



**BAGAZO DE MANZANA FERMENTADO Y ADITIVO DE LEVADURAS EN
DIETAS PARA TILAPIA (*Oreochromis niloticus*) EN ETAPA DE
CRECIMIENTO**

POR:

M. C. JOSÉ LUIS GUEVARA VALDEZ

**Disertación presentada como requisito parcial para obtener el grado de
Doctor in Philosophia**

Área Mayor: Nutrición Animal

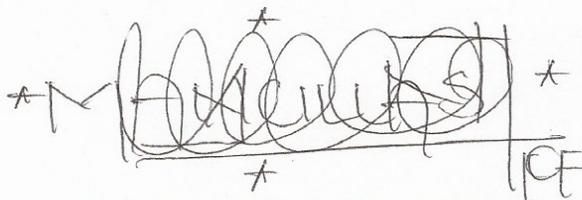
**Universidad Autónoma de Chihuahua
Facultad de Zootecnia y Ecología
Secretaría de Investigación y Posgrado**

Bagazo de manzana fermentado y aditivo de levaduras en dietas para tilapia (*Oreochromis niloticus*) en etapa de crecimiento. Disertación presentada por José Luis Guevara Valdez como requisito parcial para obtener el grado de Doctor in Philosophia, ha sido aprobada y aceptada por:

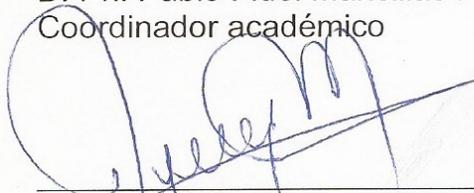
M. A. Luis Raúl Escárcega Preciado
Director de la Facultad de Zootecnia y Ecología



M. C. Antonio Humberto Chávez Silva
Secretario de Investigación y Posgrado



D. Ph. Pablo Fidel Mancillas Flores
Coordinador académico



D. Ph. Carlos Rodríguez Muela
Presidente

JULIO 06 - 2016

Fecha

Comité:

D. Ph. Carlos Rodríguez Muela
D. Ph. Daniel Díaz Plascencia
Dr. Rubén Márquez Meléndez
Dr. Eduardo Santellano Estrada
Ph. D. Lorenzo Antonio Durán Meléndez

© Derechos Reservados

José Luis Guevara Valdez
PERIFÉRICO FRANCISCO R.
ALMADA KM. 1, CHIHUAHUA,
CHIH., MÉXICO C.P. 31453

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer primeramente al D. Ph. Carlos Rodríguez Muela, por haberme apoyado, guiado y, sobre todo, por seguirme en mis ideas a lo largo de estos tres años de tesis.

A todos mis profesores del doctorado, por haberme brindado sus conocimientos y consejos durante mi formación y la realización de la tesis.

A CONACYT por haberme apoyado durante estos tres años que duró el doctorado, pues sin su apoyo y financiamiento este proyecto no hubiera sido posible.

Al Q. B. P. Juan Roberto Muñoz Ortiz y a José Antonio Arzaga que siempre me ayudaron con mis pescados, sin importar el día o la hora.

DEDICATORIA

Les dedico esta tesis a mi padre y a mi madre, las personas más importantes en mi vida, quienes siempre me han apoyado y dado ánimos para salir adelante.

Dedico esta tesis y este doctorado a Laura, mi preciosa esposa, mi compañera en este viaje a través del tiempo y el espacio.

Y por último, a mi abuelita Quina, quien me enseñó que siempre se puede ver más allá de lo que tus ojos te permiten.

CURRICULUM VITAE

El autor nació el 13 de enero de 1983 en Nuevo Laredo, Tamaulipas, México.

- | | |
|-----------------|--|
| 2005 - 2009 | Realizó los estudios de licenciatura en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua, obteniendo el título de Químico Bacteriólogo Parasitólogo. |
| 2010 - 2012 | Cursó la Maestría en la Facultad de Ciencias Químicas, de la Universidad Autónoma de Chihuahua, obteniendo el grado de Maestro en Ciencias, en Ciencia y Tecnología de Alimentos. |
| 2013 - 2015 | Estudiante del programa Doctoral en Producción Animal, en el área de Nutrición Animal, en la Facultad de Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua. |
| 2015 a la fecha | Profesor Titular de las materias de Nutrición Animal, Bioquímica, Bioquímica de los Alimentos y Química Orgánica de la carrera de Ingeniero Zootecnista en Producción de la Facultad de Zootecnia y Ecología de la U.A.Ch. |

RESUMEN GENERAL

BAGAZO DE MANZANA FERMENTADO Y ADITIVO DE LEVADURAS EN DIETAS PARA TILAPIA (*Oreochromis niloticus*) EN ETAPA DE CRECIMIENTO

POR:

M. C. JOSÉ LUIS GUEVARA VALDEZ

Doctor in Philosophia en Producción Animal

Secretaría de Investigación y Posgrado

Facultad de Zootecnia y Ecología

Universidad Autónoma de Chihuahua

Presidente: D. Ph. Carlos Rodríguez Muela

En el presente estudio se llevaron a cabo varios experimentos para evaluar el efecto del bagazo de manzana fermentado y el uso de un aditivo a base de levaduras en la dieta de peces tilapia (*Oreochromis niloticus*) durante la etapa de crecimiento. Para ello fueron preparados tanto el bagazo fermentado como el aditivo de levaduras mediante procesos fermentativos aeróbicos. Durante la elaboración del inóculo de levaduras se evaluó el efecto de dos aditivos naturales: Zeolita y Aceite Esencial de Orégano (AEO), sobre los parámetros de seguridad microbiológica, donde el tratamiento adicionado con AEO presentó una considerable disminución de bacterias aeróbicas mesofílicas. No se diferenció significativamente contra el control en la cuenta de levaduras a las 48 h ($P > 0.05$). En otro estudio se evaluó el efecto antimicrobiano del AEO y la zeolita en la fermentación en estado sólido (FES) de bagazo de manzana, donde se obtuvo el crecimiento máximo de levaduras a las 48 h con la adición de ambos tratamientos (462×10^6 cel/g), mientras que el control lo logró a las 96 h (470.5

$\times 10^6$ cel/g), reduciendo el tiempo de fermentación tradicional y optimizando el proceso. El ensayo *in vivo* se realizó en un sistema cerrado de peceras, con condiciones controladas de oxigenación, pH y calidad de agua, durante 8 semanas. Se tomaron semanalmente las dimensiones morfométricas de los peces, y una vez determinados los parámetros productivos de peces juveniles en etapa de crecimiento, estos se sacrificaron para determinar el rendimiento de filete. Se encontró que los peces alimentados con el BMF presentaron un mayor peso, con 37.93 g, mientras que el tratamiento control tuvo un peso de 34.92 g ($P > 0.05$). Los tratamientos adicionados con el inóculo de levadura se situaron en los 32.42 g, siendo menores ($P > 0.05$). La ganancia de longitud también fue un parámetro que presentó variación por tratamiento, quedando el tratamiento con BMF superior (92.19 mm) respecto al control (88.38 mm), y al igual que en las demás variables, la ganancia de longitud de los peces alimentados con el inóculo de levaduras fue considerablemente menor (83.84 mm; $P > 0.05$).

ABSTRACT GENERAL

FERMENTED APPLE POMACE AND A YEAST INOCULUM UTILIZATION IN YOUNG TILAPIA (*Oreochromis niloticus*) DIETS

BY:

JOSE LUIS GUEVARA VALDEZ

In the present study, several experiments were conducted to evaluate the effect of fermented apple pomace (FAP) and a yeast-based additive in the diet of tilapia (*Oreochromis niloticus*) during the growth stage. For that, both fermented bagasse and the yeast inoculum were prepared by aerobic fermentation processes. During the preparation of yeast inoculum, the effect of two natural additives was evaluated, being Zeolite and Oregano Essential Oil (OEO) on microbiological safety parameters, where OEO treatment showed a considerable decrease in mesophilic aerobic bacteria. There was not significantly difference against the account control yeast at 48 h ($P > 0.05$). The *in vivo* assay was performed in a closed system of fish tanks, with controlled oxygen conditions, pH and water quality, for 8 weeks. They were taken weekly morphometric dimensions of the fish, and once the production parameters of juvenile fish in growth stage were taken, they were sacrificed to determine the performance of fillet. It was found that fish fed the FAP had a higher weight at the end of the experiment, with 37.93 g, while the control treatment had a weight of 34.92 g ($P > 0.05$). The treatments that were added with yeast inoculum were at 32.42 g, being lower ($P > 0.05$). The length gain was also a parameter that showed variation per treatment, being FAP treatment the highest (92.19 mm) against to the control (88.38 mm), and as in the other variables, the gain length of the fish fed yeast

inoculum was considerably lower (83.84 mm; $P > 0.05$). In the second study the antimicrobial effect of essential oil of oregano and zeolite in the solid state fermentation (SSF) was evaluated, where the maximum growth of yeasts was obtained at 48 h with the addition of both treatments (462×10^6 cells / g), whereas control succeeded at 96 h (470.5×10^6 cells / g), reducing time and optimizing traditional fermentation process.



CONTENIDO

	Página
RESUMEN GENERAL	vi
ABSTRACT	viii
LISTA DE CUADROS.....	xiii
LISTA DE GRÁFICAS	xiv
LISTA DE FIGURAS.....	xv
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
Acuicultura	3
Alimentación en la Acuicultura	5
La Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>) y su Cultivo	7
Bagazo de Manzana	8
Compuestos Funcionales en Nutrición Animal.....	8
Probióticos en Nutrición Animal	11
Fermentación en Estado Sólido	13
Aceite Esencial de Orégano.....	14
Zeolita.....	18
LITERATURA CITADA	19
ESTUDIO I. USO DE DOS ADITIVOS ANTIMICROBIANOS NATURALES EN LA FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO DEL BAGAZO DE MANZANA.....	22
RESUMEN.....	23
ABSTRACT	25



INTRODUCCIÓN.....	26
MATERIALES Y MÉTODOS	29
Variables Evaluadas.....	32
Cuenta de bacterias.....	32
Levaduras	32
pH	33
Actividad antioxidante.....	33
Proteína	33
Análisis Estadístico	33
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	45
LITERATURA CITADA.....	46
ESTUDIO II.- USO DE DOS ADITIVOS ANTIMICROBIANOS NATURALES EN LA PRODUCCIÓN DE UN INÓCULO DE LEVADURAS PROBIÓTICAS	48
RESUMEN.....	49
ABSTRACT	51
INTRODUCCIÓN.....	52
MATERIALES Y MÉTODOS	54
Variables de Respuesta	57
Cuenta bacteriológica	57
Cuenta de levaduras.....	57
pH	58



Sólidos solubles.....	58
Diseño Experimental	58
Técnica Estadística para la Prueba de Hipótesis.....	58
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	60
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	67
LITERATURA CITADA.....	68
ESTUDIO III.- INCLUSIÓN DE FERMENTO DE BAGAZO DE MANZANA Y UN PROBIÓTICO (<i>Kluyveromyces lactis</i>) EN LA DIETA DE TILAPIAS (<i>Oreochromis niloticus</i>) DURANTE SU ETAPA JUVENIL.....	69
RESUMEN.....	70
ABSTRACT	72
INTRODUCCIÓN.....	73
MATERIALES Y MÉTODOS	75
Variables de Respuesta	78
Ganancia de peso y longitud	79
Rendimiento de filete.....	79
Tasa de sobrevivencia.....	79
Diseño Experimental:	79
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	81
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	95
LITERATURA CITADA.....	97



LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Compuestos identificados en la cromatografía de gases del aceite esencial de orégano obtenido de plantas de orégano de la región de Jiménez, Chihuahua.....	17
2	Formulaciones de los tratamientos del FES de bagazo de manzana.....	30
3	Composición química de la zeolita clinoptilolita.....	31
4	Medias de mínimos cuadrados (\pm EE) de la cuenta de levaduras totales (Levaduras $\times 10^6$ /g) en la FES de bagazo de manzana adicionado con AEO y ZEO.....	38
5	Proteína verdadera a través del tiempo de la FES de bagazo de manzana adicionado con AEO y ZEO.....	43
6	Composición de los caldos nutritivos de melaza utilizados en el experimento.....	55
7	Composición química del caldo reactivador de levaduras.....	56
8	Concentración de levaduras por mL de caldo, expresado en Levaduras $\times 10^6$ /mL de caldo por h.....	61
9	Concentración de bacterias aeróbicas mesófilas totales por mL de caldo, expresado en UFC/mL de caldo.....	66
10	Composición de las dietas utilizadas en el experimento...	77
11	Análisis proximal realizado a las dietas utilizadas en el experimento.....	82
12	Tasa de conversión alimenticia (TCA) de los peces por tratamiento durante el experimento.....	83
13	Peso promedio semanal en gramos de los peces por tratamiento durante el experimento.....	84
14	Longitud promedio semanal en milímetros de los peces por tratamiento durante el experimento.....	85
15	Sobrevivencia de los peces por tratamiento durante el experimento completo.....	93
16	Rendimiento de filete promedio de los peces por tratamiento al sacrificio.....	94



LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica		Página
1	Medias de mínimos cuadrados de la cuenta de bacterias aeróbicas mesofílicas totales (UFC x10 ⁶) en la FES de bagazo de manzana adicionado con AEO y ZEO.....	36
2	Medias de mínimos cuadrados de pH de la FES de bagazo de manzana adicionado con AEO y ZEO.....	40
3	Actividad de captura de radical libre en porcentaje, del bagazo de manzana fermentado.....	41
4	Azúcares solubles en el caldo contra el tiempo del experimento, expresado en °Bx.....	62
5	pH en el caldo contra el tiempo del experimento.....	64
6	Temperatura del agua del sistema de peceras (°C) respecto al tiempo del experimento (d).....	87
7	Concentración de oxígeno en el agua (mg/L) del sistema de peceras respecto al tiempo del experimento (d).....	88
8	Concentración de amonio en el agua del sistema de peceras (mg/L) respecto al tiempo del experimento (d).....	89
9	Concentración de CO ₂ en el agua del sistema de peceras (mg/L) respecto al tiempo del experimento (d).....	90
10	pH del agua del sistema de peceras respecto al tiempo del experimento (d).....	91



LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructura molecular de los diversos compuestos presentes en el aceite esencial de orégano (<i>Lippia berlandieri</i>) ecotipo Jiménez, Chihuahua, México.....	16



INTRODUCCIÓN GENERAL

La acuicultura es el desarrollo de organismos acuáticos bajo condiciones controladas o semi controladas, siendo así una de las mejores opciones económicas para la obtención de proteína de origen animal. En la última década se ha visto un desarrollo en la acuicultura a nivel mundial, aunque centrándose en los países en desarrollo, pues tiene el potencial para poder producir más peces a menor costo, cubriendo la demanda que se presentará por la explosión demográfica sin afectar la ecología y produciendo alimento seguro, de alta calidad y con un excelente perfil nutricional (FAO, 2010).

En la producción de peces por acuicultura, el 50 % o más de los egresos se dirigen a la alimentación, por lo que es necesario desarrollar un alimento completo, balanceado, de alta digestibilidad, que presente beneficios nutricionales agregados y de alta calidad proteica, así como aditivos que preserven la salud del pez como son los suplementos nutracéuticos y probióticos para de esta manera poder optimizar el crecimiento de los peces y lograr un mayor beneficio productivo (Thiessen *et al.*, 2003).

Al momento de formular un alimento para peces criados por acuicultura, más de la mitad del costo se dirige hacia agregar proteína de una calidad aceptable, siendo usualmente la harina de pescado el principal insumo utilizado para este fin. La harina de pescado tiene un balance adecuado de aminoácidos, ácidos grasos, energía digestible, vitaminas y minerales, haciendo de este producto una muy buena opción para ser incluido en dietas para peces (Shaeffer *et al.*, 2009).



Sin embargo, existen fuentes proteicas alternativas que se encuentran disponibles en el mercado y que provienen de fuentes vegetales, como la pasta de soya, que al tener un excelente perfil de aminoácidos, representa una excelente oportunidad de suplementar la harina de pescado sin tener que dirigir tanto recurso económico a la fuente de proteína (Dong *et al.*, 2013).

El fermento de bagazo representa una opción muy interesante al momento de formular una dieta de peces producidos por acuicultura, pues al ser el producto de la fermentación microbiana de los subproductos de la industria de la manzana, representa una alternativa económica de agregar proteína de origen microbiano, con alta digestibilidad y de precio sumamente accesible (Balcázar *et al.*, 2006), además de ofrecer valor agregado como lo son la presencia de compuestos antioxidantes propios de la manzana y levaduras de la fermentación, las cuales agregan su capacidad probiótica a la dieta (Díaz-Plascencia, 2011).

Por tanto, el objetivo general del presente trabajo fue evaluar los parámetros productivos y de calidad de carne de tilapias (*Oreochromis niloticus*) alimentadas con una dieta suplementada con bagazo de manzana fermentado en estado sólido y un inóculo de levaduras producido en dicha fermentación.

