92, y para las 96 horas se registró el pH más bajo que fue de 3,90, como se muestra (gráfico 2).

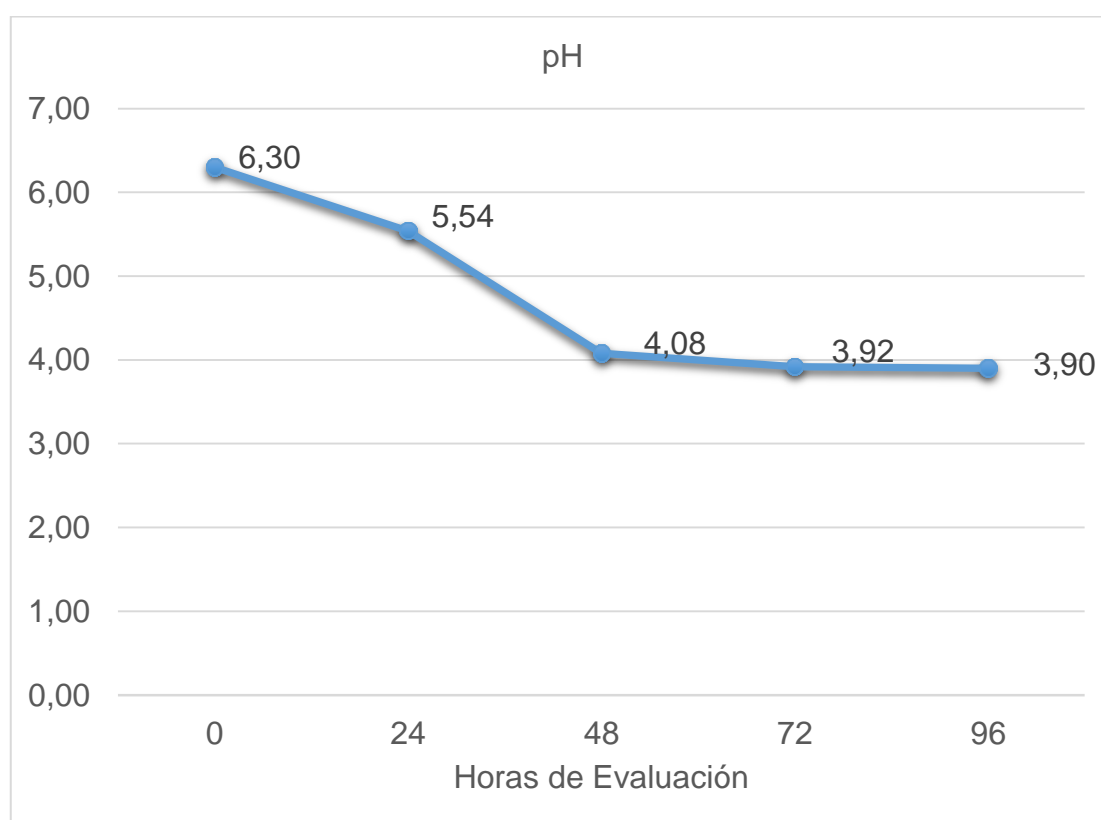


Gráfico 2. Evaluación del pH del Preparado Microbiano Nativo con potencial uso en animales domésticos, durante diferentes periodos de tiempo.

Mönckeberg, F. (1988) indica que el pH de crecimiento de los microorganismos varía entre 3,0 y 8,0. En forma general, las bacterias crecen a pH cercanos a la neutralidad (pH 7,0), con la importante excepción de las bacterias lácticas que resisten pH ácidos. Por el contrario, la mayoría de los hongos filamentosos y levaduras prefieren pH ácidos, de alrededor de 5,0. Ésta ácido-tolerancia otorga

una ventaja importante a las fermentaciones con hongos, ya que el riesgo de contaminación bacteriana es bajo.

En investigaciones realizadas en la Universidad Nacional de Colombia (2000) se encontró que el pH es un factor importante en la fermentación, debido a su importancia en el control de la contaminación bacteriana como también al efecto en el crecimiento de las levaduras y en la velocidad de fermentación. Durante la fermentación la levadura toma el nitrógeno de los aminoácidos orgánicos, perdiendo su carácter anfótero y pasando a ácidos, lo cual origina una disminución del pH del medio. Cuanto más bajo el pH del medio, tanto menor el peligro de infección.

Según menciona Jay, J. (2000), la mayoría de BAL toleran bien concentraciones relativamente altas de ácidos y valores de pH más bajos que el resto de las bacterias (algunas pueden crecer a pH 3, otras entre 6 y 9, pero la mayoría crece a un pH entre 4 y 4,5) por lo que pueden desplazarlas de los hábitats que lo colonizan.

Según un estudio realizado Sánchez, L. *et.al.* (2015) en cepas de *Lactobacillus spp.*, con capacidades probióticas aisladas del tracto intestinal de terneros neonatos se demostró que todos los aislados crecieron satisfactoriamente en todas las condiciones evaluadas; donde se reportaron rendimientos de células viables de pH comprendidos en un rango entre 6,4 a 2,5, y se observa que a un pH ácido el crecimiento bacteriano es apreciable.

El descenso del pH guarda una estrecha relación con la producción de ácido láctico por parte de las BAL, demostrado en su incremento notable de ácido láctico al inicio y su cantidad total a las 96 horas.

4. Grados Brix

El coeficiente de sacarosa o grados Brix durante las 96 horas de evaluación se mantuvo estable sin muchos cambios, es así que al inicio se observa una media de 6°Brix debido al ingrediente jugo de caña que es incorporado en esta etapa de la preparación del PMN, a las 24 hora se observa 5,7°Brix, a las 48 horas un pequeño descenso a 5°Brix, a las 78 horas un pequeño aumento a 5,4°Brix y

finalmente a las 96 horas la media fue de 5,1°Brix. Este coeficiente no guarda ningún tipo de correlación ni con la temperatura ni con el crecimiento bacteriano como se muestra (gráfico 3).

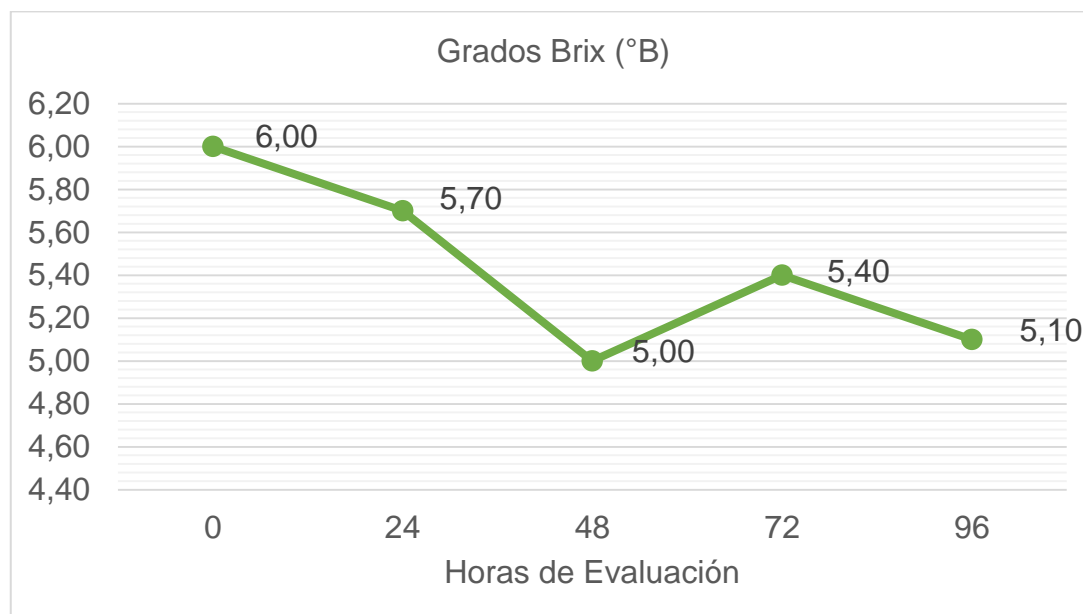


Gráfico 3. Evaluación del Coeficiente de Sacarosa del Preparado Microbiano Nativo con potencial uso en animales domésticos, durante diferentes periodos de tiempo.

Los grados Brix miden la cantidad de sólidos solubles presentes en un jugo o pulpa expresados en porcentaje de sacarosa. Los sólidos solubles están compuestos por los azúcares, ácidos, sales y demás compuestos solubles en agua presentes en los jugos. Se determinan empleando un refractómetro (Camacho G. 2002).

Campos R. *et. al.* (2001) en su investigación acerca de la Obtención de un probiótico de bifodobacterias utilizando como base Aguamiel, determinaron que las muestras de aguamiel estudiadas presentaron un variación en los grados Brix entre 8,9 y 11,8 durante su análisis.

5. Densidad Óptica por espectrofotometría

En la evaluación de la densidad óptica por espectrofotometría obtuvimos un promedio de 26.02×10^9 de UFC/ml, valor que fue únicamente analizado a las 96

horas, esto corresponde a un número representativo de bacterias al final de su evaluación.

B. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DEL PREPARADO MICROBIANO NATIVO CON POTENCIAL USO EN ANIMALES DOMÉSTICOS

1. Nitrógeno Total

El nitrógeno total se evaluó al inicio y a las 96 horas de la investigación, da como resultado una ligera disminución teniendo así una media para el nitrógeno inicial de 0,83 % y para las 96 horas tenemos una media de 0,81 %.