Los objetivos particulares fueron cuantificar las levaduras que comprenden el inóculo producido en esta fermentación y describir las relaciones existentes entre los compuestos funcionales y la salud de los peces alimentados con estos compuestos.



REVISIÓN DE LITERATURA

Acuicultura

El término acuicultura se refiere al cultivo de organismos acuáticos cuyo principal destino es el consumo humano, esto bajo condiciones controladas, situación que se traduce a un mejor rendimiento productivo y una menor inversión económica. Desde hace más de dos mil años, la civilización china ya producía peces criándolos en sistemas de acuicultura, tanto en estanques específicamente fabricados para este fin como en los arrozales inundados en épocas de lluvias. Por lo tanto, la historia de la acuicultura se remonta varios milenios atrás en la historia del humano, quien a lo largo de los años ha tratado de obtener alimento a partir de los peces, pero criándolos en cuerpos de agua limitados, para de esta manera poder controlar los parámetros que sean necesarios para obtener el máximo beneficio (Wang *et al.*, 2008).

El rápido crecimiento de la población humana ha llevado a la necesidad de plantearse nuevas fuentes de alimento que contengan una proteína de calidad, buen perfil lipídico y, sobre todo, que sean de precio accesible a la población en general. La acuicultura cumple con todos estos requisitos, puesto que, en un sistema relativamente pequeño, con una mínima contaminación ambiental y con poco esfuerzo por parte de los acuicultores, se obtiene un alimento de alto nivel nutricional para el consumidor y a un muy bajo costo. Para poder sustentar la gran demanda de productos acuícolas para consumo humano la industria de la acuicultura ha tenido que hacer adecuaciones en sus métodos e instalaciones, siendo la más importante la intensificación de los cultivos (Wang *et al.*, 2007).



Al aumentar la demanda por los productos de acuacultura, el acuicultor se ve obligado a diversificar sus cultivos, aumentar la densidad de población y ser parte de la cadena comercial, con lo que entran en juego factores ajenos a los controles normales del agua, como pueden ser parásitos, virus o bacterias, los cuales entran al sistema gracias a la introducción de organismos nuevos o crías provenientes de criaderos infectados. Todos estos problemas infecciosos acarrearán problemas de índole técnica y económica, pues implican desinfecciones de estanques, gasto por medicamentos y, sobre todo, pérdidas de especímenes (Bondad-Reantaso *et al.*, 2005).

Siendo México un país con amplios litorales y diversos cuerpos de agua es de esperarse que la actividad pesquera tenga una alta importancia respecto a otros sectores productivos, de manera que en el año de 2011 se obtuvieron 1,660,475 toneladas de peso vivo en pesca, de las cuales 262,855 toneladas fueron obtenidas de sistemas de acuacultura, la cual tuvo una participación del 15.83 % del total nacional (SAGARPA y CONAPESCA, 2012).

En el 2011 Chihuahua ocupó el lugar número 27 dentro de los estados del país en producción pesquera con 758 toneladas de producción, lo que representa el 0.05 % de la producción nacional. Chihuahua cuenta con centros productivos de peces por acuacultura, quienes contribuyen de manera muy importante a esta producción, con una producción principal de Carpa (308 ton), seguida de Trucha (230 ton), Mojarra (173 ton), Bagre (113 ton) y Lobina (14 ton), lo que lo convierte en el décimo estado sin litoral con producción pesquera (SAGARPA y CONAPESCA, 2012).

La acuacultura es entonces una actividad de elevada importancia socio



cultural, especialmente en ambientes rurales, donde los productores a baja escala pueden obtener alimento de buena calidad a precios muy bajos, genera empleo y diversifica las prácticas productivas de los productores pecuarios, además de proporcionar un alimento con un perfil nutricional mejor al de cualquier otro animal terrestre pues es una fuente de proteína animal de alta calidad, provee energía altamente digestible y es una importante fuente de ácidos grasos omega-3, ácidos grasos poliinsaturados, vitaminas liposolubles y minerales (Bondad-Reantaso *et al.*, 2005).

Alimentación en la Acuicultura

Los organismos acuáticos, al igual que todos los animales terrestres, necesitan para su desarrollo nutrientes como proteínas, carbohidratos y lípidos, además de vitaminas y minerales, de los cuales obtienen la energía y componentes necesarios para llevar a cabo sus funciones metabólicas. Estos nutrientes provienen de los alimentos que pueden encontrar en su ambiente natural, como detritos vegetales, otros peces o restos de materia orgánica que cae de sistemas ecológicos terrestres, mientras que en los sistemas de acuicultura están limitados a las dietas que el acuicultor les provea, con la excepción de los sistemas semi controlados, donde además pueden obtener alimentos de fuentes naturales en una menor medida (Lovell, 1991).

Las dietas que se formulan para los peces tienen requerimientos proteínicos más altos que aquellas dietas que están dirigidas a animales terrestres, principalmente porque los peces tienen unos requerimientos de proteína más altos, pero más bajos de energía. Esto lleva a que el mayor costo al momento de formular una dieta se derive a incluir proteína y se debe de



formular en base a la premisa de que la proteína incluida se destine a generar proteína de depósito en el pez, y no a su utilización como fuente de energía (Liu *et al.*, 2011).

Los peces tienen la ventaja de necesitar mucha menos energía metabolizable que los animales terrestres, esto principalmente por el menor consumo energético al momento de moverse en su ambiente, mantener su postura o temperatura, además de que, al excretar sus desechos nitrogenados en forma de amonio, consumen menos energía en el catabolismo y excreción de residuos proteicos (Gaylord *et al.*, 2009).

Los almidones son fácilmente digeridos por los peces, especialmente por aquellos de aguas templadas, disminuyendo su aprovechamiento en los de aguas frías, quienes tienden a utilizar primordialmente el catabolismo de ácidos grasos y triglicéridos para la obtención de energía. Por esta causa es que algunos peces de agua fría, como los salmones, tienen un requerimiento obligado de ácidos grasos omega-3 y 6 en su dieta, mientras que los de aguas templadas necesitan triglicéridos para llevar a cabo su metabolismo lipídico con menos proporción de ácidos grasos omega-3 y 6 (Lovell, 1991). El mismo autor reporta que al formular una dieta para peces criados en acuicultura, en la cual se provean todos los nutrientes necesarios para el óptimo desarrollo del pez, tendrá un costo económico elevado que conlleva a buscar nuevas metodologías que faciliten la digestión o absorción de los compuestos proveídos en la dieta. Este campo de investigación en la formulación lleva a los compuestos funcionales en la nutrición animal, los cuales proveen un beneficio adicional a su mismo valor nutricional.



La Tilapia (*Oreochromis niloticus*) y su Cultivo

La tilapia es la novena especie más cultivada a nivel mundial, siendo sobre todo la tilapia del nilo (*Oreochromis niloticus*), la tilapia de Java (*O. mossambicus*) y la tilapia azul (*O. aureus*) las especies más cotizadas. Son especies nativas de África y medio este, pero en la actualidad ya han sido introducidas en casi todas las áreas tropicales del mundo, principalmente como especies para cultivo en estanques pequeños en áreas rurales y sobre todo para autoconsumo por personas en situaciones precarias. Actualmente la tilapia es una especie muy cotizada, con mercados muy importantes en Japón, Estados Unidos y Europa, además de algunos países en desarrollo (Shaeffer *et al.*, 2009).

Las tilapias son sensibles al frío y tienen una temperatura óptima de 28 a 32 °C. Conforme se disminuye la temperatura, se va reduciendo el crecimiento del pez, hasta que deja de comer cuando se llega a una temperatura de 16 o 17 °C, y muere a menos de 10 °C. Son especies de agua dulce, pero pueden llegar a desarrollarse a salinidades de hasta 25 ppt (Shaeffer *et al.*, 2009).

La carne que se obtiene de la tilapia es una carne suave, de sabor ligero, color gris claro o blanco con un poco de coloración roja cerca de la línea lateral. En las especies que son híbridas se presenta la carne con un color más claro que con las especies puras, y en los adultos mayores a 600 gramos el sabor se intensifica, sobre todo en la línea lateral. Esta especie tiene un rendimiento de filete aproximado del 33 al 35 % del peso vivo, lo que es relativamente bajo. (Cnaani y Hulata, 2008). El mismo autor menciona que la tolerancia que tienen las tilapias a las variaciones en sus condiciones ambientales, su alta fecundidad



y la facilidad de competir con otras especies han hecho que sea una especie altamente solicitada por los acuicultores, de fácil cultivo y buen sabor.

Bagazo de Manzana

El estado de Chihuahua es el primer productor nacional de manzana, con el 43.1 % de la superficie sembrada nacional y el 73.7 % de la producción total, produciendo 370,040.2 toneladas anuales (SAGARPA, 2009), con lo que se puede estimar que una cuarta parte de esta es manzana de desecho por no cumplir con los estándares de calidad. Este desecho, aunado a los subproductos generados por la industria procesadora de la manzana, genera desperdicios, principalmente bagazo de manzana, siendo del 25 al 30 % del peso de la fruta fresca, el cual representa un serio problema de contaminación, pues al ser altamente biodegradable altera significativamente el entorno en el que es desechado gracias a su alto contenido en carbohidratos, ácidos, fibras, vitamina C y minerales (Joshi y Sandhu, 1996).

Gracias al bajo contenido de nitrógeno y el alto contenido de humedad del bagazo de manzana, se ha dificultado su inclusión en dietas para animales, situación que hace imperativo el desarrollo de técnicas que permitan el consumo y disminuyan el impacto ambiental que genera. Por lo tanto, una de las alternativas que más éxito ha tenido es la fermentación en estado sólido (FES) del bagazo, adicionada con nitrógeno ureico y mezclas de vitaminas y minerales que permitan el desarrollo de levaduras, que además de degradar la fibra, puedan aportar proteína de origen microbiano, es decir, suplementar a bajo costo proteína de alta calidad (Díaz *et al.*, 2010).

Compuestos Funcionales en Nutrición Animal



Los alimentos funcionales son aquellos que contienen un compuesto o nutriente con cierta actividad beneficiosa, es decir, que puede ofrecer un resultado fisiológico además de su propio valor nutritivo. De igual manera que la mayoría de los animales, los peces también son susceptibles de entrar en un estado de estrés oxidativo ocasionado por la presencia de radicales libres de oxígeno, que aunque existe todo un mecanismo enzimático de captura de estos últimos, no siempre son suficientes para acabar con los radicales generados en los tejidos del pez. El sistema enzimático antioxidante se compone principalmente de las enzimas glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, superóxido dismutasa y catalasa, además de algunas sustancias reducidas, como el glutatión. El estrés oxidativo se presenta cuando este sistema enzimático antioxidante decrece, o se ve aumentada la presencia de radicales libres, lo que afecta directamente la salud del pez pues las membranas celulares son atacadas por los radicales libres y se presenta un daño tisular que puede repercutir en el desarrollo del pez (Dong *et al.*, 2013).

Para paliar la generación de radicales libres es necesario incluir en la dieta compuestos antioxidantes que puedan ayudar al sistema enzimático del pez en la captura de radicales libres, sobre todo los provenientes de la oxidación de los aceites, puesto que está bien documentada la toxicidad de los aceites oxidados en la dieta de los peces (Yamashita *et al.*, 2009).

Dentro de los compuestos que se pueden añadir a una dieta como antioxidantes se encuentran los polifenoles, que son constituyentes naturales de las plantas, quienes los utilizan como antioxidantes contra los radicales libres producidos en la fotosíntesis (Biedrzycka y Amarowicz, 2008).



A pesar de que se han identificado cientos de polifenoles, los dos tipos más importantes de polifenoles son los flavonoides y los ácidos fenólicos, que a su vez se dividen en diversas clases. Dentro de los flavonoides existen las flavonas, flavonoles, flavanoles, flavanones, isoflavonas, antocianinas, entre otros, y se encuentran comúnmente en la cebolla, te, manzana, cítricos, soya, frutos rojos y cocoa. Y los ácidos fenólicos más importantes son el ácido caféico y el ferúlico, presentes en el café y algunos vegetales (Scalbert y Manach, 2005).

En el caso de la manzana existen diferencias entre variedades respecto a la cantidad de polifenoles presentes, siendo las más destacadas las Braeburn, Red Delicious, Cripps Pink y Granny Smith, Idared y Rome Beauty, con entre 66.2 y 211.9 mg/100g de peso fresco (Dependiendo de la variedad), siendo los flavanoles catequina y proantocianidinas los que tuvieron mayor presencia, seguidos de hidroxicinamatos. Estos flavonoides son sintetizados por la planta como respuesta a una infección bacteriana, puesto que presentan actividad antimicrobiana al unirse a las proteínas de membrana de las bacterias y desestabilizarlas (Biedrzycka y Amarowicz, 2008).

A partir de los subproductos de la manzana se elaboró un producto alimenticio denominado "*manzarina*", la cual se obtuvo por fermentación en estado sólido, donde se desarrolló la flora propia de la manzana utilizando los carbohidratos de la misma manzana y urea como fuente de nitrógeno. Con este proceso de fermentación se obtiene un producto proteico que además de aumentar la proteína natural de la manzana gracias a la proliferación de microorganismos presenta levaduras vivas, dentro de las cuales se encuentran



Saccharomyces cerevisiae, *Kluyveromyces lactis* e *Issatchenkia orientalis* (Díaz-Plascencia, 2011; Balcázar *et al.*, 2013).

Estas levaduras han sido estudiadas en otras especies como Probióticos, donde se han logrado mejoras (Díaz-Plascencia, 2011). Es entonces un punto de interés conocer su comportamiento como Probióticos en especies acuícolas, para lograr evaluar su rendimiento y sus beneficios al hospedador.

Probióticos en Nutrición Animal

Con la intensificación de la acuicultura a nivel mundial y la globalización del comercio de especies acuícolas se han diseminado una serie de bacterias patógenas entre los estanques y centros de acuicultura a nivel mundial. Este tipo de comportamiento ha llevado a los acuicultores a la utilización de antibióticos para poder controlar las infecciones y mejorar el estado de salud de los peces. Sin embargo, la utilización de antibióticos acarrea problemas como el surgimiento de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos o de mal uso de los mismos, lo que conlleva al sacrificio de peces que aún no eliminan el antibiótico por completo, o a sobredosificaciones. Para evitar los problemas asociados al uso de antibióticos se han desarrollado métodos alternativos capaces de mantener bajos los niveles de bacterias patógenas a través del inóculo de bacterias benéficas que compitan con ellas por sustrato, ataque enzimático o lugar de fijación en el intestino de los organismos acuícolas. Al tener una población bien controlada de estas bacterias benéficas se reducen de manera significativa las poblaciones de bacterias patógenas y se estimula la inmunidad del pez, haciendo innecesaria la utilización de antibióticos (Bondad-Reantaso *et al.*, 2005).



Los Probióticos fueron originalmente descritos como organismos vivos que se agregan a un alimento y afectan de manera benéfica al huésped gracias al balance intestinal que le generan. Además de la descripción original se han agregado componentes microbiológicos no vivos y se ha ampliado su zona de acción fuera del intestino del huésped (Kesarcodiwatson y Kaspar, 2008).

En la acuicultura se han usado con éxito Probióticos como las bacterias ácido lácticas, que se encuentran de manera natural en el intestino de algunos peces, las cuales convierten lactosa en ácido láctico, acidificando el medio ambiente intestinal y evitando la colonización por otras bacterias patógenas. Otras bacterias estudiadas son las *Bacillus* spp, productoras de bacteriocinas, con lo que atacan a bacterias patógenas. Dentro de las levaduras la más estudiada es la *Saccharomyces cerevisiae*, que tiene un efecto inmunoestimulador en el tracto digestivo de los peces (Kesarcodiwatson y Kaspar, 2008).

Para poder determinar si una levadura o bacteria es capaz de ser un probiótico, esta tiene que cumplir las siguientes restricciones: 1) No debe de ser patógena para el huésped; 2) Debe ser aceptada por el huésped y poder replicarse en él; 3) Debe de ser lo suficientemente resistente para llegar al sitio donde se desea que se multiplique; 4) Debe de ser capaz de funcionar *in vivo*, además de *in vitro*; 5) No debe de contener genes de virulencia ni de resistencia a antibióticos (Kesarcodiwatson y Kaspar, 2008).

Otro de los beneficios de la utilización de probióticos en dietas para acuicultura es que estos microorganismos producen enzimas digestivas, sobre todo dirigidas a compuestos a los cuales los peces no tienen manera de digerir,



como carbohidratos complejos, con lo que ayudan en la digestión liberando moléculas más pequeñas, producto de la degradación enzimática de los compuestos complejos, aumentando así la digestibilidad de los alimentos y su aprovechamiento por parte de los peces (Wang, 2007).

Fermentación en Estado Sólido

La fermentación en estado sólido (FES) se define como el crecimiento de microorganismos en material sólido en la ausencia o casi ausencia de agua libre, lo cual se ha utilizado en los últimos años como una solución económica para la producción de diversos metabolitos orgánicos a gran escala (Bellon-Maurel *et al.*, 2003).

Actualmente se utiliza la FES para producir compuestos de valor industrial, pero en el área agropecuaria ha tomado relevancia gracias a la facilidad de fermentar a bajo costo residuos agrícolas y darles un valor agregado para la alimentación animal, lo que reditúa en procesos productivos más limpios, menos agresivos al entorno y con un rendimiento económico mayor a los métodos tradicionales que generan toneladas de desecho (Pandey, 2003).

Diversos factores afectan la eficiencia de la FES, siendo uno de los más importantes la naturaleza del sustrato que se utiliza, siendo este seleccionado en función de su abundancia y facilidad de obtención. La importancia del sustrato es que además de proveer los sustratos energéticos, ofrecerá sustento para las células microbianas, de manera que la forma y tamaño de partícula es de vital importancia para el adecuado desarrollo del sistema. En tamaños de partícula pequeños se observa una mayor superficie para el ataque enzimático, mientras que si es demasiado pequeño, existe el riesgo de aglomeración y por lo tanto, un



menor crecimiento microbiano, mientras que partículas muy grandes, aunque permiten un adecuado flujo de gases y poca aglomeración, impiden que las enzimas ataquen el interior de estas, por lo que se desperdicia sustrato al dificultar la transferencia de masa (Couto y Sanromán, 2006).

Otro de los factores de suma importancia al momento de llevar a cabo una FES es la aireación, la cual proporciona el intercambio de gases, principalmente oxígeno y dióxido de carbono, agregando el primero y removiendo el último, de manera que se lleve a cabo el proceso en un medio rico en oxígeno. La aireación también sirve para disipar el calor, distribuir la humedad a todo el sistema y la eliminación de metabolitos volátiles. Al generar una adecuada aireación, el sistema se mantendrá estable, pues los valores de pO_2 y pCO_2 se mantendrán homogéneos en el sustrato y no existirán zonas donde al modificarse las condiciones de aerobiosis se modifique la flora que ahí se desarrolla, evitando de esta manera la contaminación por organismos ajenos a la FES. La distribución de la humedad permitirá una a_w también homogénea, con lo que no existirán zonas donde las condiciones obliguen a los microorganismos a modificar sus condiciones de crecimiento (Graminha *et al.*, 2008).

Aceite Esencial de Orégano

El Orégano (*Lippia berlandieri*) es una planta silvestre, de zonas áridas, perteneciente a la familia *Verbenaceae*, que tiene uso en la cocina tradicional mexicana, en la medicina tradicional y en los últimos años, en la industria para la extracción de su aceite esencial (Navarrete *et al.*, 2005).

La extracción del Aceite Esencial de Orégano (AEO) se da por diversos métodos, y se obtiene por su alto contenido en compuestos antioxidantes,



principalmente monoterpenos como el timol, carvacrol γ -terpineno y p -cimeno, ácidos fenólicos y flavonoides (Figura 1). De estos compuestos, el timol y el carvacrol son los principales compuestos en cantidad (Cuadro 1), así como en actividad microbiana, la cual está bien documentada contra bacterias como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Vibrio* sp., *Clostridium* sp., y algunos hongos como *Aspergillus*, *Penicillium* y *Geotrichum* (Rentería *et al.*, 2014).

El modo de acción de los aceites esenciales ha sido estudiado ampliamente, pues al ser productos generalmente reconocidos como seguros (GRAS), se ha generalizado su uso en productos alimenticios y farmacéuticos, para lo cual se requiere un amplio conocimiento de su forma de acción. En el caso del AEO esta se puede resumir en la capacidad del timol y el carvacrol de penetrar la membrana celular de las bacterias y generar una desestabilización, produciendo un defecto en la fuerza motriz de los protones, principalmente a través del gradiente de pH (ΔpH) y el gradiente de potencial eléctrico ($D\psi$), con lo que se impide la actividad respiratoria de los microorganismos y se presentan fugas de iones hacia el exterior de la célula, generando de esta manera la inactivación o muerte de las mismas, dependiendo del tipo de membrana que presenten y la gravedad de los daños que por sus características reciban (Lambert *et al.*, 2001).

El AEO se ha utilizado como una alternativa natural a los conservadores artificiales, dada su actividad antioxidante, inocuidad al consumo, capacidad antioxidante y sobre todo, su capacidad antimicrobiana (Teixeira *et al.*, 2013).

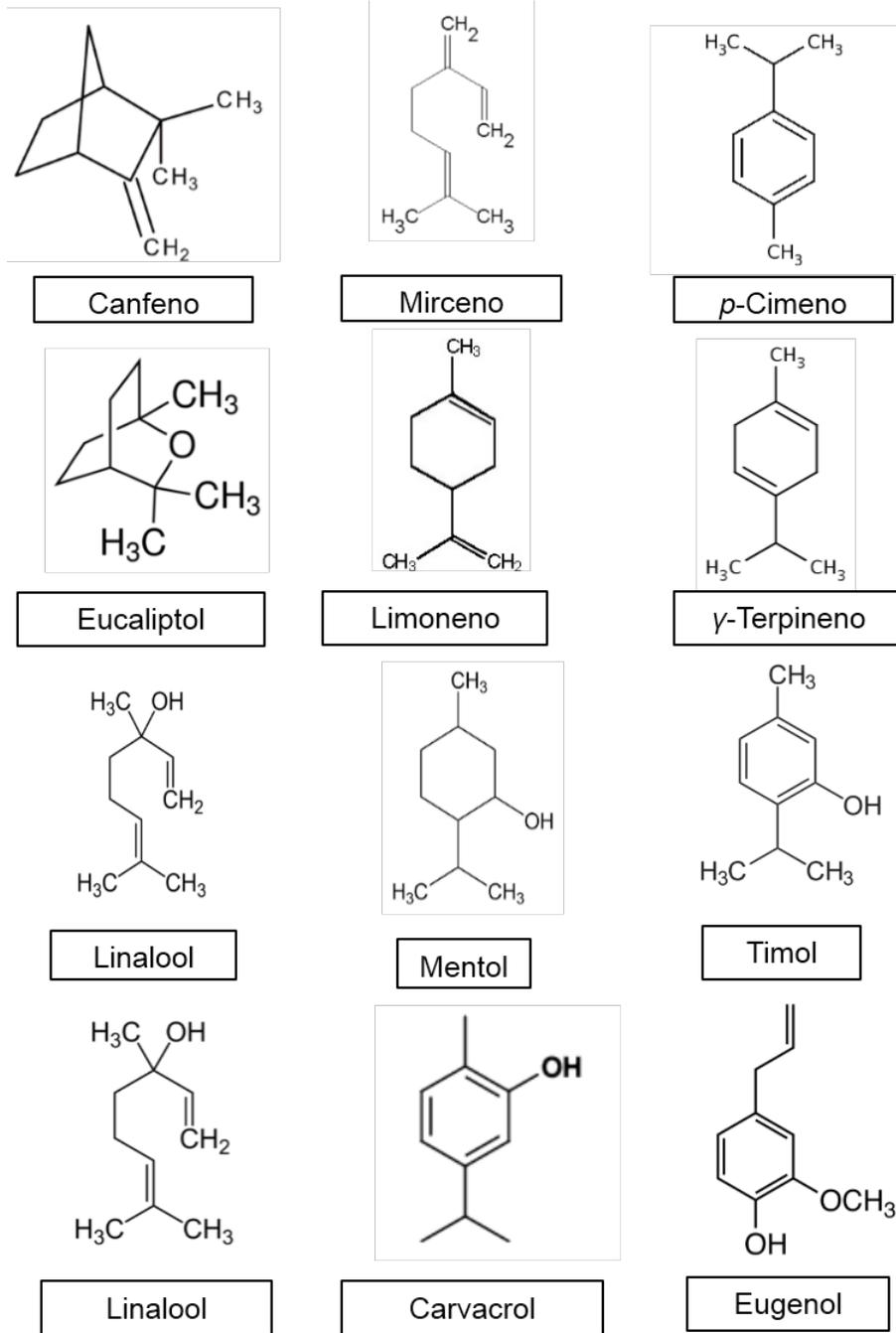


Figura 1.- Estructura molecular de los diversos compuestos presentes en el aceite esencial de orégano (*Lippia berlandieri*) ecotipo Jiménez, Chihuahua, México (Silva, 2015).



Cuadro 1. Compuestos identificados en la cromatografía de gases del aceite esencial de orégano obtenido de plantas de orégano de la región de Jiménez, Chihuahua (Silva, 2015)

Tiempo de retención (minutos)	Compuesto	% de Abundancia
5.737	Canfeno	0.0523
7.373	Mirceno	0.1256
7.925	<i>p</i> -Cimeno	16.1256
8.164	Eucaliptol	0.3185
8.226	Limoneno	0.2568
9.284	γ -Terpineno	5.3541
10.720	Linalool	0.2521
13.785	Mentol	0.7996
17.535	Timol	3.3796
17.741	Carvacrol	60.0488
18.665	Eugenol	0.1357
19.476	Trans-Cariofileno	3.6905
	Otros 26 compuestos minoritarios	9.4608



Gracias a estas propiedades, se considera que la adición de AEO a la FES del bagazo de manzana, proporcionará una defensa contra la contaminación por bacterias que consumirían los sustratos y disminuirán la eficiencia fermentativa de las levaduras.

Zeolita

Las zeolitas son materiales arcillosos obtenidos de depósitos sedimentarios. De los más de 40 tipos de zeolitas que se presentan de forma natural, la clinoptilolita es especialmente funcional al momento de adsorber compuestos nitrogenados, especialmente NH_4^+ . La clinoptilolita es un tipo de zeolita que tiene una estructura molecular abierta, con un volumen poroso cercano al 35 % y se encuentra fácilmente en los depósitos minerales a nivel mundial. Esta característica se obtiene gracias a la estructura tridimensional de aluminosilicatos con anillos de cuatro y cinco miembros, con lo que se forman microporos capaces de albergar cationes intercambiables como NH_4^+ , Na^+ , K^+ y Ca^{2+} (Leung *et al.*, 2007).

Las zeolitas se han utilizado por sus capacidades para realizar intercambios catiónicos entre su estructura y el medio en que se encuentran disueltos. Su estructura química $(\text{Na}_6[(\text{Al}_2\text{O}_3)(\text{SiO}_2)_{30}]\cdot 24\text{H}_2\text{O})$ permite que adsorba los cationes, como el amonio, y los vaya liberando lentamente en función de la concentración del medio en que se encuentre, por diferencia de concentración, modificando de esta manera el pH del medio y evitando la pérdida de nitrógeno al ambiente, con lo que se favorece la utilización del mismo (Li, 2003).



LITERATURA CITADA

- Bálzazar, J. L., I. de Blas, I. Ruiz-Zarzuela, D. Cunningham, D. Vendrell y J. L. Múzquiz. 2006. The role of probiotics in aquaculture. *Vet. Microbiol.* 114:173-186.
- Bellon-Maurel, V., O. Orliac y P. Christen. 2003. Sensors and measurements in solid state fermentation: A review. *Process Biochem.* 38:881–896.
- Biedrzycka, E. y R. Amarowicz. 2008. Diet and Health: Apple polyphenols as antioxidants. *Food Rev. Int.* 24:235–251.
- Bondad-Reantaso, M. G., R. P. Subasinghe, J. R. Arthur, K. Ogawa, S. Chinabut, R. Adlard, Z. Tan y M. Shariff. 2005. Disease and health management in asian aquaculture. *Vet. Parasitol.* 132:249–72.
- Cnaani, A. y G. Hulata. 2008. GenomeMapping and genomics in fishes and aquatic animals. *GenomeMapping and Genomics in Animals.* Vol. 2. p. 101 – 116.
- Couto, S. R. y M. A. Sanromán. 2006. Application of solid-state fermentation to food industry-A review. *J. Food Eng.* 76:291–302.
- Díaz, D., F. Salvador, O. Ruiz, C. Arzola, A. Flores, O. La O y A. Elías. 2010. Efecto del nivel de urea y pasta de soya en la concentración de proteínas durante la fermentación en estado sólido de manzana de desecho (*Malus domestica*). *Revista Cubana de Ciecía Agrícola* 44 23–26.
- Díaz-Plascencia, D. 2011. Desarrollo de un inóculo a base de levaduras y su efecto en la cinética de fermentación in vitro en raciones para vacas Holstein altas productoras. Tesis de Doctorado. Facultad de Zootecnia y Ecología. Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua, Chih. México.
- Dong, G. F., Y. O. Yang, X. M. Song, L. Yu, T. T. Zhao, G. L. Huang, Z. J. Hu y J. L. Zhang. 2013. Comparative effects of dietary supplementation with maggot meal and soybean meal in gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) and darkbarbel catfish (*Pelteobagrus vachelli*): growth performance and antioxidant responses. *Aquac. Nutr.* doi: 10.1111/anu.12006
- FAO. 2010. World aquaculture 2010. 1st ed. (FAO Fisheries and Aquaculture Department, editor.). Rome.
- Gaylord, T. G., F. T. Barrows, S. D. Rawles, K. Liu, P. Bregitzer, A. Hang, D. E. Obert y C. Morris. 2009. Apparent digestibility of nutrients and energy in extruded diets from cultivars of barley and wheat selected for nutritional quality in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquac. Nutr.* 15:306–312.



- Graminha, E. B. N., A. Z. L. Gonc y R. D. P. B. Pirota. 2008. Enzyme production by solid-state fermentation : Application to Animal Nutrition. 144:1–22.
- Joshi, V. K. y D. K. Sandhu. 1996. Preparation and evaluation of an animal feed byproduct produced by solid-state fermentation of apple pomace. *Bioresour. Technol.* 56:251–255.
- Kesarcodiwatson, A. y H. Kaspar. 2008. Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture* 274:1–14.
- Lambert, R. J. W., P. N. Skandamis, P. J. Coote y G. J. E. Nychas. 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.* 91:453–462.
- Leung, S., S. Barrington, Y. Wan, X. Zhao y B. El-Husseini. 2007. Zeolite (clinoptilolite) as feed additive to reduce manure mineral content. *Bioresour. Technol.* 98:3309–3316.
- Li, Z. 2003. Use of surfactant-modified zeolite as fertilizer carriers to control nitrate release. *Microporous Mesoporous Mater.* 61:181–188.
- Liu, X. Y., Y. Wang y W. X. Ji. 2011. Growth, feed utilization and body composition of Asian catfish (*Pangasius hypophthalmus*) fed at different dietary protein and lipid levels. *Aquac. Nutr.* 17:578–584.
- Lovell, R. T. 1991. Nutrition of aquaculture species . R T Lovell. *J. Anim. Sci.* 69:4193–4200.
- Navarrete, J. L. B., B. C. L. Jiménez y B. E. Bautista. 2005. Enraizamiento estacional de varetas de oregano (*Lippia berlandieri* Schauer). *Rev. Chapingo Ser. Zo. Áridas* 4:25–30.
- Pandey, A. 2003. Solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.* 13:81–84.
- Rentería, P. M., R. R. Herrera, C. N. Aguilar y G. V. Nevárez-Moorillón. 2014. Microbiological effect of fermented mexican oregano (*Lippia berlandieri* Schauer) waste. *Waste and Biomass Valorization* 5:57–63.
- SAGARPA y CONAPESCA. 2012. Anuario estadístico de acuacultura y pesca 2011.
- SAGARPA. 2009. Monitor agroeconómico 2009 del estado de Chihuahua.
- Scalbert, A. y C. Manach. 2005. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 45:287–306.



- Secretaría de Salud. 1995. Norma oficial mexicana NOM-092-SSA1-1994 Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.
- Shaeffer, T. W., M. L. Brown y K. A. Rosentrater. 2009. Performance characteristics of Nile Tilapia fed diets containing graded levels of fuel based distillers dried graing with solubles. *J. Aquac. Feed Sci. Nutr.* 4:78–83.
- Silva-Vázquez, R. 2015. Eceite esencial de orégano mexicano (*Lipia berlandieri* Schauer) en la alimentación de pollo de engorda. Tesis de Doctorado. Facultad de Zootecnia y Ecología. Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua, Chih. México.
- Teixeira, B., A. Marques, C. Ramos, C. Serrano, O. Matos, N. R. Neng, J. M. F. Nogueira, J. A. Saraiva y M. L. Nunes. 2013. Chemical composition and bioactivity of different oregano (*Origanum vulgare*) extracts and essential oil. *J. Sci. Food Agric.*
- Thiessen, D. L., G. L. Campbell y P. D. Adelizi. 2003. Digestibility and growth performance of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed with pea and canola products. *Aquac. Nutr.* 9:67–75.
- Wang, Y., J. Li y J. Lin. 2008. Probiotics in aquaculture: Challenges and outlook. *Aquaculture* 281:1–4.
- Wang, Y.-B. 2007. Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 269:259–264.
- Yamashita, Y., T. Katagiri, N. Pirarat, K. Futami, M. Endo y M. Maita. 2009. The synthetic antioxidant, ethoxyquin, adversely affects immunity in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquac. Nutr.* 15:144–151.