Según Serna, L. y Rodríguez, A. (2004), en su investigación titulada “Jugo de caña verde como sustrato en la producción fermentativa por lotes de ácido láctico”, determina que la adición de extracto de levadura en un 3 y un 5% al jugo de caña provee un contenido de nitrógeno total de 0,21 y 0,32% respectivamente; el hecho de que esta diferencia en adición de nitrógeno no hubiera mostrado en el análisis estadístico diferencias significativas, sugiere que es suficiente la adición de una mínima cantidad de sustancias nitrogenadas para una buena producción de ácido láctico, pero en investigaciones futuras se podrían estudiar fuentes más baratas de nitrógeno para ser adicionadas al Jugo de Caña Verde, y de igual forma el comportamiento en jugos de caña verde, de otras bacterias ácido lácticas comercialmente disponibles.

2. Proteína (%)

Al evaluar el contenido de proteína al inicio de la investigación dio como promedio un 4,128%, disminuyendo ligeramente al final de la evaluación a las 96 horas a un promedio de 4,062%. Al comparar con la investigación anterior “Formulación, Producción y Caracterización de tres simbióticos nativos destinados para la alimentación animal” (León, M. 2014), se tiene un valor similar al final de la investigación, pues el contenido de proteína bruta fue de 4,38%.

3. Enzimas proteasas Totales

La evaluación de las enzimas proteasas totales se realizó únicamente a las 96 horas de la investigación, teniendo como resultado un valor promedio de 68 UE/ml (UE: unidad de actividad enzimática) que se refiere a la cantidad de enzima que produce un aumento en 0,001 unidades de absorbancia por minuto).

Las proteasas de las bacterias ácido lácticas realizan el primer paso en la degradación de la caseína. Las proteasas han sido clasificadas de acuerdo a su actividad y propiedades, de la siguiente manera:

Tipo PI, que actúa sobre la β - caseína.

Tipo PIII, que actúa sobre la α s1-, κ - y β - caseína.

Tipo PI / PIII, que es una mezcla de las anteriores.

Estas proteasas que se encuentran ligadas a la pared celular, degradan la caseína de la leche y sus derivados para formar oligopéptidos, los cuales son transportados a través de las membranas por el sistema de transporte de oligopéptidos (Tjwantan, B. *et.al*, 1993; Juillard, V. *et al*, 1995).

Baqueira, A. (2004), en la determinación de la actividad proteolítica de bacterias utilizadas como probióticos en leches fermentadas, encuentra en una muestra de un producto denominado LC1 una actividad enzimática de 68 UE/ml, idéntica a la encontrada al análisis del PMN. Reuter, G. (1997), reporta que LC1, contiene *S.thermophilus* y *L. acidophilus*. Shihata, A. y Shah, N, (2000), mencionan que *L. acidophilus* crece lentamente en leche por carecer de actividad proteolítica, por lo que la práctica común es adicionar bacterias del yogurt (*S. thermophilus* y *L. delbrueckii bulgaricus*). La presencia de *S. thermophilus*, puede ser la razón por la que este producto presenta actividad proteolítica.

4. Enzimas Amilasas Totales

En el análisis de las enzimas amilasas totales que fueron evaluadas a las 96 horas de la preparación del PMN, no se halló su presencia, debido a la falta de

una fuente de almidón en la formulación del preparado que evitó la proliferación de bacterias productoras de estas enzimas como manifiestan Tripathi, P. *et al.* (2007), las amilasas son enzimas las cuales hidrolizan moléculas de almidón dando como productos dextrinas y polímeros compuestos progresivamente por unidades de glucosa. Esta familia de enzimas hidrolíticas está compuesta por proteínas catalíticas: alfa-amilasa, beta-amilasa, glucoamilasa, isoamilasa.

Además como explica Pedroza, A. (1999), esta enzima es estable a pH de 5,5-8,0 con una actividad optima de 5,9, al tener el PMN un pH ácido esta enzima no puede manifestarse, en el PMN al tener un pH final tan bajo de 3,9 no podría manifestarse.

C. CARACTERIZACION MICROBIOLOGICA DEL PREPARADO MICROBIANO NATIVO CON POTENCIAL USO EN ANIMALES DOMESTICOS

1. Bacterias Acido Lácticas

Las Bacterias Acido Lácticas presentaron una gran variación desde el inicio hasta el final de la evaluación, es así que a la hora 0 se determinaron $1,63 \times 10^5$ UFC/ml, para las siguientes 24 horas hubo un incremento a $7,68 \times 10^5$ UFC/ml, a las 48 horas se observó $13,84 \times 10^5$ UFC/ml, el mayor incremento se dio a las 72 horas 916×10^5 UFC/ml y las 96 horas se obtuvo una disminución de la población total a 270×10^5 UFC/ml como se muestra (gráfico 4).

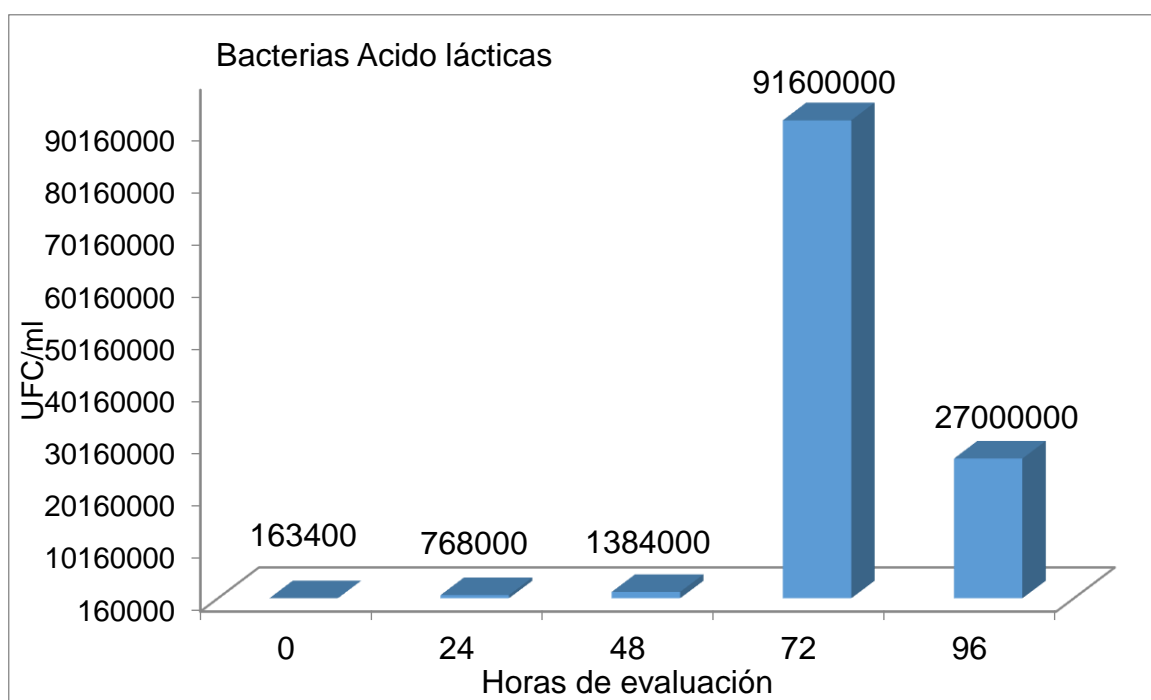


Gráfico 4. Evaluación de las bacterias ácido lácticas del Preparado Microbiano Nativo con potencial uso en animales domésticos, durante diferentes periodos de tiempo.

Vinderola, C. y Reinheimer, J. (2000) señalan que las cuentas de bacterias ácido lácticas deberán ser mayores a 1×10^7 UFC/ml para asegurar el efecto probiótico, en el PMN obtuvimos una carga final de $2,7 \times 10^7$ UFC/ml, con lo que se comprueba su efecto como probiótico.

Existen diversos tipos de BAL, sin embargo, éstas son agrupadas como géneros con características morfológicas, fisiológicas y metabólicas en común. En general las BAL son cocos o bacilos Gram positivos, no esporulados, no móviles, anaeróbicos, microaerofílicos o aerotolerantes; oxidasa, catalasa y bencidina negativas y producen ácido láctico como el único o principal producto de la fermentación de carbohidratos (Carr, F. *et al.* 2002). Además, las BAL son ácido tolerantes pudiendo crecer algunas a valores de pH tan bajos como 3,2, otras a valores tan altos como 9,6, y la mayoría crece a pH entre 4 y 4,5, permitiéndoles sobrevivir naturalmente en medios donde otras bacterias no soportarían la alta actividad producida por los ácidos orgánicos (Carr, F. *et al.* 2002).

Con la tinción Gram obtuvimos lo siguiente como se muestra (gráfico 6):

Cuadro 6. RESULTADOS DE LA TINCIÓN GRAM.

Muestra	Bacterias Gram +	Bacterias Gram -
PMN1	X	0
PMN2	X	0
PMN3	X	0
PMN4	X	0
PMN5	X	0

Según la morfología de las bacterias analizadas por la técnica de la tinción Gram se concluye que estas según su forma y características corresponden al grupo *Coccobacillus* Gram +, que son una de las morfologías que presentan las bacterias ácido lácticas.