**ESTUDIO I. USO DE DOS ADITIVOS ANTIMICROBIANOS NATURALES EN
LA FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO DEL BAGAZO DE MANZANA**



RESUMEN

USO DE DOS ADITIVOS ANTIMICROBIANOS NATURALES EN LA FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO DEL BAGAZO DE MANZANA

POR:

M. C. JOSÉ LUIS GUEVARA VALDEZ

Doctor in Philosophia en Producción Animal

Secretaría de Investigación y Posgrado

Facultad de Zootecnia y Ecología

Universidad Autónoma de Chihuahua

Presidente: D. Ph. Carlos Rodríguez Muela

Se evaluó el efecto antimicrobiano del aceite esencial de orégano y la zeolita en la fermentación en estado sólido (FES) de bagazo de manzana. Se utilizó zeolita clinoptilolita al 5 % (ZEO), aceite esencial de orégano al 0.1 % (AEO) y ambos (ZXA), contra el método tradicional de caldo de melaza adicionado con urea, sulfato de amonio y minerales como control (CTL). Se contó con tres repeticiones por tratamiento en depósitos de 1 l, con muestreos a las 0, 6, 12, 24, 48, 72 y 96 h. Las variables evaluadas fueron cuenta microbiana en placa, pH y cuenta de levaduras con cámara de Neubauer. Los datos fueron analizados con un modelo de medias repetidas en el tiempo y comparación de medias múltiples. Se obtuvo el crecimiento máximo de levaduras a las 48 h en ZXA (462×10^6 cel/g), mientras que en CTL a las 96 h (470.5×10^6 cel/g), reduciendo el tiempo de fermentación y optimizando el proceso. El recuento de bacterias aeróbicas se vio disminuido ($p < 0.01$) a la hora 48, de 0.70×10^6 UFC/g en CTL a 0.25×10^6 UFC/g en ZXA, siendo AEO el que menor cuenta bacteriana



tuvo (0.11×10^6 UFC/g). El pH fue más alto ($p < 0.01$) en ZEO (4.80) y ZXA (4.62), contra CTL (4.06) y AEO (4.03). Se concluye que la utilización de ambos aditivos proporciona ventajas microbiológicas respecto al proceso tradicional de FES, con lo que disminuye el tiempo de fermentación y se evita la contaminación bacteriana, garantizando un proceso libre de contaminantes microbiológicos.



ABSTRACT

USE OF TWO NATURAL ADDITIVES IN THE SOLID STATE FERMENTATION OF APPLE CHAFF

BY:

JOSE LUIS GUEVARA VALDEZ

In this study, the antimicrobial effect of essential oil of oregano and zeolite in the solid state fermentation (SSF) of apple pomace was evaluated. Clinoptilolite zeolite 5 % (ZEO), oregano essential oil 0.1 % (OEO) and both (ZXA) were used against the traditional method of broth molasses with urea, ammonium sulfate and minerals as a control (CTL). There were three replicates per treatment in 1 l deposits, with sampling at 0, 6, 12, 24, 48, 72 and 96 h. The evaluated variables were microbial plate counts, pH and yeast count with Neubauer chamber. The data were analyzed using a repeated measures model in time and comparison of multiple means. Maximum growth of yeast was obtained at 48 h in ZXA (462×10^6 cells / g), whereas CTL at 96 h (470.5×10^6 cells / g), reducing the fermentation time and optimizing the process. The count of aerobic bacteria was decreased ($P < 0.01$) at 48 h, 0.70×10^6 CFU / g in CTL to 0.25×10^6 CFU / g in ZXA, being OEO the one with lower bacterial count (0.11×10^6 CFU / g). The pH was higher ($p < 0.01$) at ZEO (4.80) and ZXA (4.62) against CTL (4.06) and OEO (4.03). It is concluded that the use of both additives provides microbiological advantages over traditional FES process, thereby reducing the fermentation time and bacterial contamination is avoided, ensuring free process microbiological contaminants.



INTRODUCCIÓN

En la actualidad la humanidad se enfrenta al reto de producir suficiente alimento para sostener el enorme crecimiento demográfico que se ha dado en los últimos años. Sin embargo, esto conlleva a que se hagan más intensivas las cosechas, que se busquen razas de animales más eficientes y sobre todo, que se produzcan más desechos al producir alimentos para la población. El estado de Chihuahua es el primer productor nacional de manzana, con el 43.1 % de la superficie sembrada nacional y el 73.7 % de la producción total, produciendo 370,040.20 toneladas anuales (SAGARPA, 2014), con lo que se puede estimar que una cuarta parte de esta es manzana de desecho que no cumple con los estándares de calidad. Este desecho, aunado a los subproductos generados por la industria procesadora de la manzana, genera desperdicios, principalmente bagazo de manzana, siendo del 25 al 30 % del peso de la fruta fresca, el cual representa un serio problema de contaminación, pues al ser altamente biodegradable altera significativamente el entorno en el que es desechado gracias a su alto contenido en carbohidratos, ácidos, fibras, vitamina C y minerales (Joshi y Sandhu, 1996).

Gracias al bajo contenido de nitrógeno del bagazo de manzana, se ha dificultado su inclusión en dietas para animales, situación que hace imperativo el desarrollo de técnicas que permitan el consumo y disminuyan el impacto ambiental que genera. Por lo tanto, una de las alternativas que más éxito ha tenido es la fermentación en estado sólido (FES) del bagazo, adicionada con nitrógeno ureico y mezclas de vitaminas y minerales que permitan el desarrollo de levaduras, que además de degradar la fibra, puedan aportar proteína de origen



microbiano, es decir, suplementar a bajo costo proteína de alta calidad (Dhillon *et al.*, 2013).

En la fermentación en estado sólido se deben de controlar los parámetros fisicoquímicos para evitar contaminación, pues el bagazo de manzana provee un medio con una alta humedad y una gran cantidad de carbohidratos disponibles (Castillo *et al.*, 2011). Esto plantea la opción de utilizar subproductos a través de la FES para mantener un ambiente microbiológico adecuado, reducir la contaminación microbiológica, pero sin alterar el desarrollo de las levaduras fermentativas.

El aceite esencial de orégano (AEO) se ha utilizado como una alternativa natural a los conservadores artificiales, dada su actividad antioxidante, inocuidad, capacidad antioxidante y sobre todo, su capacidad antimicrobiana (Teixeira *et al.*, 2013). Gracias a estas propiedades, se considera que la adición de AEO a la FES del bagazo de manzana, proporcionará una defensa contra la contaminación por bacterias que consumirían los sustratos y disminuirán la eficiencia fermentativa de las levaduras.

Las zeolitas son materiales arcillosos obtenidos de depósitos sedimentarios. De los más de 40 tipos de zeolitas que se presentan de forma natural, la clinoptilolita es especialmente funcional al momento de adsorber compuestos nitrogenados, especialmente NH_4^+ . La clinoptilolita es un tipo de zeolita que tiene una estructura molecular abierta, con un volumen poroso cercano al 35 % y se encuentra fácilmente en los depósitos minerales a nivel mundial. Esta característica se obtiene gracias a la estructura tridimensional de aluminosilicatos con anillos de cuatro y cinco miembros, con lo que se forman



microporos capaces de albergar cationes intercambiables como NH_4^+ , Na^+ , K^+ y Ca^{2+} (Leung *et al.*, 2007).

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto microbiológico por adición de zeolita micronizada y aceite esencial de orégano a la fermentación en estado sólido de bagazo de manzana, además de determinar el efecto adsorbtivo de la zeolita sobre los compuestos nitrogenados de la manzana.



MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se desarrolló en un invernadero de la Facultad de Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua, donde se mantuvo el bagazo de manzana en recipientes plásticos de un l de capacidad, a los cuales se les agregó urea y sulfato de amonio como fuente de nitrógeno y un suplemento mineral para proporcionar los nutrientes necesarios para el desarrollo de las levaduras (Tratamiento control).

La materia prima que se utilizó fue bagazo de manzana proveniente de CONFRUTTA, empresa dedicada a la producción de jugo de manzana, de Ciudad Cuauhtémoc, Chihuahua, siendo de manzana de la variedad Golden Delicious.

El tratamiento control constó de bagazo de manzana sin aditivos, mientras que al tratamiento AEO fue adicionado con aceite esencial de orégano (AEO) al 0.1 %, al tratamiento ZEO le fue adicionado un 5 % de zeolita micronizada y por último, el tratamiento ZX A incluyó tanto el aceite esencial de orégano como la zeolita, con tres repeticiones por tratamiento, tal como aparece en el Cuadro 2.

La zeolita que se utilizó fue obtenida de manera comercial, de una mina en San Luis Potosí, México, con una porosidad de 45 a 52 %, densidad de 700 a 850 kg/m³, dureza de 2 a 3 Mohs, capacidad de absorción de agua de 42 a 50 %, poros de 4 a 7 Å y un punto de fusión de 1300 °C. La composición garantizada por el proveedor de la zeolita se encuentra en el Cuadro 3.

Una vez hecha la mezcla, se homogenizó y se hicieron cuatro agitaciones manuales por día, moviendo por completo el producto para generar una adecuada oxigenación durante cuatro días. Se tomaron muestras a las h 0,



Cuadro 2. Formulaciones de los tratamientos del FES de bagazo de manzana

Tratamiento¹	Urea %	Sulfato de amonio %	Suplemento mineral %	Zeolita %	AEO %
1.- Control	2.0	0.4	1.0	-	-
2.- ZEO	2.0	0.4	1.0	5.0	-
3.- AEO	2.0	0.4	1.0	-	0.1
4.- ZXA	2.0	0.4	1.0	5.0	0.1

¹ ZEO indica tratamiento con Zeolita al 5 %, AEO tratamiento con Aceite Esencial de Orégano al 0.1 % y ZXA tratamiento con ambos (5 y 0.1 % respectivamente).



Cuadro 3.- Composición química de la zeolita clinoptilolita¹

Compuesto	Concentración %
Óxido de silicio (SiO ₂)	67.9
Óxido de aluminio (Al ₂ O ₃)	13.7
Óxido de potasio (K ₂ O)	4.7
Óxido de sodio (Na ₂ O)	2.2
Óxido de calcio (CaO)	1.7
Óxido férrico (Fe ₂ O ₃)	1.8
Óxido de magnesio (MgO)	1.8

¹ Análisis proporcionado por el laboratorio de análisis químicos del instituto de metalurgia de la U.A.S.L.P.



6, 12, 24, 48, 72 y 96 para el recuento de levaduras, y a las h 0, 48 y 96 para el recuento bacteriano.

Variables Evaluadas

Cuenta de bacterias. El recuento microbiológico se llevó a cabo de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994 Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. Se tomaron 5 muestras de distintos lugares de la FES, y se homogenizaron, de esto se toma un gramo, se diluye 6 veces en el medio diluyente, y se inocula en cada caja Petri, corriendo por triplicado todas las muestras. Después de inocular las diluciones de las muestras en las cajas Petri, agregar de 12 a 15 mL del medio cuenta estándar preparado, mezclarlo mediante 6 movimientos de derecha a izquierda, 6 en el sentido de las manecillas del reloj, 6 en sentido contrario y 6 de atrás a adelante, sobre una superficie lisa y horizontal hasta lograr una completa incorporación del inóculo en el medio y se deja solidificar. Se incluye una caja sin inóculo por cada medio y diluyente preparado como testigo de esterilidad. Se incuban las cajas en posición invertida a 35 ± 2 °C por 48 ± 2 h.

En la lectura se seleccionan aquellas placas donde aparezcan entre 25 a 250 UFC y se cuentan todas las colonias desarrolladas en las placas seleccionadas. Después de la incubación, se cuentan las placas que se encuentren en el intervalo de 25 a 250 colonias, usando el contador de colonias y el registrador. Se calcula la cuenta promedio por gramo de dicha dilución.

Levaduras. El recuento de levaduras se realizó por un recuento simple en cámara de Neubauer mejorada, por el método descrito por Díaz-Plascencia (Díaz-Plascencia, 2011), donde se tomó una muestra de 1 g del producto, que se



llevó a diluciones seriadas en solución reguladora de fosfatos, para después colocarse cada una de ellas en una cámara de Neubauer, para el conteo de levaduras (individuales o en gemación) en los cuatro cuadrantes del rayado. A partir de estos datos se calcula la cantidad de levaduras por gramo de fermento de bagazo de manzana.

pH. El pH se midió a lo largo del experimento con un potenciómetro digital marca Hanna, el cual se esterilizó este por inmersión en alcohol, se secó y se sumergió en el caldo para tomar la medición de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Actividad antioxidante. Para determinar la actividad antioxidante del bagazo de manzana fermentado se utilizó el método del DPPH (1, 1-difenil-2-picrilhidrazilio) de acuerdo a Ajila, (Ajila *et al.*, 2011), para lo cual mezcló el extracto del bagazo de manzana fermentado (200 μ l) con 1 mL de la solución de DPPH. Después de ser homogenizado en vortex, se dejó reaccionar por 20 minutos en total oscuridad. Se leyó la absorbancia a 517 nm, con la cual se calculó la actividad de captura de radicales libres en porcentaje con la ecuación (% de actividad de captura) = $1 - (A_s/A_0) \times 100$, donde A_0 es la absorbancia del control mientras que A_s es la absorbancia de la muestra.

Proteína. La variable de proteína fue determinada por la metodología de Fagbenro, quien utilizó el método para la precipitación con ácido tricloroacético para determinar proteína verdadera y discernirla del nitrógeno no proteico (Fagbenro y Jauncey, 1998).

Análisis Estadístico



Los datos obtenidos fueron analizados por medio de un modelo de medias repetidas en el tiempo, con ayuda del procedimiento Mixed de SAS 9.1.6 (SAS, 2006) y la comparación de medias se realizó por medio de Least Square Means, del mismo paquete computacional.

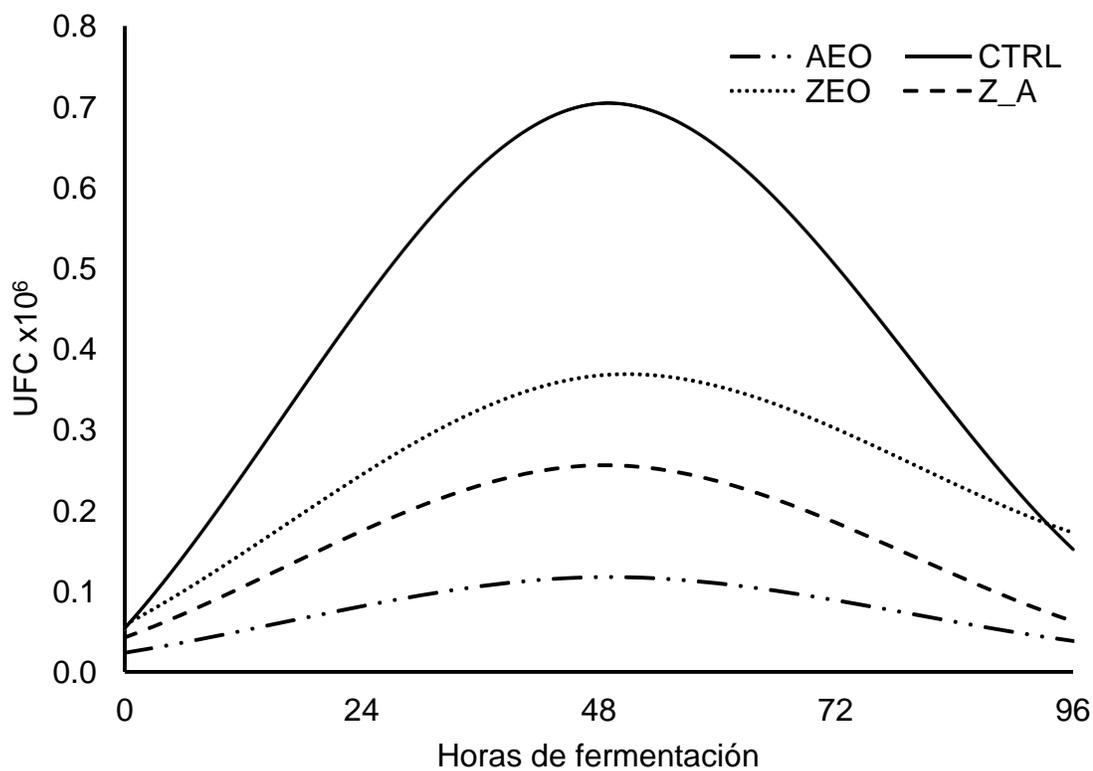


RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se encontró un efecto significativo ($P < 0.01$) de la inclusión de AEO y Zeolita clinoptilolita para la variable de bacterias aeróbicas mesofílicas en la FES del bagazo de manzana, disminuyendo el recuento bacteriano respecto al control en la hora 48 y creando una franca diferencia significativa entre los tratamientos que contuvieron AEO respecto a los que no ($P < 0.01$) a la hora 96. Estos resultados pueden ser explicados por el efecto antimicrobiano que presenta el AEO, observándose el descenso del número total de bacterias gracias a la actividad antibacteriana del Timol y Carvacrol contenidos en el AEO, siendo esto concordante con el trabajo de Lambert *et al.*, (2001), quienes inhibieron el crecimiento bacteriano con concentraciones de timol en AEO del 5 %.