Como indican Kandler, O. y Weiss, N.(1992), el género *Lactobacillus* se caracteriza por presentar células en forma de bacilos largos y extendidos, aunque con frecuencia pueden observarse bacilos cortos o coco-bacilos coryneformes.

2. Levaduras y Mohos

En el PMN no se encontraron mohos durante la evaluación ni al inicio ni al final, esto quiere decir que no hubo ningún tipo de contaminación que pudiera afectar al preparado.

En lo referente a levaduras se aprecia en el gráfico 5, desde el inicio, una media de $4,2 \times 10^3$ UFC/ml a la hora 0, a las 24 horas se incrementó a 456×10^3 UFC/ml, a las 48 horas hubo un pequeño decremento a 408.8×10^3 UFC/ml, para las 72 horas hubo un incremento exponencial a 17800×10^3 UFC/ml y finalmente a las 96 horas la media de levaduras fue de 25800×10^3 UFC/ml.

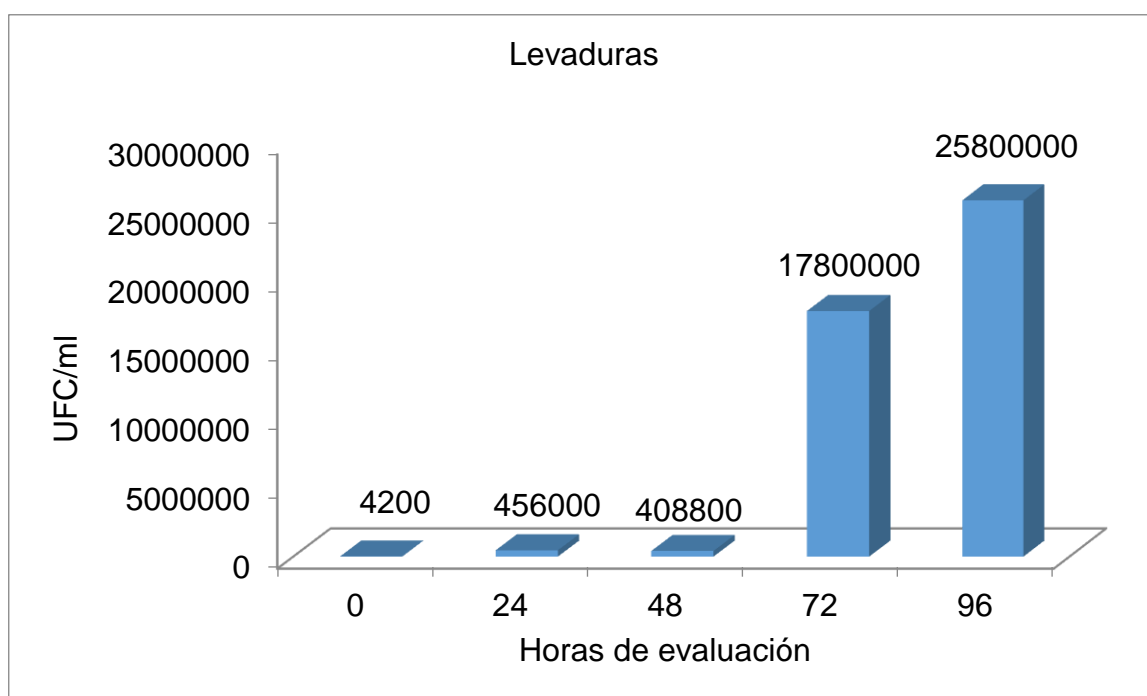


Gráfico 5. Evaluación de las levaduras del Preparado Microbiano Nativo con potencial uso en animales domésticos, durante diferentes periodos de tiempo.

Entre las principales especies de levaduras empleadas como probióticos se encuentran las siguientes: *Saccharomyces boulardii* (reconocida como líder), *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* y *Kluyveromyces fragilis* (Morales, J. 2004).

Como mencionan Schrezenmeir, J. y de Vrese, M. (2001), las levaduras constituyen una importante fuente para la obtención de productos con actividad probiótica, bien sea como cepas vivas o utilizando derivados a partir de sus paredes celulares. Estos preparados han manifestado una comprobada actividad inmunoestimulante en animales de granja, así como mejoras en los procesos de la fisiología digestiva, contribuyendo a obtener mejores resultados productivos. La levadura viva *S. cerevisiae* se recomienda para la alimentación animal en dosis de 1 g por cada 100 Kg de peso (Dawson, K. 1993). Es considerado primordial que la levadura permanezca metabólicamente activa para que resulte funcional y estimule el crecimiento y la actividad bacteriana para degradar la fibra e

incrementar la producción de ácidos orgánicos (acético, propiónico y láctico) (Stanley, V. et al. 1993).

Algunos autores han reportado, además, el uso de células de levaduras vivas como agentes para destoxificar las micotoxinas y otras toxinas de origen bacteriano como las secretadas por *C. difficile* y sus receptores en la mucosa colónica, así como la toxina del *Vibrio cholera* (Stanley, V. et al. 1993 y Baptista, A. et al. 2005). Daños severos en órganos, debido a las dietas que pudieran contener estas toxinas, fueron eliminados en presencia de *S. cerevisiae* por su capacidad para disminuir el estrés de los animales, proporcionando vitaminas, fuente de enzimas y proteínas (Reuter, G. 2001).

Entre otros de sus potenciales importantes, podemos mencionar que:

- Modulan el sistema inmune y las vías de transducción inducida por *E. coli* enteropatogénico.
- Estimulan la actividad de las enzimas digestivas.
- Reducen la colonización de algunos enteropatógenos.
- Producen cambios favorables en la mucosa intestinal.
- Mejoran el comportamiento productivo con raciones bajas en proteína

3. Coliformes Totales

Los Coliformes Totales que se evaluaron a lo largo de la investigación presentaron variaciones. Al inicio de la investigación la media fue de $7,4 \times 10^3$ UFC/ml, a las 24 horas se incrementaron a $17,8 \times 10^3$ UFC/ml, de igual forma aumentaron para las 48 horas a 47×10^3 UFC/ml, para las 72 horas se produjo un aumento exponencial de éstos a 100×10^3 UFC/ml, finalmente a las 96 horas se registró un descenso de su población a 40×10^3 UFC/ml como se puede observar (gráfico 6).

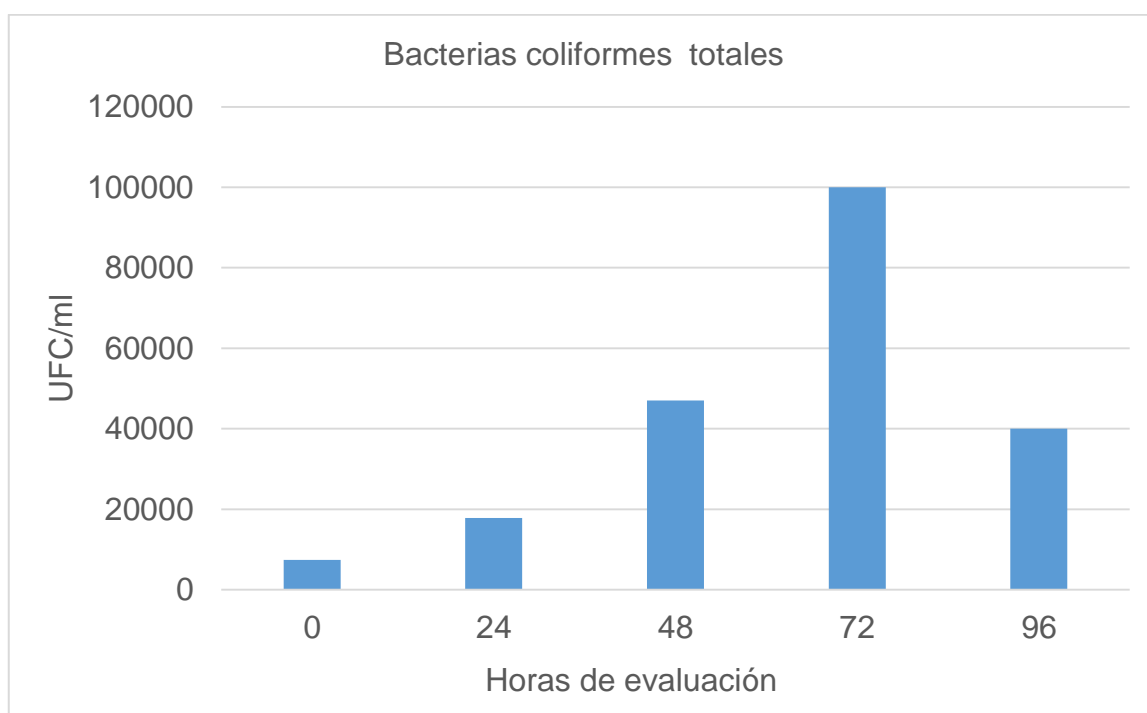


Gráfico 6. Evaluación de los Coliformes Totales del Preparado Microbiano Nativo con potencial uso en animales domésticos, durante diferentes periodos de tiempo.

Según afirma Canosa, A. (1995), el grupo de microorganismos coliformes es adecuado como indicador de contaminación bacteriana debido a que estos son contaminantes comunes del tracto gastrointestinal tanto del ser humano como de los animales de sangre caliente. Los microorganismos que conforman el grupo de los coliformes totales; *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Edwardsiella* y *Citrobacter*, viven como saprófitos independientes o como bacterias intestinales. El grupo de los coliformes totales incluye especies fecales y ambientales, se encuentran en el intestino del ser humano y de los animales, pero también en otros ambientes: agua, suelo, plantas, etc, (<http://fundacion.usal.es/microaguas>. 2015).

Prescott, L. *et al.* (1996), mencionan que los Coliformes Totales pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*, son bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos, no esporulantes, fermentadores de lactosa con producción de gas; constituyen aproximadamente el 10% de los microorganismos intestinales de los seres humanos y otros animales .

Se puede decir entonces que la carga de Coliformes Totales representa contaminación de algún tipo, en este caso puede estar relacionada con el uso del jugo de caña, ya que estas bacterias se encuentran también en plantas o en el suelo. Por otra parte, su descenso puede ser ocasionado por competencia con otras bacterias presentes como por ejemplo las bacterias lácticas, por disminución de nutrientes o por cambio del pH

4. Aerobios Totales

El contenido de bacterias Aerobias Totales durante las 96 horas de la evaluación tuvo variaciones como se puede observar en el gráfico 7, a la hora 0 se determinó una media de $9,52 \times 10^4$ UFC/ml, a las 24 horas hubo un ascenso a $95,6 \times 10^4$ UFC/ml, para las 48 horas se registró un importante aumento de estas bacterias a 7840×10^4 UFC/ml, de igual manera el pico de crecimiento de estas bacterias se registró a las 72 horas con una media de 12440×10^4 UFC/ml y finalmente se dio un descenso de éstas a las 96 horas de la evaluación quedando al final una carga de 5040×10^4 UFC/ml.

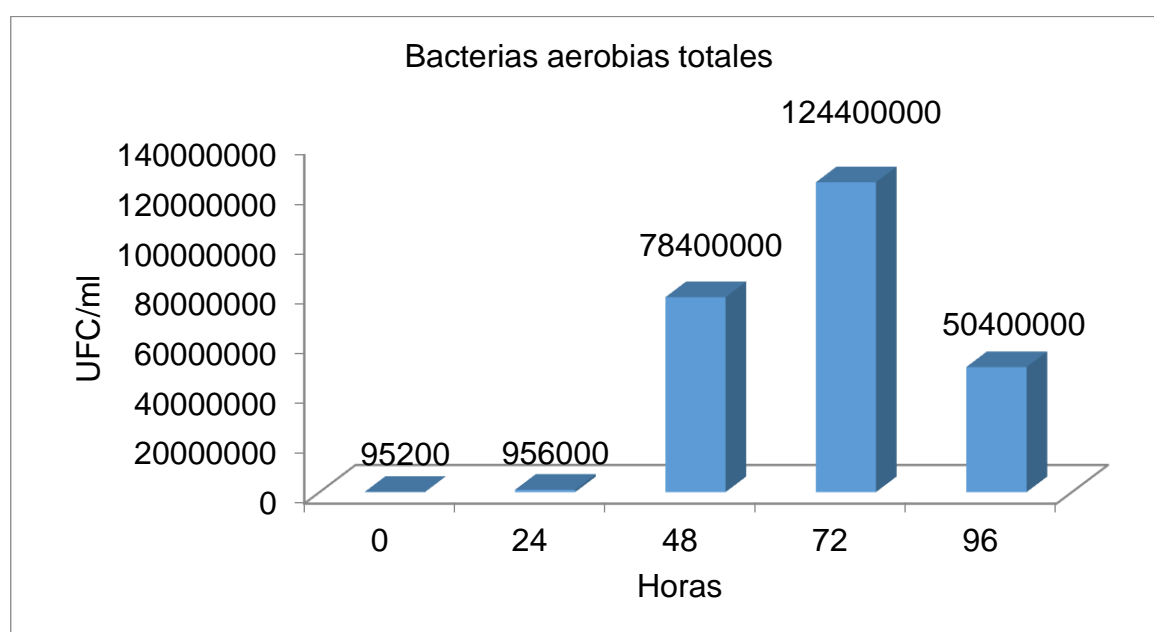


Gráfico 7. Evaluación de las Bacterias Aerobias Totales del Preparado Microbiano Nativo con potencial uso en animales domésticos, durante diferentes periodos de tiempo.

La fermentación láctica es causada por algunos hongos y bacterias. Al inicio hay una mezcla de bacterias aerobias, anaerobias facultativas y anaerobias junto con mohos y levaduras. Se inicia la fermentación y se produce una bajada inicial del pH que impide el crecimiento de Gram-negativos y de esporulantes (<http://www.unavarra.es> (2015)).

Como indican Macedo, M. y Vola, M. (2008), los aerobios comprenden un amplio conjunto de bacterias agrupadas por sus características morfológicas y tintoriales. Característicamente, dentro de este grupo se encuentran bacterias capaces de esporular. *Clostridium spp* y *Bacillus spp*, son capaces de sobrevivir en medios hostiles mediante la formación de una estructura muy resistente. La gran mayoría de las especies bacterianas de este grupo no son patógenos primarios. Muchos forman parte de la flora normal del cuerpo humano, los animales y se encuentran ampliamente distribuidos en el ambiente. Estas bacterias son propias del proceso de fermentación láctica y proceden de los componentes con los que se elaboró el PMN.

5. E. coli

La presencia de *E coli* durante el análisis fue variante, a las 0 horas se determinó una carga media de 200UFC/ml, esta carga aumenta exponencialmente a 5000UFC/ml a las 24 horas, y desciende a las 48 horas a 3800 UFC/ml, en las próximas 72 y 96 horas desaparecen del PMN como se puede apreciar (gráfico 8).

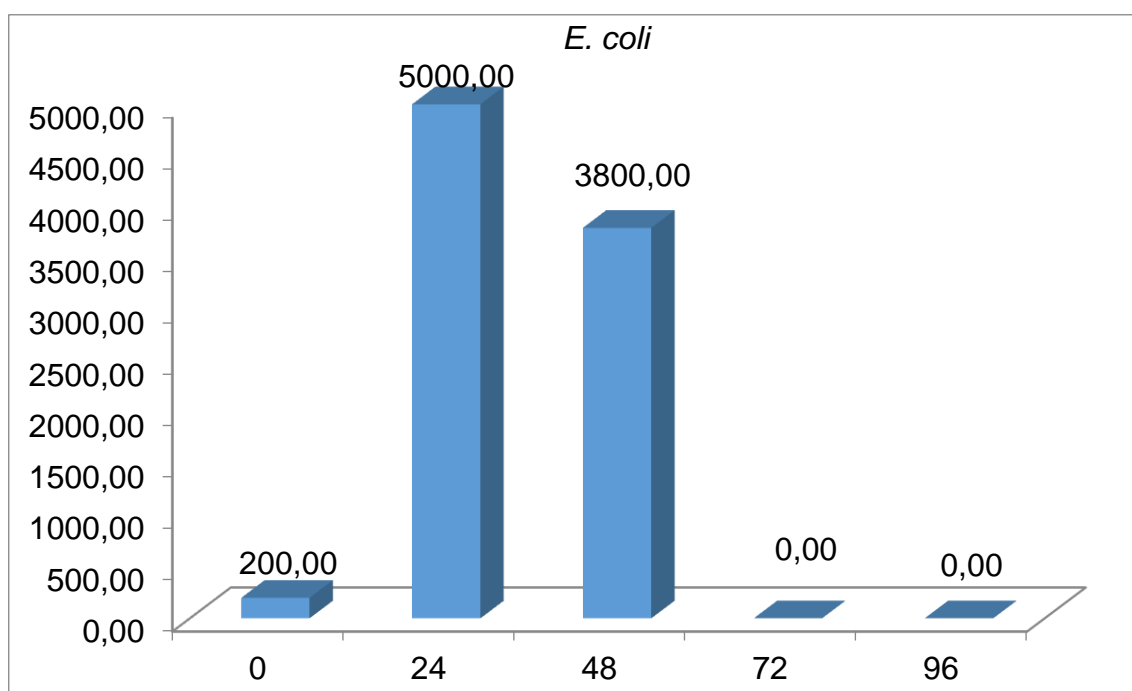


Gráfico 8. Evaluación de *E. coli* del Preparado Microbiano Nativo con potencial uso en animales domésticos, durante diferentes periodos de tiempo.

Fuller, R. (1989), demostró que puede detenerse el crecimiento de *E. coli* ajustando el pH de un medio de cultivo a 4,5 mediante la adición de ácido láctico o clorhídrico.

Años más tarde este mismo autor administrando yogurt (leche fermentada por *L. bulgaricus* y *S. termophilus*) a lechones destetados observó cómo descendía el recuento de *E. coli* en el estómago y duodeno afirmando que el efecto por el yogurt podría ser reproducido por leche acidificada por ácido láctico a un pH de 4,2.

Según Frazier, W. (1976) otra característica del grupo de bacterias ácido lácticas es su elevada tolerancia a pH ácidos, algunos sobreviven en rangos de pH entre 4,8 y 9,6. Produciendo el ácido láctico y secretando bacteriocinas crean un ambiente hostil que inhibe el crecimiento de algunas bacterias patógenas como *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia pseudotuberculosis* y *Shigella sonnei*.