Existió también una interacción entre los tratamientos y el tiempo ($P < 0.01$), con lo que se puede decir que conforme se desarrollan las bacterias en el FES de bagazo de manzana, se ven afectadas por la presencia del AEO o la ZEO, de manera que su número se ve disminuido respecto al tratamiento control.

A las 48 h de la fermentación se observa claramente la diferencia entre los tratamientos Control y ZEO, respecto a los otros dos conteniendo AEO (Gráfica 1), lo que indica que, en el momento de máximo crecimiento de bacterias, estas se ven significativamente inhibidas por el AEO ($P < 0.01$). Este efecto del AEO se observa a lo largo de toda la fermentación, quedando claro el efecto inhibitorio del AEO sobre las bacterias aeróbicas mesofílicas.



Gráfica 1. Medias de mínimos cuadrados de la cuenta de bacterias aeróbicas mesofílicas totales (UFC x10⁶) en la FES de bagazo de manzana adicionado con AEO y ZEO.



Las levaduras cuantificadas presentaron la multiplicación característica de estos microorganismos, concordante con los crecimientos presentados por otros autores (Díaz-Plascencia, *et al.*, 2012) y se observa al tiempo 0 de la FES que existe un efecto significativo ($P < 0.01$) por la adición de los tratamientos, observando un importante descenso de la cantidad de levaduras (Cuadro 4), por lo que queda claro que tanto la Zeolita como el AEO tienen un efecto sobre el recuento de las levaduras.

En las primeras 24 h se puede observar un pobre crecimiento en las levaduras del tratamiento ZXA ($P < 0.01$) respecto a los otros tratamientos, recuperándose en la h 48, donde este tratamiento presenta el mayor recuento de levaduras, comparable solamente al recuento final del tratamiento control. Esto puede indicar una adecuada utilización de los sustratos rápidos presentes en el bagazo de manzana y un subsecuente agotamiento de los mismos, pues de este punto de inflexión en adelante, la cuenta de levaduras del tratamiento ZXA va en franco descenso. Los tres tratamientos presentan su pico máximo de crecimiento de levaduras a las 48 h, y de ahí en adelante se presenta un descenso del recuento, en tanto que el control presenta el mayor conteo a las 96 h.

Al final del experimento se puede encontrar una diferencia significativa entre el tratamiento control y los demás, presentando un recuento más alto el control, seguido del tratamiento ZEO, el cual a partir de la h 48 estabilizó su crecimiento y mantuvo su recuento relativamente estable. Sin embargo, los dos tratamientos que contienen AEO tuvieron un significativo descenso de su población de levaduras, evidenciando el poder antimicrobiano que tiene el AEO (Lambert *et al.*, 2001).



Cuadro 4.- Medias de mínimos cuadrados (\pm EE) de la cuenta de levaduras totales (Levaduras $\times 10^6$ /g) en la FES de bagazo de manzana adicionado con AEO y ZEO ^{1,2}

Tiempo de fermentación, h	Tratamiento ³				\pm EE
	Control	ZEO	AEO	ZXA	
0	40.00 ^a	18.50 ^b	25.50 ^b	27.00 ^b	3.04
6	94.00 ^a	37.50 ^b	37.00 ^b	34.00 ^b	4.26
12	111.50 ^a	96.00 ^b	106.50 ^{ab}	45.00 ^c	2.76
24	152.00 ^a	143.50 ^a	159.50 ^a	74.50 ^b	7.53
48	362.00 ^b	339.50 ^b	384.50 ^b	462.00 ^a	14.83
72	447.00 ^a	337.00 ^b	247.50 ^c	273.00 ^c	14.22
96	470.50 ^a	326.50 ^b	281.00 ^{bc}	247.50 ^c	17.25

¹ Literales diferentes entre columnas indican diferencia significativa ($P < 0.01$).

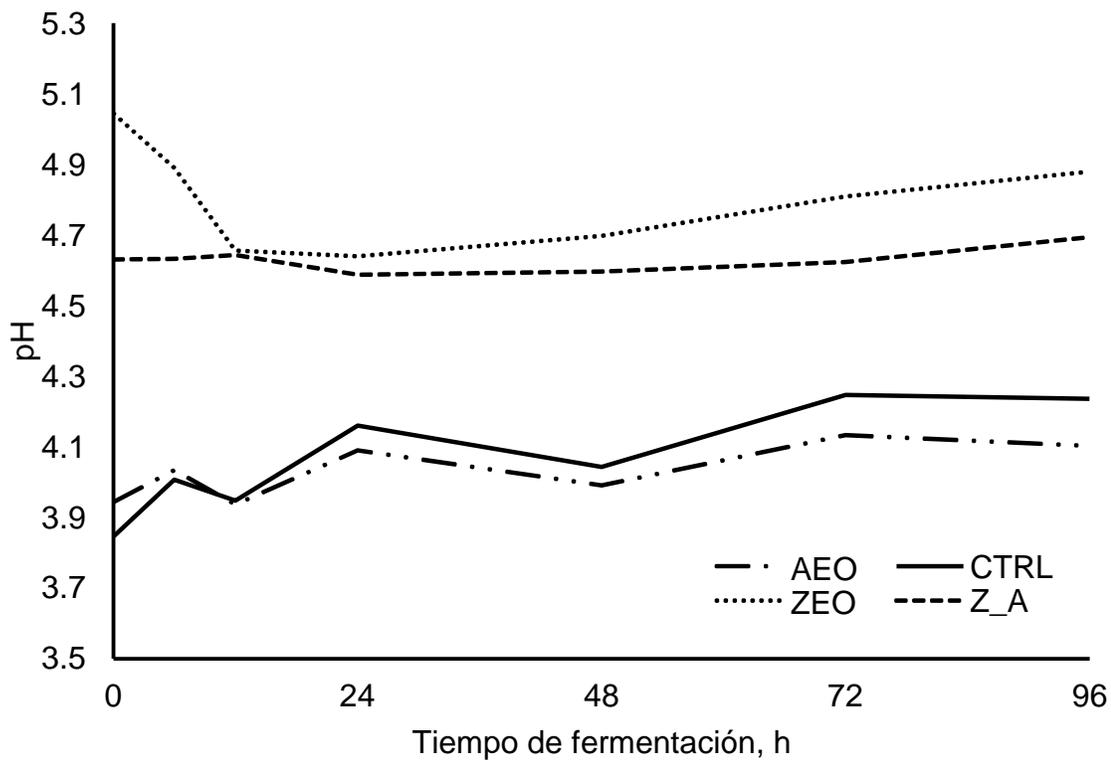
² Literales difieren entre filas.

³ ZEO indica tratamiento con Zeolita al 5 %, AEO tratamiento con Aceite Esencial de Orégano al 0.1 % y ZXA tratamiento con ambos (5 y 0.1 % respectivamente).

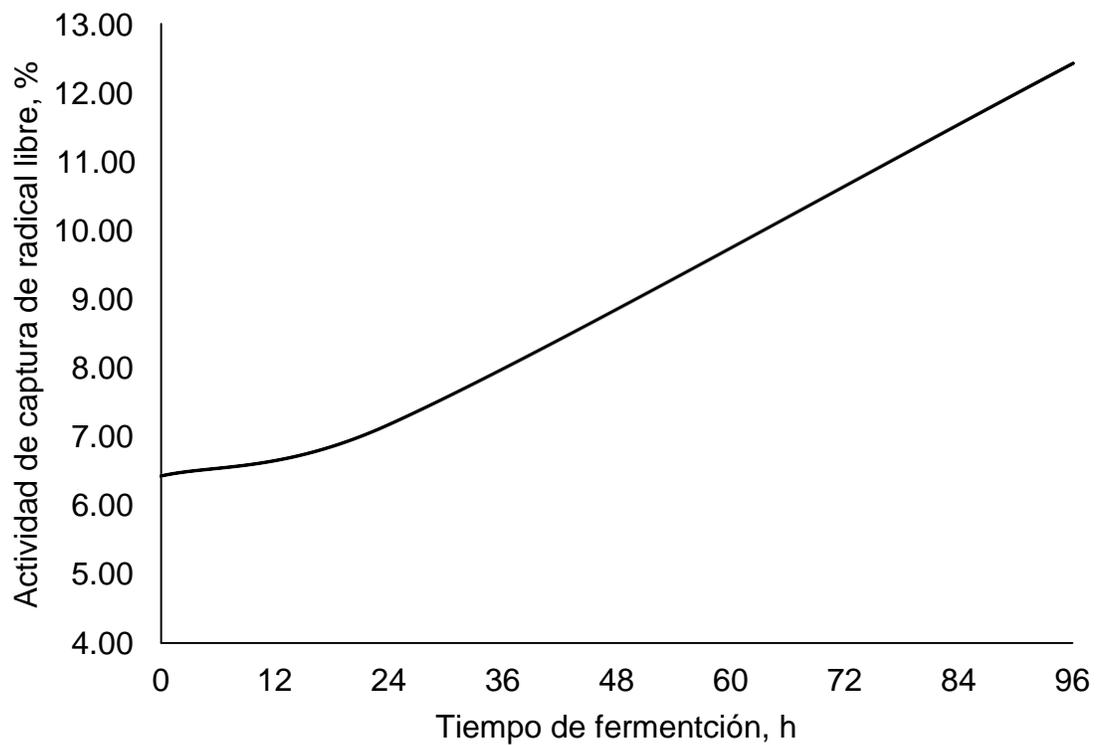


La medición del pH durante el experimento demuestra que existe un efecto de la zeolita para mantener un pH más alto, pues los dos tratamientos que incluyen zeolita tienen un pH significativamente mayor al de los otros tratamientos ($P < 0.01$). Se puede apreciar claramente el efecto que genera la zeolita, pues mantiene el pH estable desde el momento en que es adicionado a la FES, ya que desde la h 0 de fermentación se hace presente su actividad regulatoria del pH, separando estadísticamente los tratamientos ZEO y ZXA de los que no contienen zeolita en su formulación ($P < 0.01$). En la Gráfica 2 se aprecia la fluctuación de pH que se presentó en los tratamientos AEO y Control durante las primeras 24 h, de manera que es evidente el efecto de adsorción de amonio sobre el pH de la zeolita. Estos resultados son similares a los presentados por otros autores, pues explican la capacidad que tiene la zeolita de adsorber moléculas de amonio y otros iones, regulando de esta manera el pH para beneficio del sistema microbiológico (Forte y Maugeri, 2007; Kardaya *et al.*, 2012).

La actividad antioxidante del bagazo de manzana fermentado se incrementó conforme transcurrió el tiempo de fermentación (Gráfica 3), doblando su actividad de 6.44 a 12.43 %, lo cual es concordante por lo presentado por Ajila *et al.* (2011), pues se puede demostrar el aumento en la capacidad antioxidante por dos efectos principalmente: conforme se va llevando a cabo la fermentación en estado sólido, se va agitando el sustrato para airearse, con lo que existe la rotura de tallos, semillas y células de la manzana, liberando los compuestos antioxidantes; por otro lado, el mismo crecimiento de las levaduras hace que las enzimas de estas vayan digiriendo paredes celulares, membranas y vayan



Gráfica 2.- Medias de mínimos cuadrados de pH de la FES de bagazo de manzana adicionado con AEO y ZEO.



Gráfica 3.- Actividad de captura de radical libre en porcentaje, del bagazo de manzana fermentado.



liberando los compuestos con actividad antioxidante de los tejidos de la manzana.

Los resultados de proteína verdadera muestran que existió un incremento de esta durante el transcurso de la fermentación, logrando casi doblar el contenido de la misma en el producto final. A pesar de tener un comportamiento similar, en la última etapa de la fermentación se logró diferenciar perfectamente entre tratamientos ($P < 0.05$) en las horas 72 y 96 (Cuadro 5), diferenciando perfectamente entre el control y los demás tratamientos. La máxima concentración de proteína en la fermentación se dio en la hora 48 para todos los tratamientos, excepto el control, donde esta se presentó hasta la hora 96. Este trabajo es concordante con el trabajo de Bhalla y Joshi (1994), quienes utilizando cepas controladas de *Saccharomyces* lograron proteínas de hasta el 30 %, pero se presentaron resultados inferiores a los de Pirmohammadi *et al.*, (2006), quienes lograron obtener concentraciones de proteína de hasta 40.1 %, aunque en este trabajo no se utilizaron aditivos de otras fuentes de carbono, como en el trabajo citado.

A partir de las curvas de crecimiento que se generaron a partir del recuento de bacterias y levaduras, se puede concluir que a las 48 h se agotan los sustratos de rápida metabolización como los carbohidratos simples, pues se observa un marcado descenso en la velocidad de crecimiento, así como en el número de levaduras y bacterias, por lo que se entiende que los microorganismos se ven forzados a utilizar otros sustratos como fuente de energía para su desarrollo.

Cuadro 5.- Proteína verdadera a través del tiempo de la FES de bagazo de manzana adicionado con AEO y ZEO ^{1,2}

Tiempo de fermentación (h)	Tratamiento ³				±EE
	AEO	AXZ	Control	ZEO	
0	18.51 ^{ab}	18.74 ^a	18.10 ^b	18.60 ^{ab}	0.1333
6	18.73 ^a	19.10 ^a	18.72 ^a	19.09 ^a	0.1219
12	20.15 ^a	19.32 ^b	19.20 ^b	20.15 ^a	0.1778
24	22.65 ^a	19.94 ^b	23.13 ^a	22.57 ^a	0.1851
48	30.49 ^a	30.81 ^a	30.47 ^a	30.25 ^a	0.2822
72	29.21 ^c	28.66 ^c	33.83 ^a	30.26 ^b	0.1466
96	29.23 ^c	28.78 ^c	34.42 ^a	30.74 ^b	0.2445

¹ Literales diferentes entre columnas indican diferencia significativa (P < 0.01).

² Literales difieren entre filas.

³ ZEO indica tratamiento con Zeolita al 5 %, AEO tratamiento con Aceite Esencial de Orégano al 0.1 % y ZXA tratamiento con ambos (5 y 0.1 % respectivamente).



En el tratamiento control no se observó dicho punto de inflexión, por lo que al observar la pendiente del tratamiento control, se ve que el crecimiento fue más lento, por lo que el punto de inflexión, que es cuando agotaron los sustratos de rápida metabolización, se da hasta las 72 h, por lo que se establece que es menos eficiente, pues a las 96 h tiene un recuento de levaduras de $470.5 \times 10^6/g$, equivalente al que presenta el tratamiento ZXA a las 48 h ($462 \times 10^6/g$), por lo que con la adición de Zeolita y Aceite Esencial de Orégano se obtiene el resultado en menos tiempo, mejorando el proceso.

Se observó también que la apariencia de los tratamientos que incluyeron zeolita fue mucho más seca y terrosa que los otros, gracias a las características químicas de la zeolita, ya que esta tuvo un efecto secante, adsorbiendo agua y limitando el crecimiento de los microorganismos al disminuir la actividad de agua en la FES, situación que afecta fácilmente a las bacterias, pero las levaduras logran resistir mejor. Este efecto se puede observar al tener un menor desarrollo en las primeras h, ya que los tratamientos con zeolita tuvieron un desarrollo microbiológico más lento respecto a los otros tratamientos.



CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se concluye que adicionar la fermentación en estado sólido del bagazo de manzana con zeolita y aceite esencial de orégano proporciona ventajas productivas respecto al tratamiento control, pues se alcanza un máximo desarrollo de levaduras en un menor tiempo al adicionar tanto AEO como zeolita clinoptilolita, respecto al tratamiento control, lo que logra un proceso más rápido, seguro y estable.

Se concluye que la adición del aceite esencial de orégano ocasiona una disminución de la cuenta de bacterias mesofílicas aeróbicas en la fermentación en estado sólido, evitando la contaminación bacteriana.

La adición del aceite esencial de orégano y la zeolita no afectan la producción de proteína verdadera, por lo que nos se ve disminuida la eficacia de la fermentación en estado sólido. También se concluye que los valores de pH se mantuvieron constantes en los tratamientos que contuvieron zeolita, por lo que esta tiene un efecto regulador del pH que sirvió de amortiguador.