6. Biomasa Bacteriana

La biomasa bacteriana encontrada al inicio de la investigación tuvo un promedio de 0,58% y al final de la investigación a las 96 horas hubo un incremento donde se reportó un promedio de 0,66%. Este valor es más bajo que el reportado por León, M. (2014) en el que se obtiene una biomasa al inicio de 1,3% y al final de la evaluación (96 horas) 1,7%.

V. CONCLUSIONES

1. Se determinó que el PMN presentó una fermentación de tipo aerobia con bacterias homofermentativas, del tipo ácido lácticas cuyo producto final de metabolismo fue el ácido láctico en un porcentaje promedio que fue a las 0 horas de 1,45% y a las 96 horas de 3,5% lo que guarda estrecha relación con la disminución del pH que se dio desde la hora 0 que fue de 6,3, llegando al final de la evaluación fue de 3,9 lo que evitó la proliferación de otros organismos patógenos, además se encontró la presencia de enzimas proteolíticas en una concentración considerable de 68 UE/ml.
2. En el PMN se determinaron cargas importantes de levaduras de 25800×10^3 UFC/ml y de bacterias ácido lácticas de 270×10^5 UFC/ml al final de la evaluación, lo que lo hace una importante fuente de probióticos. Al inicio de la evaluación la carga bacteriana de *E. coli* fue de 200 UFC/ml, desapareciendo por completo al final de la evaluación, dato que resulta muy beneficioso.
3. Se considera este PMN como apto para la alimentación animal, por sus posibles propiedades probióticas expresados en sus cargas de bacterias ácido lácticas de 2.7×10^7 UFC/ml, con lo que se proyecta como posible probiótico, ya que además posee ácido láctico y enzimas proteolíticas que contribuirían con beneficios para los animales que lo consuman.
4. La proyección comercial de este producto biotecnológico necesita pruebas de campo en animales domésticos.

VI. RECOMENDACIONES

En función de los resultados alcanzados se puede recomendar:

1. Replicar los análisis del contenido de ácidos orgánicos con una mayor frecuencia en su evaluación (a las 0, 24, 48,72 y 96 horas) para conocer el comportamiento de las bacterias presentes en el PMN.
2. Incluir el análisis de otros ácidos que no fueron analizados y que puedan traer algún beneficio para los animales.
3. Realizar análisis microbiológicos a nivel molecular para determinar los microorganismos específicos presentes en el PMN, las cepas de Levaduras y BAL principalmente, ya que con estos datos éste preparado tendría una posible validación como probiótico y luego podría proyectarse para complementarlo con un prebiótico y tener como producto final un simbiótico, destinado a la producción animal.
4. Investigar nuevas alternativas viables de fuentes de probióticos para reemplazar el uso de antibióticos en las explotaciones pecuarias y obtener así todos los beneficios.
5. Transferir estos conocimientos a los productores pecuarios, como una contribución a su actividad.

VII. LITERATURA CITADA

1. AIBA, Y. *et al.* 1998. Lactic acid-mediated suppression of helicobacter pylori by the oral administration of lactobacillus salivarius as a probiotic in a gnotobiotic murine model. *The American Journal of gastroenterology*, pp.2097-2101.
2. ALLGEYER, L. *et al.* 2010. Drivers of linking for yogurt drinks with prebiotics and probiotics. *Journal of Food Science*, 75(4), pp.S212-S219.
3. ARROYO, P. 2011. Ácidos Orgánicos, disponible en: <http://www.quimicayalgomas.com/quimica-organica/acidos-organicos-parte-1/>
4. ASHAYERIZADEH, A. *et al.* 2009. Effect of dietary antibiotic, probiotic and prebiotic as growth promoters, on growth performance, carcass characteristics and hematological indices of broiler chickens. *Pakistanian Journal of Biological Science*, 12, pp 52–57.
5. ASHWELL, M. 2005. Conceptos sobre Alimentos Funcionales. Disponible en: http://www.fmed.uba.ar/depto/nutrinormal/funcionales_fibra.pdf
6. AXELSSON, L. 1998. Lactic acid bacteria: Classification and Physiology. En: *Lactic acid bacteria, Microbiology and functional aspects.* (Salmien, S y Wright, A. von, eds.), 2nd edition. pp. 1-72. Marcel Dekker Inc. New York, USA.
7. AZAÏS-BRAESCO, V. *et al.* 2010. Not all lactic acid bacteria are probiotics, but some are. *British Journal of Nutrition*, 103, pp.1079–1081.

8. BAPTISTA, A. *et al.* 2005. Cells of yeasts adhered in corn grains and the storage perspective for use as probiotic. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 48(2):pp.15-20.
9. BIBEL, D. 1988. Bacillus of long life. *American Society for Microbiology News*, 54:pp. 661 – 665.
10. BIRD, R., & HOPKINS, R. H. 1954. The action of some α -amylases on amylose. *Biochemical Journal*, 56(1), pp.86–99.
11. BLAKE, D. *et al.* 2003. The use of a model ileum to investigate the effects of novel and existing antimicrobials on indigenous porcine gastrointestinal microflora: using vancomycin as an example. *Animal Feed Sci. and Tech.* pp. 103:123.
12. BOGUT, L. *et al.* 1998. Influence of probiotic (*Streptococcus faecium* M74) on growth and content of intestinal microflora in carp (*Cyprinus carpio*). *Czech Journal of Animal Science*, 43(5), pp. 231-235.
13. BRAMBILLA, G., DE FILIPPIS, S. 2005. Trends in animal feed composition and the possible consequences on residue tests. *Analytica Chimica Acta* 529: pp. 7-13.
14. BREZO, A., *et al.* 1999. *Emergence of a debate. AGP and Public Health. Human Health and Antibiotic Growth Promoters (AGP): Reassessing the risk.* Heidelberg Appeal Nederland Foundation, p.131.
15. BYLUND G. 2003, “Manual de Industrias Lácteas”, Mundi-Prensa, Madrid, España, pp.18, 30,56.
16. CAMACHO, G. 2002, Universidad Nacional de Colombia, procesamiento y conservación de la fruta, disponible en:

<http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/agronomia/2006228/teoria/obpulpfru/p1.htm>

17. CAMPOS, R. *et al.* 2001. Departamento de Graduados e Investigación en Alimentos. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas IPN Carpio y Plan de Ayala Col. Sto. Tomás. Disponible en: http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/veracruz01/TRABAJOS/AREA_II/CII-27.pdf
18. CANOSA, A. 1995. Indicadores bacteriológicos de eutrofización en los embalses de Chuza, Neusa y Tominé, y en la laguna de Chingaza. Bogotá, Colombia: Fundación Universidad de Bogotá· Jorge Tadeo Lozano, Centro de Investigaciones Científicas.
19. CAPCAROVA, M. *et al.* 2011. The effect of selected microbial strains on internal milieu of broiler chickens after per oral administration. *Research in Veterinary Science*, 91, pp. 132–137.
20. CARR, F. *et al.* 2002. The Lactic acid bacteria: A literatura survey. *Critical Reviess in Microbiology*.pp. 281-370.
21. CASTELLANOS, A., MURGUÍA, M. 1999. Evaluación de un probiótico para el control de Salmonella en pollos de engorde en Yucatán. *Vet. Méx.* pp. 30:243.
22. CHOCT, M. 2001. Alternatives to in-feed antibiotics in monogastric animal industry. *ASA Technical Bulletin*. AN 30. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/1930/193017845001.pdf>
23. COLLADO, M. 2004. Caracterización de cepas del género Bifidobacterium con carácter probiótico. Tesis Doctoral. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia. Disponible en: <http://riunet.upv.es>

24. COLLINS, M.D. & GIBSON, G.R. 1999. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *Am. J. Clin. Nutr.* 69: p.1052.
25. CORPOICA. 2011. Desarrollo de Probióticos para Ganaderías Productoras de Leche. Colombia. pp (61-75). Disponible en <http://corpomail.corpoica.org.co>.
26. DAWSON, K. 1993. Current and future role of yeast culture in animal production: a review of research over the last seven years. *Biotechnology in the Feed Industry* 9: pp. 1-21.
27. DE CHAMPS, C. *et al.* 2003. Persistence of colonization of intestinal mucosa by probiotic strain *Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus* Lcr35, after oral consumption. *J. Clin. Microbiol.* 3, pp.1270-1273.
28. DEGNAN, F. 2008. The US Food and Drug Administration and Probiotics: Regulatory Categorization. *Clinical Infectious Diseases*, 46, pp.133-136. Disponible en: <http://veterinaria.unmsm.edu.pe>.
29. DOYLE, M. 2001. Alternatives to Antibiotic Use for Growth Promotion in Animal Husbandry. Food Research Institute. Food Research Institute, FRI Briefings. University of Wisconsin. Madison, Wisconsin. April. pp: 1-17.
30. DRISKO, J. *et al.* 2003. Probiotics in health maintenance and disease prevention. Disponible en: Natural Standard Monograph www.naturalstandard.com/animal.com.ar
31. ENCICLOPEDIA MEDIOAMBIENTAL. 2015. Mecanismos de la Fermentacion Aerobia, disponible en:

http://www.ambientum.com/enciclopedia_medioambiental/suelos/mecanismos_fermentacion_aerobia.asp#

32. ETLÉVA, V. *et al.* 2010. Using combined probiotic to improve growth performance of weaned piglets on extensive farm conditions. *Livestock Science*, 134, pp.249–251.