LITERATURA CITADA

- Ajila, C. M., F. Gassara, S. K. Brar, M. Verma, R. D. Tyagi y J. R. Valéro. 2011. Polyphenolic antioxidant mobilization in apple pomace by different methods of solid-State fermentation and evaluation of Its antioxidant activity. *Food Bioprocess Technol.* 5:2697–2707.
- Bhalla, T. C. y M. Joshi. 1994. Protein enrichment of apple pomace by co-culture of cellulolytic moulds and yeasts. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 10:116–7.
- Castillo, Y., O. Ruiz, C. Angulo, C. Rodríguez, A. Elías y O. La O. 2011. Inclusión de residuos de panadería en algunos metabolitos e indicadores bromatológicos de la fermentación en estado sólido del bagazo de manzana. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola.* 45 141–144.
- Díaz-Plascencia, C. Rodríguez-Muela y P. Mancillas-Flores. 2012. Fermentación in vitro de nopal forrajero con inóculo de levadura *Kluyveromyces lactis* obtenida a partir de manzana de desecho. *Rev. Electron. Vet.* 13:1–11.
- Díaz, D., F. Salvador, O. Ruiz, C. Arzola, A. Flores, O. La O y A. Elías. 2010. Efecto del nivel de urea y pasta de soya en la concentración de proteínas durante la fermentación en estado sólido de manzana de desecho (*Malus domestica*). *Revista Cubana de Ciencia Agrícola* 44 23–26.
- Díaz-Plascencia, D. 2011. Desarrollo de un inóculo a base de levaduras y su efecto en la cinética de fermentación in vitro en raciones para vacas Holstein altas productoras. Tesis de Doctorado. Facultad de Zootecnia y Ecología. Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua, Chih. México.
- Fagbenro, O. y K. Jauncey. 1998. Physical and nutritional properties of moist fermented fish silage pellets as a protein supplement for tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Anim. Feed Sci. Technol.* 71:11–18.
- Forte, M. y F. Maugeri. 2007. Purification of clavulanic acid from fermentation broth using zeolites. *J. Biotechnol.* 131:S191.
- Joshi, V. K. y D. K. Sandhu. 1996. Preparation and evaluation of an animal feed byproduct produced by solid-state fermentation of apple pomace. *Bioresour. Technol.* 56:251–255.
- Kardaya, D., D. Sudrajat y E. Dihansih. 2012. Efficacy of dietary urea-impregnated zeolite in Improving rumen fermentation characteristics of local lamb. *Indones. J. Anim. Sci. Technol.* 35:207–213.
- Lambert, R. J. W., P. N. Skandamis, P. J. Coote y G. J. E. Nychas. 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano



essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.* 91:453–462.

Leung, S., S. Barrington, Y. Wan, X. Zhao y B. El-Husseini. 2007. Zeolite (clinoptilolite) as feed additive to reduce manure mineral content. *Bioresour. Technol.* 98:3309–3316.

Pirmohammadi, R., Y. Rouzbehan, K. Rezayazdi y M. Zahedifar. 2006. Chemical composition, digestibility and in situ degradability of dried and ensiled apple pomace and maize silage. *Small Rumin. Res.* 66:150–155.

SAGARPA. 2009. Monitor agroeconómico 2009 del estado de Chihuahua.

SAS Institute, Inc (2006) SAS/STAT users guide: Statics Version 9 Cary, North Carolina. U.S.A.

Secretaría de Salud. 1995. Norma oficial mexicana NOM-092-SSA1-1994 Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.

Teixeira, B., A. Marques, C. Ramos, C. Serrano, O. Matos, N. R. Neng, J. M. F. Nogueira, J. A. Saraiva y M. L. Nunes. 2013. Chemical composition and bioactivity of different oregano (*Origanum vulgare*) extracts and essential oil. *J. Sci. Food Agric.*



**ESTUDIO II.- USO DE DOS ADITIVOS ANTIMICROBIANOS NATURALES EN
LA PRODUCCIÓN DE UN INÓCULO DE LEVADURAS PROBIÓTICAS**



RESUMEN

USO DE DOS ADITIVOS ANTIMICROBIANOS NATURALES EN LA PRODUCCIÓN DE UN INÓCULO DE LEVADURAS PROBIÓTICAS

POR:

M. C. JOSÉ LUIS GUEVARA VALDEZ

Doctor in Philosophia en Producción Animal

Secretaría de Investigación y Posgrado

Facultad de Zootecnia y Ecología

Universidad Autónoma de Chihuahua

Presidente: D. Ph. Carlos Rodríguez Muela

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto antimicrobiano del aceite esencial de orégano (AEO) en la producción de levaduras probióticas por el método de crecimiento en caldos de melaza, así como medir el efecto de amortiguamiento de pH que tiene la zeolita. Se preparó un sistema de recipientes plásticos con los caldos de melaza inoculados con *Kluyveromyces lactis*, los cuales tuvieron aireación, temperatura de 25 ± 0.5 °C, y mediciones de pH, cuenta de bacterias aeróbicas mesófilas y levaduras por ml de caldo. Se determinó que los caldos con AEO tuvieron una cuenta de bacterias menor (1.1×10^4 UFC/mL) que el control (1.6×10^4 UFC/mL), mientras que los tratamientos que incluyeron zeolita fueron significativamente inferiores (1.0×10^4 UFC/mL). Respecto a las levaduras, se desarrollaron en el tratamiento AEO, obteniendo su máxima concentración a las 72 horas (3.99×10^7 lev/mL), pero se mantuvieron por debajo del tratamiento control (5.2×10^7 lev/mL). La zeolita, por su capacidad de capturar compuestos nitrogenados, evita la biodisponibilidad para el crecimiento



microbiano, afectando bacterias y levaduras, por lo que disminuyeron el rendimiento de los caldos. Se concluye que la inclusión del AEO agrega beneficios antioxidantes y antimicrobianos para los huéspedes. Por tanto, se obtiene un probiótico barato, rico en levaduras, compuestos antioxidantes y seguro.



ABSTRACT

USE OF TWO NATURAL ADDITIVES IN THE PRODUCTION OF A LIQUID YEAST INOCULUM

BY:

JOSE LUIS GUEVARA VALDEZ

This study aimed to evaluate the antimicrobial effect of essential oil of oregano (OEO) in the production of probiotic yeast by the method of growth in molasses broth and measure the effect of zeolite pH buffering. A system of plastic containers with molasses broth inoculated with *Kluyveromyces lactis* was prepared, which had aeration, temperature of 25 ± 0.5 ° C and pH measurements, mesophilic aerobic bacteria counts, and yeasts per ml of broth were measured. It was determined that AEO broths were lower in bacteria count (1.1×10^4 CFU / mL) against the control (1.6×10^4 CFU / mL), while treatments involving zeolite were significantly lower (1.0×10^4 CFU / mL). Regarding yeasts, they were developed in the treatment AEO, obtaining maximum concentration at 72 hours (3.99×10^7 cells / mL), but remained under the control treatment (5.2×10^7 cells / mL). The zeolite, for its ability to capture nitrogen compounds, prevents bioavailability for microbial growth, affecting bacteria and yeast, which results in decreased performance broths. It is concluded that the inclusion of OEO adds antioxidants and antimicrobial benefits for guests. Therefore, a rich yeast, cheap and safe antioxidant compounds probiotic is obtained.



INTRODUCCIÓN

Los medios líquidos para la fermentación o fermentación sólida sumergida son sistemas que tienen muchos años en uso, destacando por su versatilidad en cuanto al manejo y rendimiento de productos, contrario a los sistemas de fermentación en estado sólido, en los que existe la dificultad para controlar todas las variables con la facilidad con que se hace en los caldos (Krishna, 2005).

Las levaduras son organismos unicelulares que se encuentran en casi cualquier parte del planeta, y que se diseminan de manera natural por el aire, el agua y los alimentos, por lo cual, es de natural ocurrencia que estas se encuentren en el tracto gastrointestinal de las especies acuáticas. En los estudios concernientes a estos microorganismos, se ha descubierto que presentan beneficios a los organismos acuáticos, pues tienen componentes, como los β -glucanos, que se usan como inmunoestimulantes, y más recientemente, se ha estudiado su utilización como agentes probióticos en la dieta de peces (Gatesoupe, 2007; Abdel-Tawwab *et al.*, 2008).

El aceite esencial de orégano (AEO) se ha utilizado como una alternativa natural a los conservadores artificiales, dada su actividad antioxidante, inocuidad, capacidad antioxidante y sobre todo, su capacidad antimicrobiana. Gracias a estas propiedades, se considera que la adición de AEO a los caldos basados en melaza y urea para crecimiento de levaduras, proporcionará una defensa contra la contaminación por bacterias que consumirían los sustratos y pudiesen disminuir la eficiencia productiva de las levaduras (Teixeira *et al.*, 2013).



Las zeolitas son materiales arcillosos obtenidos de depósitos sedimentarios. De los más de 40 tipos de zeolitas que se presentan de forma natural, la clinoptilolita es especialmente funcional ya que tiene la capacidad de adsorber compuestos nitrogenados, especialmente NH_4^+ (Li, 2003). La clinoptilolita es un tipo de zeolita que tiene una estructura molecular abierta, con un volumen poroso cercano al 35 % y se encuentra fácilmente en los depósitos minerales a nivel mundial. Esta característica se obtiene gracias a la estructura tridimensional de aluminosilicatos con anillos de cuatro y cinco miembros, con lo que se forman microporos capaces de albergar cationes intercambiables como NH_4^+ , Na^+ , K^+ y Ca^{2+} (Leung *et al.*, 2007). Esta característica de la zeolita puede mejorar el aprovechamiento de los nutrientes durante la fermentación sólida sumergida y mejorar el crecimiento de levaduras.

Por lo tanto, el objetivo principal de este estudio es evaluar el efecto antimicrobiano del Aceite Esencial de Orégano en la producción tradicional de levaduras probióticas en un caldo de melaza adicionado con nitrógeno y azufre. Como objetivos particulares, se busca medir el efecto de amortiguamiento de pH aportado por la Zeolita clinoptilolita y determinar el momento de máxima cuenta de levaduras como el punto final del proceso de producción de levaduras en el producto.



MATERIALES Y MÉTODOS

El presente experimento se llevó a cabo en el laboratorio de microbiología de la Facultad de Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua, para lo cual se prepararon caldos de cultivo basados en melaza con los nutrientes necesarios para la reproducción de levaduras *Kluyveromyces lactis* en tres tratamientos y un control. Se utilizaron los tratamientos control (CTL), que es sólo el caldo nutritivo tradicional de la melaza, compuestos nitrogenados y azufre (Cuadro 6). El tratamiento ZEO, CTL más 2 % del peso total en Zeolita clinoptilolita; el tratamiento AEO, CTL más 0.1 % del peso total en Aceite Esencial de Orégano (AEO); y el tratamiento AXZ, consistente del CTL más una combinación de ambos aditivos (0.1 % de AEO y 2 % de zeolita).

Los caldos fueron colocados en recipientes plásticos de un l, con una piedra aireadora conectada a una bomba de aire funcionando de manera constante, a fin de asegurar una adecuada oxigenación y una corriente generada por el burbujeo, para tener así la completa homogenización del caldo. Estos recipientes se colocaron dentro de una incubadora modelo "Precision 815", de la marca Thermo Fischer Scientific, la cual mantuvo una temperatura constante de 25 ± 0.5 °C durante todo el experimento.

Las levaduras utilizadas fueron la cepa *Kluyveromyces lactis*, recuperadas del banco de microorganismos de la facultad. Para reactivar las levaduras se utilizó un caldo nutritivo de extracto de carne, peptona de soya, extracto de malta y aditivos necesarios (Cuadro 7), preparados expresamente para este fin.



Cuadro 6. Composición de los caldos nutritivos de melaza utilizados en el experimento

Ingrediente	Tratamiento¹			
	Control, %	AEO, %	ZEO, %	AXZ, %
Melaza	24.0	24.0	24.0	24.0
Urea	1.0	1.0	1.0	1.0
Sulfato de amonio	0.2	0.2	0.2	0.2
Inóculo de levadura	3.0	3.0	3.0	3.0
AEO	-	0.1	-	0.1
Zeolita	-	-	2.0	2.0

¹ AEO indica tratamiento con Aceite Esencial de Orégano al 0.1 %, ZEO tratamiento con Zeolita al 2 % y AXZ tratamiento con ambos (0.1 y 2 % respectivamente).



Cuadro 7. Composición química del caldo reactivador de levaduras

Compuesto	Contenido por l de caldo¹
Extracto de carne	10.0 g
Peptona de soya	10.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Dextrosa	5.0 g
Extracto de malta	3.0 g
Almidón soluble	1.0 g
L-Cisteína	0.5 g

¹ Se disuelven 34.5 g en un l de agua y se calienta con agitación hasta disolver. Se esteriliza a 121 °C por 15 minutos.



Las levaduras se mantuvieron durante 96 h en este caldo a 25 °C y se logró una producción de 5.7×10^7 cel/mL.

Se inoculó posteriormente con estas levaduras el caldo nutritivo de melaza a razón de 0.1 % del peso total. Este caldo ya inoculado se dejó en aireación y temperatura controlada durante 72 h dentro de la incubadora, con la finalidad de mantener un ambiente estable.

Variables de Respuesta

Las variables evaluadas fueron la cuenta de bacterias aeróbicas totales en placa (UFC/mL de caldo), Cantidad de azúcar en el caldo (°Bx) pH y cuenta de levaduras (Cel/mL).

Cuenta de levaduras. El conteo de levaduras se realizó por un recuento simple en una cámara de Neubauer mejorada, por el método descrito por Díaz-Plascencia (2011), donde se tomó una muestra de 1 mL del caldo, que se llevó a diluciones seriadas, para después colocarse cada una de ellas en una cámara de Neubauer, donde fueron contadas las levaduras (individuales o en gemación) en los cuatro cuadrantes del rayado. A partir de estos datos se calcula la cantidad de levaduras por mL del caldo nutritivo de melaza.

Cuenta bacteriológica. El recuento bacteriológico se llevó a cabo de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994 Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. Se toma un mL de la muestra del caldo nutritivo, se diluye 6 veces en el medio diluyente, y se inocula en cada caja Petri, corriendo por triplicado todas las muestras. Después de inocular las diluciones de las muestras en las cajas Petri, agregar de 12 a 15 mL del medio cuenta estándar preparado, mezclarlo mediante 6 movimientos de derecha a izquierda,



6 en el sentido de las manecillas del reloj, 6 en sentido contrario y 6 de atrás a adelante, sobre una superficie lisa y horizontal hasta lograr una completa incorporación del inóculo en el medio y se deja solidificar. Se incluye una caja sin inóculo por cada medio y diluyente preparado como testigo de esterilidad. Se incuban las cajas en posición invertida a 35 ± 2 °C por 48 ± 2 h.

Después de la incubación, se cuentan las placas que se encuentren en el intervalo de 25 a 250 colonias, usando el contador de colonias y el registrador. Se calcula la cuenta promedio por mL de dicha dilución.

pH. Las mediciones de pH se tomaron con un potenciómetro digital marca Hanna, sumergiendo el mismo en el caldo y agitándolo mientras se espera a que llegue al punto de estabilidad y marque la lectura en la pantalla.

Sólidos solubles. La medición de concentración de azúcares se realizó con un refractómetro digital marca Hanna, al cual se le agrega una gota del caldo en el vidrio lector, se activa la medición y automáticamente da la lectura en grados Brix.

Diseño Experimental

Se establecieron cuatro tratamientos: el adicionado con aceite esencial de orégano (AEO), adicionado con zeolita (ZEO) y la interacción de los mismos, (AXZ), además del control, que fue el método tradicional (CTL).

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado, con cuatro repeticiones por cada tratamiento. Se obtuvieron tres muestras de cada repetición a los tiempos 0, 6, 24, 48 y 72 h, para de esta manera tener 12 muestras por tratamiento en cada momento de medición.

Técnica Estadística para la Prueba de Hipótesis



Se utilizó una prueba de ANOVA de una vía para comparar las variables de cuenta de bacterias aeróbicas, pH, contenido de azúcares y cuenta de levaduras en el caldo, además de una comparación de medias de Tukey entre tratamientos, considerando estadísticamente significativos los tratamientos a $P < 0.05$. Para el crecimiento de levaduras y bacterias respecto al tiempo se realizó un estudio de mediciones repetidas en el tiempo con el procedimiento Proc Mixed, encontrando efectos significativos a $P < 0.05$. El tratamiento estadístico se realizó con el paquete computacional SAS, versión 9.1.3 (SAS, 2006).