33. FAO. 2007. Report on Functional food.

34. FERKET, P. *et al.* 2002. Benefits of dietary antibiotic and mannanoligosaccharide supplementation for poultry. Multi-State Poultry Meeting. Marriott Hotel, Indianapolis, Indiana, USA.

35. FOLIGNÉ, B., *et al.* 2010. Probiotic properties of non-conventional lactic acid bacteria: Immunomodulation by *Oenococcus oeni*. *International Journal of Food Microbiology*, 140, pp.136–145.

36. FOOKS, L. *et al.* 1999. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. *Int. Dairy J.*, 9, pp.53-61. Disponible en <http://riunet.upv.es>

37. FRAZIER, W. 1976. “Microbiología de los alimentos”, segunda edición, Editorial Acribia, Zaragoza, España, pp.57, 58,60-62.

38. FREITAS, M. *et al.* 2003. Host-pathogens crosstalk. Indigenous bacteria and probiotics also play the game. *Biol Cell*, pp. 95, 503-506.

39. FULLER, R. 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66: pp. 365–378. Disponible en <http://www.corpoica.org/>

40. GALATRO, D. 2014, Ácido acético y ácido láctico: ¿tienen propiedades nutricionales?, disponible en:

<http://conceptosdequimica.blogspot.com/2011/05/acido-acetico-y-acido-lactico-tienen.html>

41. GAMBOS, S. 1991. Lacto-sacc supplementation of diets fed growing pigs: Effects of various protein and energy sources. *Biotechnology in the feed industry. Proceeding of ALLTECHS.*
42. GARCÍA, P. *et al.* 2002. Metabolismo colónico de la fibra. *Nutrición Hospitalaria*, pp.17, 11.
43. GONZÁLEZ, A. 1998. Utilización de aditivos en piensos para rumiantes: minerales forma orgánica, levaduras, enzimas, ionóforos y otros. *XIV Curso de Especialización: Avances en nutrición y alimentación animal.*
44. GORBACH, S. 1996. The discovery of Lactobacillus GG. *Nutrition Today*; 31 (suppl 1):2S-4S.p. 11.
45. GOTTELAND, M. 2010. Alimentos Simbióticos. Disponible en: <http://www.dinta.cl>.
46. GUNTHER, K. 1995. *The role of probiotics as feed additives in animal nutrition.* Gottingen, Germany: Department of Animal Physiology and Animal Nutrition.
47. GUNTHER, K. 2003. Taxonomy, ecology and resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. *International J. Food Microbiology*, pp.88, 123.
48. GUTIÉRREZ, O. *et al.* 2002. Nuevos enfoques sobre el uso de aditivos en la alimentación animal. XVIII Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias (PANVET). Palacio de las Convenciones. Ciudad de la Habana, Cuba.

49. HAMILTON-MILLER JM, SHAH S, SMITH CT. 1996. «Probiotic» remedies are not what they seem (letter) ; 312: pp.55-56.
50. HASSAN A., FRANK, J. 2001. Starter cultures and their use. En H.E. Marth y L. Steele; Applied dairy microbiology. Second edition. Revised and expanded. Ed. Marcel Dekker, INC, New York, EEUU. 12.
51. HAVELAAR, A., *et al.* 2010. Future challenges to microbial food safety. International Journal of Food Microbiology, 139, pp.S79–S94. Disponible en: <http://riunet.upv.es>.
52. <http://fundacion.usal.es/microaguas>. 2015. Recuento de Coliformes Totales, Filtración a través de membrana.
53. IÁÑEZ, E. 2005, Microbiología General, Efecto de los factores ambientales sobre los procariotas, Universidad de Granada, disponible en: http://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/13agfisicos.htm#_Toc59451620
54. JANKOVIC, I. *et al.* 2010. Application of probiotic in food products - Challenges and new approaches. Current Opinion in Biotechnology, 21, pp.175–181.
55. JAY, J. 2000, Microbiología moderna de los alimentos. 4^a ed. Ed. Acribia. Zaragoza, España. pp 19-27, 106-108, 441-475.
56. JUILLARD, V. *et al.* 1995. Oligopeptides are the main source of nitrogen for *Lactococcus lactis* during Growth in milk. Applied and Environmental Microbiology, Aug 1995, pp. 3024 – 3030.
57. JUNGH, A., WADSTRÖM, T. 2009. Lactobacillus. Molecular biology. From genomics to probiotics. History of probiotics and living drugs. En

Lactobacillus Molecular biology. From genomic to probiotic. Disponible en: <http://riunet.upv.es>

58. KANDLER, O., WEISS, N. 1992. Regular nonsporing Gram-positive rods. P. 1208-1260. En P. H. A. Sneath, M. S. Mair, M. E. Sharpe y J. G. Holt (Editor). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 10th edition, vol. 2. The Williams and Wilkins Co; Baltimore
59. KUNITZ, M. 1947. Journal. G. Physiol., pp. 30, 29, disponible en <http://148.206.53.84/tesiuami/UAMI11125.pdf>
60. LARKIN, M. 1999. Probiotics strain for credibility. Lancet; 354: pp.1.884.
61. LEEDLE, J. 2000. Probiotic and DFMs - mode of action in the gastrointestinal tract. In: Simpósio sobre ADIT. ALTERN. na nutr. Anim. Anais.: pp. 27-43.
62. LEÓN, M. 2014. Formulación, producción y caracterización de tres simbióticos nativos destinados para la alimentación animal. pp. 31-45.
63. LILLY, M., STILLWELL, R., 1965. Probiotics: Growth-Promoting Factors Produced by Microorganisms. Science, 147(3659), pp.747 - 748.
64. MACEDO, M. Y VOLA, M. 2008. Principales grupos de bacilos Gram positivos aerobios, disponible en: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/grampositivosaerobios.pdf>
65. MARCA, J. 1999. Condicionantes físicos, químicos y biológicos de la respuesta inmune: inmunomoduladores, adyuvantes, adaptógenos. Seminario: Inmunoprolaxis en producción animal. Calier. Nutreco, Madrid.

66. MATÉ J., 1996. Fibra dietética en medicina: Actualización temática en Gastroenterología. Barcelona. Jarpyo Editores y Laboratorios Madaus.
67. METCHNIKOFF, E. 1907. Lactic acid as inhibiting intestinal putrefaction. En In: The prolongation of life: Optimistic studies. London.
68. MÖNCKEBERG, F. 1988 Producción microbiana industrial: Fermentación, Publicado en "La Revolución de la Bioingeniería", Editorial Mediterráneo, disponible en: <http://www.creces.cl/new/index.asp?imat=%20%20%3E%20%205&tc=3&nc=5&art=175>.
69. MORALES, J. 2004. Aplicación de un suplemento probiótico en la recuperación de un reemplazo de ponedora. IV Congreso de Avicultura, Stgo. de Cuba.
70. O'SULLIVAN, M. *et al.* 1993. Probiotic bacteria: myth or reality? Trends Food Sci, Technol. 21: pp.309 – 313.
71. ONIFADE, A. 1997. Growth performance, carcass characteristics, organ measurements and haematology of broiler chickens fed a high fibre diet supplemented with antibiotics or dried yeast. *Die Nahrung*. 41, pp. 370-374.
72. OUWEHAND, A. *et al.* 1999. Probiotics: mechanism and established effects. Int. Dairy J. pp. 9, 43.
73. PEDROZA, A. 1999. Producción de amilasa termoestable a partir de *Thermus* sp. Tesis de maestría. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Microbiología Industrial. Bogotá, Colombia. pp.18-19.

74. POLLMAND, D. 1986. *Probiotics in pig diets*. In: W. Haresing and D.J.A Cole (Eds.). *Recent Advances in Animal Nutrition*. London: Butterworths, pp. 193-205.
75. POT, B., TSAKALIDOU, E., 2009. Taxonomy and metabolism of Lactobacillus. En *Lactobacillus Molecular biology. From genomic to probiotic*. Disponible en: <http://riunet.upv.es>
76. PRESCOTT, L. *et al.* (1996), *Microbiología*. Editorial McGraw-Hill. Madrid, España.
77. QUIGLEY, E., 2010. Prebiotics and probiotics; Modifyng and mining the microbiota. *Pharmacological Research*, 61, pp.213–218.
78. RAMÍREZ, B. *et al.* 2005. Evaluación del efecto probiótico del Bacillus spp. Origen aviat en pollitas de inicio de remplazo de la ponedora comercial en los primeros 42 días de edad. *Revista electrónica veterinaria REDVET*.
79. REDONDO, L. 1999. La fibra terapéutica. Barcelona. Laboratorios Madaus: pp.27-40.
80. REUTER, G. 2001. Probiotics-possibilities and limitations of their application in food, animal feed, and in pharmaceutical preparations for men and animals. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 114: pp. 410-419.
81. ROBERFROID, M., 2000. Prebiotics and probiotics: are they functional foods? *Am J Clin Nutr*;71:1682S-7S.
82. ROJAS, E., 1994. La fibra dietética. En: Rojas Hidalgo E (ed). *Os carbohidratos en nutrición humana*. Madrid: Grupo Aula Médica: pp. 19-38.

83. ROKKA, S., *et al.* 2006. In vitro growth inhibition of helicobacter pylori by lactobacilli belonging to the lactobacillus plantarum group. 2006. Lett Appl Microbiol, 43(5), pp.508-513.
84. SALMINEN, S., *et al.* 1999. Probiotics: how should they be defined? Trends Food Science e Technology, pp.107-110.
85. SAMANIEGO, L. SOSA, M. 2002. Lactobacillus spp.: Importantes promotores de actividad probiótica, antimicrobiana y bioconservadora. Centro de Estudios Biotecnológicos. Facultad de Agronomía. Universidad de Matanzas “Camilo Cienfuegos”. Matanzas, Cuba. Disponible en: [.http://www.bibliociencias.cu](http://www.bibliociencias.cu)
86. SÁNCHEZ, L. *et.al.* 2015 Cepas de *Lactobacillus spp.* con capacidades probióticas aisladas del tracto intestinal de terneros neonatos, Rev. Salud Anim. vol.37 no.2 La Habana, disponible en http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0253-570X2015000200004&script=sci_arttext
87. SARMIENTO, L. 2008. Influencia del consumo de sorbitol en la microbiota intestinal de un modelo animal. Doctoral. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia.
88. SCHLEIFER, J. 1985. Areview of the efficacy and mechanism of competitive exclusión for the control of Salmonella in poultry. Word Poultry Science Journal, 41: pp. 72 – 83.
89. SCHNEITZ C, *et al.* 1993. Adhesion of Lactobacillus acidophilus to avian intestinal epithelial cells mediated by the crystalline bacterialcell surface layer (S – layer). Journal of applied Bacteriology, 74: pp. 290 – 294.

90. SCHREZENMEIR, J. Y DE VRESE, M. 2001. Probiotics, prebiotics and symbiotics approaching a definition. *Am. J. Clin. Nutr.* 73: pp. 361S-364S.
91. SENSES, S. *et al.* 2005, Caracterizacion of some yeast isolated from foods by traditional and molecular tests. *International Journal Of Food Microbiology*. Article in Press.
92. SERNA, L. Y RODRÍGUEZ, A. 2004. Jugo verde de caña como sustrato en la producción fermentativa por lotes de ácido láctico. *Revista Colombiana de Biotecnología* Vol. VI No. 2, pp. 37-42.
93. SHIHATA A., SHAH, N. 2000. Proteolytic profiles of yogurt and probiotic bacteria. *International Dairy Journal* 10, pp.401-408.
94. SHIRAI, K., Guerrero, I. y Lara, P. (1996). Bacterias lácticas en alimentos fermentados. *Ciencia*. 47: pp. 125-137.
95. SHUBERT, R. Y FLACKOWSKY, G. 1999. Vitamine und Zusatzstoffe in der Ernährung von Mensch und Tier. *7 Symposium Jenal/Thuringen*. Germany, pp. 515-518.
96. SIMON, O., *et al.* 2001. Probiotic feed additives— effectiveness and expected modes of action. *J Anim Feed Sci* 10: pp. 51– 67.
97. STANLEY, V. *et al.* 1993. The use of *Saccharomyces cerevisiae* to suppress the effects of aflatoxicosis in broiler chicks. *Poultry Sci.* 72: pp. 1867-1872.
98. STOKESTAD, E., JUKES, T. 1950. The multiple nature of the animal protein factor. *Journal of Biological Chemistry*, 180, pp. 647-654.

99. TEN BRINK, B. *et al.* 1987. Production of antibacterial compounds by Lactobacilli. *Microbiology Reviews*, pp. 46: 64.
100. TIMMERMANA, H. *et al.* 2004. Monostrain, multistrain and multispecies probiotics A comparison of functionality and efficacy. *International Journal of Food Microbiology*, 96, pp. 219– 233.
101. TJWANTAN B., POOLMAN B., AND KONINGS W. (1993). Proteolytic enzymes of *Lactococcus lactis*. *Journal of Dairy Research* 60: pp. 269-286.
102. TORRES, R., 1999. Flora intestinal, probióticos y salud. Guadalajara. Edit Gráfica Nueva, Yakult, DISPONIBLE EN: <http://bvs.sld.cu>
103. TRIPATHI, P. *et al.* (2007), Apha- amylase of mung bean (*vigna radiata*) correlation of biochemical properties and terciary structureby homology modelling. *Phytochemistry*. p. 1623.
104. TROWELL, H. *et al.* 1976. Dietary fiber redefined. *Lancet*;1:p. 8.
105. VELAZQUÉZ, O. *et al.* 1996. Butyrate and the colonocyte. Implications for neoplasia. *Dig Dis Sci*; 41: pp. 727-39.
106. VIMALA, Y., DILEEP, P. 2006. Some aspects of probiotics. *Ind. J of Microbiol.*, 46,pp. 1-7.
107. VINDEROLA, C. AND REINHEIMER, J. 2000, Enumeration of *Lactobacillus casei* in presence of *L. acidophilus*, *bifidobacteria* and lactic starter bacteria in fermented dairy products. *International Dairy Journal* 10, pp. 271-275.
108. WALKER, P., 2008. 10 years of functinal foods in Europe. *International Journal for vitamin and nutrition research*, p. 78.

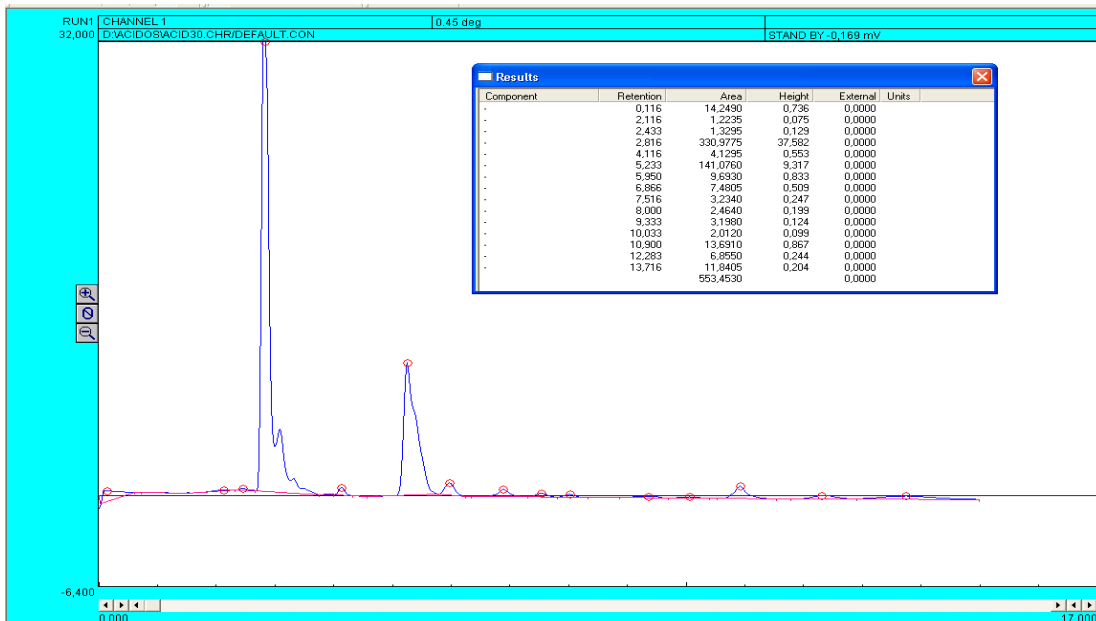
109. ZIMMERMANN, B., 2001. Pro and prebiotics in pig nutrition potential modulators of gut health? *J Anim Feed Sci* 10: pp. 47–56.

ANEXOS

Anexo 1. Resultado del análisis de los Ácidos Orgánicos

MUESTRAS	DIAS	Ácido láctico (%)	Ácido succínico (%)	Ácido propiónico (%)	Ácido acético (%)	Ácido piruvico (%)	Ácido butírico (%)
PMN1	1	1.39	0	0	0	0	0
	5	5.12	0	0	0	0	0
PMN2	1	1.5	0	0	0	0	0
	5	3.08	0	0	0	0	0
PMN3	1	1.5	0	0	0	0	0
	5	2.33	0	0	0	0	0
PMN4	1	1.32	0	0	0	0	0
	5	3.21	0	0	0	0	0
PMN5	1	1.54	0	0	0	0	0
	5	3.77	0	0	0	0	0
PROMEDIO	1	1.45	0	0	0	0	0
PROMEDIO	2	3.50	0	0	0	0	0

Anexo 2. Evaluación del contenido de ácido láctico cuantificado por HPLC (5.23 tiempo de retención) del PMN2 a las 96 horas



Anexo 3. Estadística descriptiva de la variable pH

Variable	pH				
	0	24	48	72	96
Media	6.30	5.54	4.08	3.92	3.90
Error típico	0.03	0.05	0.07	0.06	0.05
Mediana	6.30	5.50	4.10	3.90	3.90
Moda	6.30	5.50	4.10	3.80	3.90
Desviación estándar	0.07	0.11	0.15	0.13	0.12
Varianza de la muestra	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02
Curtosis	2.00	-0.18	0.87	-1.49	2.00
Coefficiente de asimetría	0.00	0.40	0.55	0.54	1.36
Rango	0.20	0.30	0.40	0.30	0.30
Mínimo	6.20	5.40	3.90	3.80	3.80
Máximo	6.40	5.70	4.30	4.10	4.10