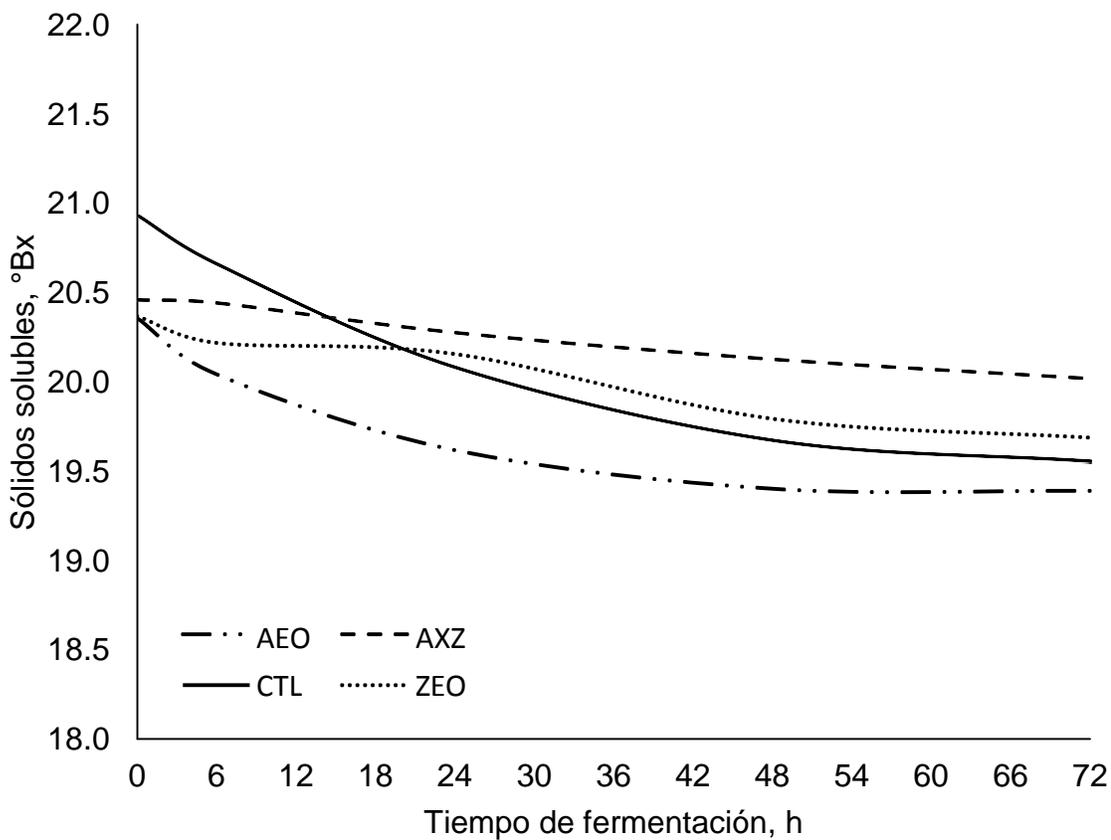
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El comportamiento de la cuenta de levaduras por mL de caldo de melaza se desarrolló de una manera lineal, aumentando conforme avanzó el tiempo, aunque presentando mayor aumento de microorganismos por unidad de tiempo en el CTL ($P > 0.05$), que representa el método tradicional de desarrollar levaduras en caldos de melaza, donde se llegó a una cuenta máxima de 5.27×10^7 células de levaduras por mL, seguido del AEO, el cual tuvo una fase de adaptación mayor, pues hasta las 48 h empezó el crecimiento exponencial (Cuadro 8) y tuvo una cuenta máxima de 3.99×10^7 cel/mL de caldo. Por otra parte, los tratamientos AXZ y ZEO, adicionados con Zeolita clinoptilolita tuvieron un desarrollo de levaduras marcadamente lento ($P > 0.05$), y obteniendo una cuenta máxima de levaduras de apenas 1.8×10^7 y 1.9×10^7 cel/mL respectivamente. Este desarrollo de levaduras se puede ver reflejado en la concentración de sólidos solubles, pues los valores iniciales, cercanos a $21 \text{ }^\circ\text{Bx}$, disminuyeron considerablemente (Gráfica 4), lo cual significa que las levaduras hicieron uso de los azúcares disponibles para su multiplicación. Sin embargo, los principales descensos se dieron en los tratamientos CTL y AEO, lo cual concuerda con que dichos tratamientos son aquellos que tuvieron mayor cuenta total de levaduras. Mientras que los tratamientos AXZ y ZEO mantuvieron la concentración de sólidos solubles más estables, lo cual también concuerda con el menor desarrollo de levaduras.

Cuadro 8. Concentración de levaduras por mL de caldo, expresado en levaduras x 10⁶/mL de caldo por h

h	Tratamiento ¹				
	AEO	AXZ	CTL	ZEO	E.E.
6	15.63 ^b	1.35 ^c	20.75 ^a	1.10 ^c	1.6404
24	19.25 ^b	4.05 ^c	33.75 ^a	6.20 ^c	1.3941
48	31.78 ^b	6.40 ^c	41.65 ^a	8.65 ^c	1.7383
72	39.96 ^b	10.85 ^d	52.70 ^a	19.15 ^c	1.7058

¹ AEO indica tratamiento con Aceite Esencial de Orégano al 0.1 %, ZEO tratamiento con Zeolita al 2 % y AXZ tratamiento con ambos (0.1 y 2 % respectivamente). CTL indica el tratamiento Control.

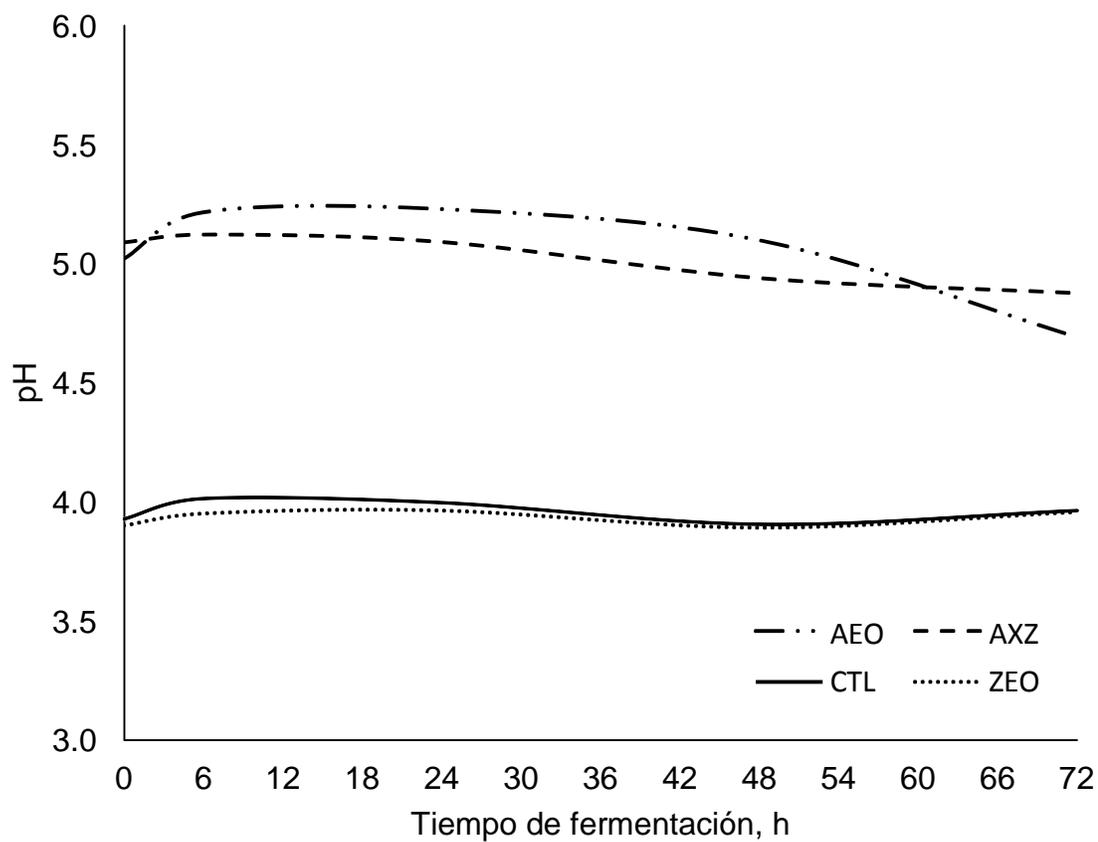


Gráfica 4. Azúcares solubles en el caldo contra el tiempo del experimento, expresado en °Bx.



La concentración de iones hidrógeno, medido en forma de pH, se mantuvo relativamente constante, pues no hubo una gran fluctuación a lo largo de los tratamientos, salvo la modificación inicial que se dio por la adición del aceite esencial de orégano a los tratamientos AEO y AXZ, que llevó los valores de pH hasta números cercanos al 5 (Gráfica 5), mientras que los tratamientos CTL y ZEO, que no tuvieron AEO, se mantuvieron en valores muy estables en un pH de 4 ($P > 0.05$). Estos resultados concuerdan con el poco desarrollo de bacterias, pues al existir una adecuada oxigenación y un correcto movimiento y homogenización se evitó el estancamiento del caldo, con lo que se hubieran generado zonas de anaerobiosis, las cuales permitirían la fermentación anaeróbica a ácido láctico y alcohol, factores que hubieran alterado la acidez del caldo (Grewal y Kalra, 1995).

En el caso de la presencia de bacterias, estas mostraron un desarrollo escaso, pues no superaron una concentración de 2.11×10^4 UFC/mL, la cual es baja, comparada con los trabajos de otros autores (Chun *et al.*, 2005), pues en este experimento se mantuvieron las condiciones de agitación y oxigenación constante, además de un pH cercano al 4, por lo que se dieron pocas condiciones para el desarrollo de las bacterias anaeróbicas mesofílicas totales. En el tratamiento CTL fue donde hubo más crecimiento bacteriano ($P > 0.05$), con 2.11×10^4 UFC/mL, pues no contenía ningún aditivo que inhibiera su crecimiento, salvo los parámetros fisicoquímicos conferidos por la melaza y la misma competencia por los nutrientes contra las levaduras. En segundo lugar, se presentó el tratamiento AEO, el cual tuvo una concentración máxima de 1.7×10^4 UFC/mL, quedando por debajo del control, mientras que, en una situación muy



Gráfica 5. pH en el caldo contra el tiempo del experimento.



parecida, los tratamientos AXZ y ZEO tuvieron un desarrollo bacteriano inferior ($P > 0.05$), no superando los 1.08×10^4 UFC/mL (Cuadro 9), lo cual indica que la adición de zeolita dificulta la disponibilidad de los nutrientes para todos los microorganismos, disminuyendo la cuenta total de bacterias, además de levaduras.



Cuadro 9. Concentración de bacterias aeróbicas mesófilas totales por mL de caldo, expresado en UFC/mL de caldo

h	Tratamiento ¹				
	AEO	AXZ	CTL	ZEO	E.E.
6	2.22 x10 ³	1.76 x10 ²	4.84 x10 ³	1.49 x10 ²	8.76
24	8.49 x10 ³	2.25 x10 ³	1.08 x10 ⁴	2.41 x10 ³	2.04
48	1.74 x10 ⁴	9.78 x10 ³	2.12 x10 ⁴	1.05 x10 ⁴	4.02
72	1.34 x10 ⁴	1.08 x10 ⁴	1.64 x10 ⁴	1.05 x10 ⁴	3.52

¹ AEO indica tratamiento con Aceite Esencial de Orégano al 0.1 %, ZEO tratamiento con Zeolita al 2 % y AXZ tratamiento con ambos (0.1 y 2 % respectivamente). CTL indica el tratamiento Control.



CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se concluye que la utilización del Aceite Esencial de Orégano proporciona ventajas microbiológicas respecto al proceso de producción tradicional de levaduras en un caldo de melaza y urea, con lo que se disminuye el tiempo de producción, y se evita la contaminación por bacterias ajenas. Estas mejoras garantizan un proceso limpio y libre de contaminantes microbiológicos.

La adición de zeolita afecta el desarrollo de los microorganismos del caldo, por lo tanto, a pesar de que genera un beneficio en el pH, no se recomienda su uso en los caldos de melaza y urea.

El desarrollo de las bacterias se ve afectado significativamente por la inclusión de AEO, a bajas concentraciones, lo que implica que con poca cantidad de AEO, se puede garantizar un adecuado proceso de producción de levaduras.

El caldo de melaza y urea permite el adecuado desarrollo de la levadura *Kluyveromyces lactis*, así como su multiplicación hasta llegar a cantidades aceptables para preparar inóculos para animales terrestres a precio muy reducido. Otra conclusión es que la inclusión de AEO beneficia al proceso por que evitó la formación de burbujas, disminuyendo así la pérdida de caldo en forma de espuma.



LITERATURA CITADA

- Abdel-Tawwab, M., A. M. Abdel-Rahman y N. E. M. Ismael. 2008. Evaluation of commercial live bakers' yeast, *Saccharomyces cerevisiae* as a growth and immunity promoter for Fry Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* challenged in situ with *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture* 280:185–189.
- Chun, S.-S., D. A. Vatter, Y. T. Lin y K. Shetty. 2005. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. *Process Biochem.* 40:809–816.
- Díaz-Plascencia, D. 2011. Desarrollo de un inóculo a base de levaduras y su efecto en la cinética de fermentación in vitro en raciones para vacas Holstein altas productoras. Tesis de Doctorado. Facultad de Zootecnia y Ecología. Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua, Chih. México.
- Gatesoupe, F. J. 2007. Live yeasts in the gut: natural occurrence, dietary introduction, and their effects on fish health and development. *Aquaculture* 267:20–30.
- Grewal, H. S. y K. L. Kalra. 1995. Fungal production of citric acid. *Biotechnol. Adv.* 13:209–234.
- Krishna, C. 2005. Solid-state fermentation systems-an overview. *Crit. Rev. Biotechnol.* 25:1–30.
- Leung, S., S. Barrington, Y. Wan, X. Zhao y B. El-Husseini. 2007. Zeolite (clinoptilolite) as feed additive to reduce manure mineral content. *Bioresour. Technol.* 98:3309–3316.
- Li, Z. 2003. Use of surfactant-modified zeolite as fertilizer carriers to control nitrate release. *Microporous Mesoporous Mater.* 61:181–188.
- SAS Institute, Inc (2006) SAS/STAT users guide: Statics Version 9 Cary, North Carolina. U.S.A.
- Secretaría de Salud. 1995. Norma oficial mexicana NOM-092-SSA1-1994 Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.
- Teixeira, B., A. Marques, C. Ramos, C. Serrano, O. Matos, N. R. Neng, J. M. F. Nogueira, J. A. Saraiva y M. L. Nunes. 2013. Chemical composition and bioactivity of different oregano (*Origanum vulgare*) extracts and essential oil. *J. Sci. Food Agric.*



**ESTUDIO III.- INCLUSIÓN DE BAGAZO DE MANZANA FERMENTADO Y UN
PROBIÓTICO (*Kluyveromyces lactis*) EN LA DIETA DE TILAPIAS
(*Oreochromis niloticus*) DURANTE SU ETAPA JUVENIL**



RESUMEN

INCLUSIÓN DE BAGAZO DE MANZANA FERMENTADO Y UN PROBIÓTICO (*Kluyveromyces lactis*) EN LA DIETA DE TILAPIAS (*Oreochromis niloticus*)

DURANTE SU ETAPA JUVENIL

POR:

M. C. JOSÉ LUIS GUEVARA VALDEZ

Doctor in Philosophia en Producción Animal

Secretaría de Investigación y Posgrado

Facultad de Zootecnia y Ecología

Universidad Autónoma de Chihuahua

Presidente: Ph. D. Carlos Rodríguez Muela

El objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos del bagazo de manzana fermentado (BMF) y el inóculo de levaduras (IL) *Kluyveromyces lactis* en la dieta de tilapias. Las variables evaluadas fueron ganancia de peso, longitud, Tasa de conversión Alimenticia (TCA) y rendimiento de filete. Se prepararon cuatro dietas, incluyendo 10 % de BMF (Dieta MAN), 3 % de IL (Dieta PRB) y una mezcla de ambos (Dieta MXP), comparadas con un control (CTL). Semanalmente se tomaron mediciones de los peces y posteriormente se sacrificaron para obtener el filete. Los peces alimentados con BMF presentaron un peso significativamente mayor al sacrificio (37.93 g), que el control (34.92 g), mientras que los adicionados con IL fueron significativamente menores (32.42 g) ($P < 0.05$). La ganancia de longitud tuvo efecto de tratamiento ($P > 0.05$), teniendo mayor efecto la dieta MAN (92.19 mm) respecto al control (88.38 mm), y la dieta PRB (83.84 mm) ($P < 0.05$). Asimismo, existió una diferencia respecto a la TCA ($P > 0.05$)



porque la Dieta MAN tuvo una TCA de 1.78, mientras que el control obtuvo 1.91. El rendimiento de filete fue mayor ($P > 0.05$) en los tratamientos CTL y dieta MAN (52.33 y 51.15 %) que MXP y PRB (44.51 y 46.4 %). Se concluye que el BMF actúa como una fuente de proteína microbiana de buena calidad y alta digestibilidad, además, mientras que la levadura no presentó efectos positivos en el pez, los compuestos antioxidantes presentes en el BMF proporcionaron beneficios que se traducen en una mejora en los parámetros productivos.