Anexo 4. Estadística descriptiva de la variable Temperatura

Variable	TEMPERATURA				
	0	24	48	72	96
Media	18.16	18.26	19.10	17.48	17.34
Error típico	0.093	0.051	0.000	0.049	0.024
Mediana	18.200	18.300	19.100	17.500	17.300
Moda	–	18.300	19.100	17.500	17.300
Desviación estándar	0.207	0.114	0.000	0.110	0.055
Varianza de la muestra	0.043	0.013	0.000	0.012	0.003
Curtosis	-1.963	-0.178	–	2.917	-3.333
Coefficiente de asimetría	-0.236	-0.405	–	-1.293	0.609
Rango	0.500	0.300	0.000	0.300	0.100
Mínimo	17.900	18.100	19.100	17.300	17.300
Máximo	18.400	18.400	19.100	17.600	17.400

Anexo 5. Estadística descriptiva de los Grados Brix

Variable	Grados Brix (°B)				
	0	24	48	72	96
Media	6.00	5.70	5.00	5.40	5.10
Error típico	0.00	0.12	0.00	0.10	0.10
Mediana	6.00	5.50	5.00	5.50	5.00
Moda	6.00	5.50	5.00	5.50	5.00
Desviación estándar	0.00	0.27	0.00	0.22	0.22
Varianza de la muestra	0.00	0.08	0.00	0.05	0.05
Curtosis	–	-3.33	–	5.00	5.00
Coefficiente de asimetría	–	0.61	–	-2.24	2.24
Rango	0.00	0.50	0.00	0.50	0.50
Mínimo	6.00	5.50	5.00	5.00	5.00
Máximo	6.00	6.00	5.00	5.50	5.50

Anexo 6. Promedios de la Densidad óptica por espectrofotometría

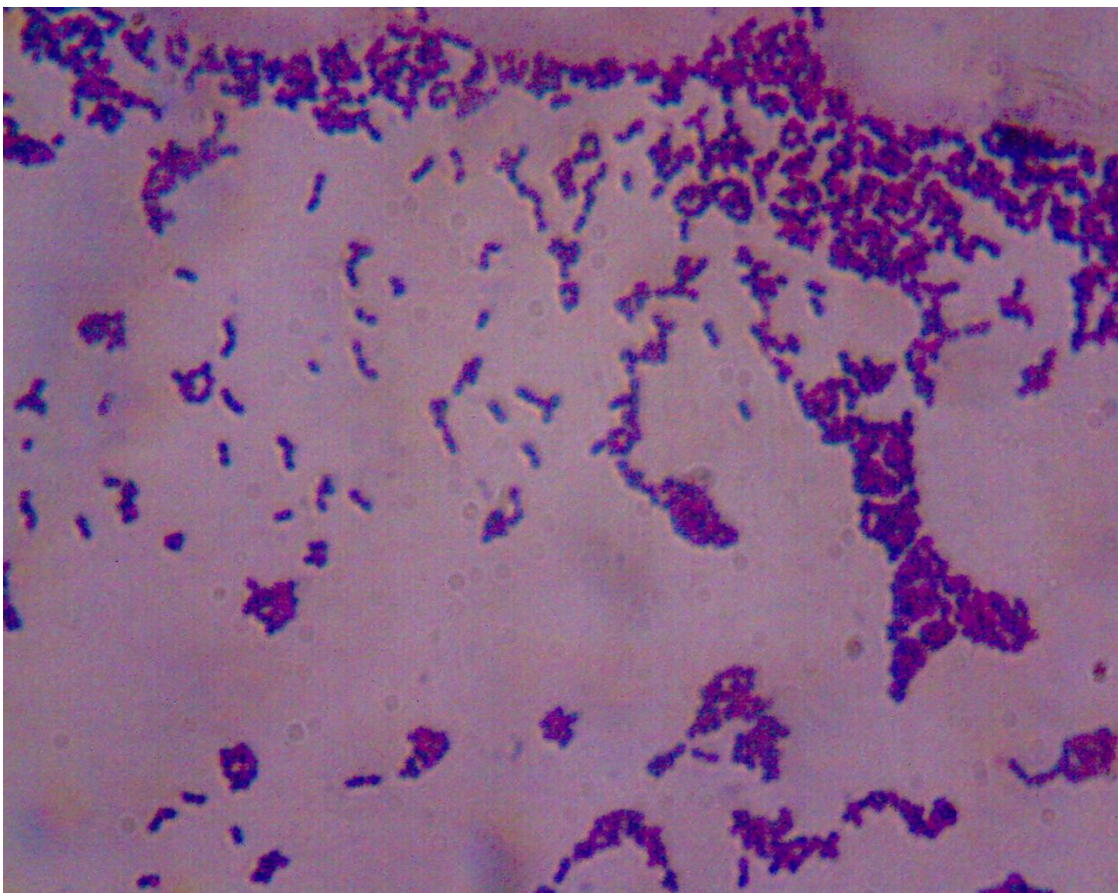
MUESTRAS	DIAS	Densidad Óptica por Espectrofotometría UFC/ml
PMN1	5	24620000000
PMN2	5	26250000000
PMN3	5	27130000000
PMN4	5	26720000000
PMN5	5	25360000000

Biomasa bacteriana %	Promedio
Día 1	0.582
Día 5	0.66

Anexo 7. Estadística descriptiva de la evaluación de Bacterias Acido Lácticas

Variable	Bacterias ácido lácticas (UFC/ml)				
	1	2	3	4	5
Media	163400	768000	1384000	91600000	27000000
Error típico	23164	101311	124161	39634076	20787015
Mediana	194000	720000	1520000	70000000	9000000
Moda	-	-	-	-	9000000
Desviación estándar	51796	226539	277633	88624489	46481179
Varianza de la muestra	2682800000	51320000000	77080000000	7854300000000000	2160500000000000
Curtosis	-3	-1	-2	1	5
Coefficiente de asimetría	-1	0	0	1	2
Rango	104000	580000	640000	216000000	107000000
Mínimo	102000	500000	1040000	15000000	3000000
Máximo	206000	1080000	1680000	231000000	110000000

Anexo 8. Bacterias Ácido Lácticas Gram+ (Coccobacillus) encontradas en el PMN



Anexo 9. Estadística descriptiva de la evaluación de las Levaduras

Variable	Levaduras (UFC/ml)				
	0	24	48	72	96
Media	4200	456000	408800	17800000	25800000
Error típico	583	36000	28939	7844743	2222611
Mediana	4000	460000	420000	8000000	25000000
Moda	3000	–	–	5000000	–
Desviación estándar	1304	80498	64709	17541380	4969909
Varianza de la muestra	1700000	6480000000	4187200000	307700000000000	247000000000000
Curtosis	-1	-1	-3	0	2
Coefficiente de asimetría	1	-1	0	1	1
Rango	3000	200000	140000	40000000	13000000
Mínimo	3000	340000	340000	5000000	21000000
Máximo	6000	540000	480000	45000000	34000000

Anexo 10. Estadística descriptiva de la evaluación de Coliformes Totales

Variable	Bacterias coliformes (UFC/ml)				
	0	24	48	72	96
Media	7400	17800	47000	100000	40000
Error típico	1631	1881	4827	44721	24495
Mediana	7000	18000	45000	100000	0
Moda	7000	–	–	200000	0
Desviación estándar	3647	4207	10794	100000	54772
Varianza de la muestra		17700000	116500000	10000000000	3000000000
Curtosis	1	0	-2	-3	-3
Coefficiente de asimetría	0	1	0	0	1
Rango	10000	11000	25000	200000	100000
Mínimo	2000	13000	36000	0	0
Máximo	12000	24000	61000	200000	100000

Anexo 11. Estadística descriptiva de la evaluación de las Bacterias Aerobias

Variable	Bacterias aerobias totales (UFC/ml)				
	0	24	48	72	96
Media	95200	956000	78400000	124400000	50400000
Error típico	10495	27129	2293469	13987852	1886796
Mediana	89000	960000	78000000	117000000	51000000
Moda	–	–	–	–	–
Desviación estándar	23467	60663	5128353	31277788	4219005
Varianza de la muestra	55070000	368000000	2630000000000	97830000000000	17800000000000
Curtosis	0	0	0	0	0
Coefficiente de asimetría	-1	0	-2	3	1
Rango	0	0	0	1	-1
Mínimo	61000	160000	12000000	83000000	11000000
Máximo	65000	880000	73000000	93000000	44000000
	126000	1040000	85000000	176000000	55000000

Anexo 12. Estadística descriptiva de la evaluación de *E. coli*

Variable	E Coli (UFC/ml)				
	0	24	48	72	96
Media	200	5000	3800	0	0
Error típico	200	1304	970	0	0
Mediana	0	4000	5000	0	0
Moda	0	3000	5000	0	0
Desviación estándar	447	2915	2168	0	0
Varianza de la muestra	200000	8500000	4700000	0	0
Curtosis	5	3	-2	–	–
Coefficiente de asimetría	2	2	-1	–	–
Rango	1000	7000	5000	0	0
Mínimo	0	3000	1000	0	0
Máximo	1000	10000	6000	0	0