ABSTRACT

INCLUSION OF FERMENTED APPLE POMACE AND A PROBIOTIC (*Kluyveromyces lactis*) IN YOUNG TILAPIA (*Oreochromis niloticus*) DIETS

BY:

JOSE LUIS GUEVARA VALDEZ

The aim of this study was to evaluate the effects of fermented apple pomace (FAP) and the yeast inoculum (YI) of *Kluyveromyces lactis* in the diet of tilapia. The variables evaluated were weight gain, length, feed conversion rate (FCR) and fillet yield. four diets were prepared including 10 % FAP (Diet MAN), YI 3 % (Diet PRB) and a mixture of both (Diet MXP), compared with (CTL) control. Weekly measurements of fish were taken and subsequently sacrificed for the fillet. FAP fed fish had a significantly higher weight (37.93 g) which control (34.92 g), while added with YI were significantly lower (32.42 g) ($P < 0.05$). The gain in length had treatment effect ($P > 0.05$), with greater effect in the MAN diet (92.19 mm) compared to the control (88.38 mm) and PRB (83.84 mm) ($P < 0.05$) diet. Also, there was a difference from the FCR ($P > 0.05$) because the Diet MAN had a TCA 1.78, while the control obtained 1.91. Fillet yield was higher ($P > 0.05$) in the CTL and MAN treatments (52.33 and 51.15 %) than MXP and PRB (44.51 and 46.4 %). It is concluded that the FAP acts as a source of microbial protein of good quality and high digestibility, also, while the yeast did not show positive effects on the fish, antioxidant compounds present in the BMF will provide benefits that result in an improvement in production parameters.



INTRODUCCIÓN

La Tilapia (*Oreochromis* sp.) es una especie que ha tenido un creciente interés en la industria de la acuicultura en los últimos años, siendo la segunda especie de agua dulce cultivada en el mundo, después de la carpa (Atwood *et al.*, 2003).

En los sistemas productivos de tilapia, una gran parte de los costos de producción corresponden al alimento, utilizando proteína de origen animal, generalmente harinas de pescado, lo que aumenta considerablemente el costo de los alimentos. Por lo tanto, la búsqueda de fuentes de proteína de origen vegetal o microbiana de buena calidad son una prioridad en la producción piscícola, ya que son actualmente la fuente más demandada (Ribeiro *et al.*, 2014).

La manzana es una fuente natural de antioxidantes, que además de proveer una gran cantidad de estos, es un excelente sustrato para la producción de microorganismos por medio de la fermentación en estado sólido, siendo estos capaces de romper las estructuras celulósicas (Dhillon *et al.*, 2012) y liberar los compuestos fenólicos contenidos en ellos para hacerlos disponibles a los consumidores de este fermento (Ajila *et al.*, 2011).

El bagazo de manzana (BM), consiste en los residuos de la obtención del jugo, estando compuesto por cáscaras, semillas, corazones, tallos y restos de pulpa y tejidos suaves, por lo que se considera un producto de alto valor nutricional (García *et al.*, 2009). Al utilizar este material como ingrediente en las dietas de animales se enfrenta el productor a varios problemas, como su deficiencia de proteína digestible, su alto contenido de humedad y su bajo pH,



por lo que el desarrollo de proteína microbiana en este medio se presenta como una excelente alternativa para aumentar su nivel de proteína y modificar su pH, con lo que se le puede destinar para la alimentación animal como un complemento alimenticio de alta calidad, aportando proteína a un costo inferior al de las harinas animales, y con una digestibilidad similar (Bhalla y Joshi, 1994).

Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la inclusión del Bagazo de Manzana Fermentado (BMF) como fuente de proteína y antioxidantes y el uso de inóculo de levadura (IL) como fuente de probióticos en los parámetros productivos de la tilapia.



MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo en el módulo de piscicultura de la Facultad de Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua, en la ciudad de Chihuahua, México, acondicionado en temperatura, luz y una batería de peceras con un sistema hidráulico recirculante, el cual incluye filtrado fisicoquímico para mantener condiciones biológicas necesarias para sustentar la vida de organismos acuáticos y su óptimo desarrollo a lo largo de sus etapas productivas.

El movimiento de agua se llevó a cabo por medio de una bomba Pedrollo PKm 60, de 0.5 hp de potencia, a un gasto promedio de 40 l/min para todo el sistema, con lo que se asegura una adecuada oxigenación. El sistema de filtración se compone de un tanque de vidrio de 6 mm de espesor, que contiene los medios filtrantes, compuestos de carbón activado, granzón y zeolita, las cuales efectúan filtración física y química, que permiten el establecimiento de las colonias de bacterias desnitrificantes, favoreciendo un adecuado nivel de compuestos nitrogenados de desecho en el agua. Se contó también con un sistema de luz ultravioleta, la cual por medio de dos tubos de 15 W, irradian el agua para así acabar con posibles parásitos y sus formas vegetativas, manteniendo la sanidad acuícola y calidad del agua.

El agua se mantuvo constantemente monitorizada en cuanto a su calidad en cuanto a parámetros de Concentración de Oxígeno, Concentración de Nitratos, Concentración de CO₂, Temperatura y Concentración de Amonio, de manera que siempre se mantuvieron constantes y dentro de los rangos óptimos para la especie, y de esta manera evitar la influencia en los resultados del experimento.



El inóculo de levaduras (IL) que se utilizó fue el mismo que se obtuvo en el Estudio II, y se ajustó a una concentración de 1×10^6 levaduras por mL, por un recuento simple en una cámara de Neubauer por el método descrito por Díaz-Plascencia (Díaz-Plascencia, 2011), donde se toma una muestra de 1 mL del inóculo, y se lleva a diluciones seriadas, hasta obtener la concentración adecuada.

La formulación de la dieta se hizo en el software de formulación Nutrion 5, en base a las recomendaciones del N.R.C. (National Research Council) para la Tilapia (*Oreochromis niloticus*), haciendo la modificación necesaria para incluir los niveles de BMF sin alterar los aspectos nutricionales del alimento. Las dietas quedaron formuladas como se establece en el cuadro 10, utilizando el nivel de inclusión de 10 % de BMF (MAN), 3 % de IL (PRO) y su interacción (MXP), contrastadas contra una dieta control (Dieta CTL). Estas dietas fueron preparadas en el laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Zootecnia y Ecología, donde los ingredientes se homogeneizaron y humectaron a un 24 % p/p para poder ser peletizados en un molino de carne comercial. Los pellets ya formados se dejaron secar a temperatura ambiente en charolas permeables al aire por 48 hs hasta alcanzar una humedad del 8 %, quedando un alimento de color amarillo, de adecuada consistencia y de agradable olor y sabor para el pez.

Una vez formuladas las dietas se les realizó el análisis proximal por métodos convencionales de la A.O.A.C. (Association of Official Analytical Chemistry) para evaluar sus contenidos nutricionales y determinar si existen diferencias entre ellas.



Cuadro 10.- Composición de las dietas utilizadas en el experimento

Ingrediente	Dieta ¹			
	Control (%)	MAN (%)	PRB (%)	MXP (%)
Pasta de soya	62.9	45.8	62.9	45.8
Aceite vegetal	6.2	6.4	6.2	6.4
Leche en polvo	11.0	10.0	11.0	10.0
Maíz molido	12.5	19.6	12.5	19.6
Harina de carne	5.0	5.0	5.0	5.0
Premix V y M	0.3	0.3	0.3	0.3
Carbonato de Ca	1.1	1.1	1.1	1.1
Sal	1.0	1.0	1.0	1.0
IL	-	-	3.0	3.0
BMF	-	10.0	-	10.0

¹ MAN indica tratamiento con BFM al 10 %, PRB tratamiento con IL al 3 % y MXP tratamiento con ambos (10 y 3 % respectivamente).



Los peces utilizados fueron Tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) de una pulgada de tamaño promedio, de dos semanas de edad, obtenidos en el centro de piscicultura de la Boquilla, en el municipio de San Francisco de Conchos, del Estado de Chihuahua, México. Los peces obtenidos fueron previamente masculinizados para evitar interferencia por el factor sexo.

Se establecieron cuatro tratamientos: la dieta adicionada con bagazo de manzana fermentado (MAN), la dieta adicionada con inóculo de levaduras (PRO) y la interacción de los mismos, (MXP), así como la dieta control, siendo esta la comercial para tilapia (CTL). Quedando como tratamientos:

1. MAN: Dieta formulada con 10 % de BMF.
2. PRO: Dieta adicionada con 3 % de IL.
3. MXP: Dieta formulada con 10 % de BMF y 3 % de IL.
4. CTL: Dieta control.

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado, donde se usaron peceras de vidrio con diez peces cada una como unidad experimental, contando con cinco repeticiones por cada tratamiento, dando un total de 20 peceras. De cada pecera se tomaron tres peces al azar cada semana para obtener las mediciones, teniendo tres réplicas por cada repetición.

Variables de Respuesta

Ganancia de peso y longitud. A lo largo de 8 semanas, los peces fueron pesados y medidos cada 7 d, de acuerdo a lo descrito por Crivelenti (Crivelenti y Mundim, 2011), pesándolos en una balanza electrónica por triplicado, tomados al azar de cada una de las 21 peceras y se midieron en su longitud, alto y ancho con un vernier milimétrico. Para facilitar el manejo de los animales, una vez



removidos de su pecera se pasaron por agua fría unos segundos para disminuir su actividad y poder ser manipulados sin riesgo a generar daños a los mismos peces.

La dieta les fue suministrada en función de la masa de la unidad experimental y a la proporción marcada por el NRC para el crecimiento óptimo.

Rendimiento de filete. Una vez terminado el ensayo a las 8 semanas, los peces se sacrificaron por sección cefálica después de haber sido pesados, medidos y sedados con hielo. Se obtuvo el filete de cada pez de manera manual, se pesaron y fueron congelados a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis químico (Fagbenro y Jauncey, 1998).

Tasa de sobrevivencia. Los peces se contaron cada d, anotando en la bitácora si hubo mortandad cada d. En los casos donde hubo mortandad se analizó el cuerpo del pez para detectar posibles marcas de enfermedades, y se anotó en la bitácora.

Diseño Experimental:

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó una prueba de ANOVA de una vía para comparar las variables productivas en cada semana y análisis proximal, además de una comparación de medias de Tukey entre tratamientos, considerando estadísticamente significativos los tratamientos a $P < 0.05$. Para la ganancia de peso y longitud de los peces respecto al tiempo se realizó un estudio de medias repetidas en el tiempo con el procedimiento Proc Mixed, encontrando efectos significativos a $P < 0.05$. El tratamiento estadístico se realizó con el paquete computacional SAS, versión 9.1.3 (SAS Institute, 2006).



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis proximal de las dietas mostró que hubo sólo diferencia estadísticamente significativa en los niveles de fibra cruda, esto gracias a la inclusión del BMF, que tiene una cantidad importante de fibra, sin embargo, esta inclusión no logra modificar los niveles energéticos ni supera la cantidad recomendada de fibra para la especie (FAO, 2010), por lo que se usaron dietas isocalóricas e isoproteicas para el experimento (Cuadro 11)

En el presente estudio se obtuvo un efecto significativo ($P < 0.05$) de la inclusión de BMF en la dieta de las crías de Tilapia en etapa de crecimiento, presentando una mayor ganancia de peso ($P < 0.05$), mayor ganancia en longitud ($P < 0.05$) y menor TCA ($P < 0.05$) (Cuadro 12), mientras que la inclusión de IL presentó un efecto negativo en las mismas variables. Por otra parte, la interacción del BMF y el IL obtuvieron buena respuesta en las variables estudiadas, aunque aún menor que la dieta con BMF, pero mayor a la dieta control (Cuadros 13 y 14). Este efecto se puede explicar por la presencia de agentes antioxidantes en el BMF, lo cual fue corroborado en el experimento II. Este trabajo es concordante con lo reportado por otros autores, donde gracias a la inclusión de subproductos de la industria frutícola se proporcionan antioxidantes a las dietas de peces y se obtienen mejoras en sus parámetros productivos (Sahin *et al.*, 2014; Brenes *et al.*, 2016).

En el aspecto del control de calidad del agua y parámetros fisicoquímicos del medio ambiente en que se desarrollaron los peces, se puede decir que no existió una diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos ($P > 0.05$), sin embargo, existe una tendencia a la baja en la temperatura gracias



Cuadro 11. Análisis proximal realizado a las dietas utilizadas en el experimento

Tratamiento ¹	Extracto etéreo, %	Proteína, %	Ceniza, %	Fibra Cruda, %	E.L.N., %
MAN	8.27 ^a	34.31 ^a	8.07 ^a	8.04 ^a	41.30 ^b
PRB	8.49 ^a	34.98 ^a	8.67 ^a	5.03 ^b	42.80 ^{ab}
MXP	8.77 ^a	33.85 ^a	7.20 ^a	8.16 ^a	41.98 ^b
Control	8.34 ^a	33.51 ^a	6.73 ^a	5.01 ^b	46.39 ^a

¹ MAN indica tratamiento con BFM al 10 %, PRB tratamiento con IL al 3 % y MXP tratamiento con ambos (10 y 3 % respectivamente).
Literales diferentes entre fila indican diferencia estadística ($P > 0.05$)

Cuadro 12. Tasa de conversión alimenticia (TCA) de los peces por tratamiento¹ durante el experimento²

Semana	CTL	MAN	MXP	PRB
1	2.3469 ^{ab}	2.1356 ^b	2.0791 ^b	2.8724 ^a
2	1.7044 ^{ab}	1.2061 ^b	1.8873 ^{ab}	1.9057 ^a
3	1.8944 ^a	1.6103 ^{ab}	1.4577 ^b	1.7866 ^a
4	1.8958 ^a	1.0950 ^d	1.5841 ^c	1.7500 ^b
5	1.5593 ^c	2.2320 ^a	1.6496 ^b	2.0565 ^{ab}
6	2.0058 ^c	1.9989 ^c	2.4841 ^b	2.9477 ^a
7	1.8993 ^a	1.6871 ^b	1.8531 ^{ab}	1.9200 ^a
8	2.0392 ^c	2.3483 ^{ab}	2.3062 ^{ab}	2.4100 ^a
Promedio	1.9181 ^{ab}	1.7891 ^c	1.9127 ^{ab}	2.2061 ^a

¹ MAN indica tratamiento con BFM al 10 %, PRB tratamiento con IL al 3 % y MXP tratamiento con ambos (10 y 3 % respectivamente).

² Diferentes literales entre columna indican diferencia estadística significativa en la comparación de medias de Tukey ($P > 0.05$)

Cuadro 13. Peso promedio semanal en gramos de los peces por tratamiento¹ durante el experimento

Semana	CTL (g)	MAN (g)	MXP (g)	PRB (g)	E.E.
0	7.14 ^a	7.5 ^a	8.15 ^a	6.87 ^a	0.50
1	8.30 ^{ab}	9.46 ^a	9.08 ^{ab}	7.21 ^a	0.52
2	10.54 ^{ab}	12.65 ^a	11.03 ^{ab}	10.06 ^b	0.67
3	12.76 ^b	15.78 ^a	14.05 ^{ab}	12.30 ^b	0.80
4	17.69 ^{ab}	21.34 ^a	18.26 ^b	17.16 ^b	1.05
5	21.5 ^{ab}	24.75 ^a	22.22 ^{ab}	20.14 ^b	1.28
6	25.32 ^{ab}	27.7 ^a	25.41 ^{ab}	22.58 ^c	1.50
7	30.25 ^{ab}	33.44 ^a	30.21 ^{ab}	27.77 ^c	1.57
8	34.92 ^{ab}	37.93 ^a	34.34 ^{ab}	32.42 ^c	1.80

¹ MAN indica tratamiento con BFM al 10 %, PRB tratamiento con IL al 3 % y MXP tratamiento con ambos (10 y 3 % respectivamente).

² Diferentes literales entre columna indican diferencia estadística significativa en la comparación de medias de Tukey ($P > 0.05$)

Cuadro 14. Longitud promedio semanal en milímetros de los peces por tratamiento¹ durante el experimento

Semana	CTL (mm)	MAN (mm)	MPX (mm)	PRB (mm)	E.E.
0	48.13 ^a	48.90 ^a	49.68 ^a	48.72 ^a	2.17
1	52.62 ^a	56.08 ^b	52.90 ^a	52.00 ^a	2.25
2	56.90 ^{ab}	60.86 ^a	58.29 ^{ab}	55.44 ^b	2.13
3	62.91 ^{ab}	65.07 ^a	61.81 ^{ab}	58.65 ^b	2.18
4	68.03 ^{ab}	71.38 ^a	67.82 ^{ab}	65.26 ^b	2.50
5	72.68 ^{ab}	77.84 ^a	73.06 ^{ab}	70.48 ^b	2.48
6	76.73 ^{ab}	81.37 ^a	76.14 ^{ab}	75.08 ^b	2.26
7	82.60 ^{ab}	86.51 ^a	82.86 ^{ab}	80.28 ^b	2.53
8	88.38 ^{ab}	92.19 ^a	89.51 ^{ab}	83.84 ^c	2.64

¹ MAN indica tratamiento con BFM al 10 %, PRB tratamiento con IL al 3 % y MPX tratamiento con ambos (10 y 3 % respectivamente).

² Diferentes literales entre columna indican diferencia estadística significativa en la comparación de medias de Tukey ($P > 0.05$)

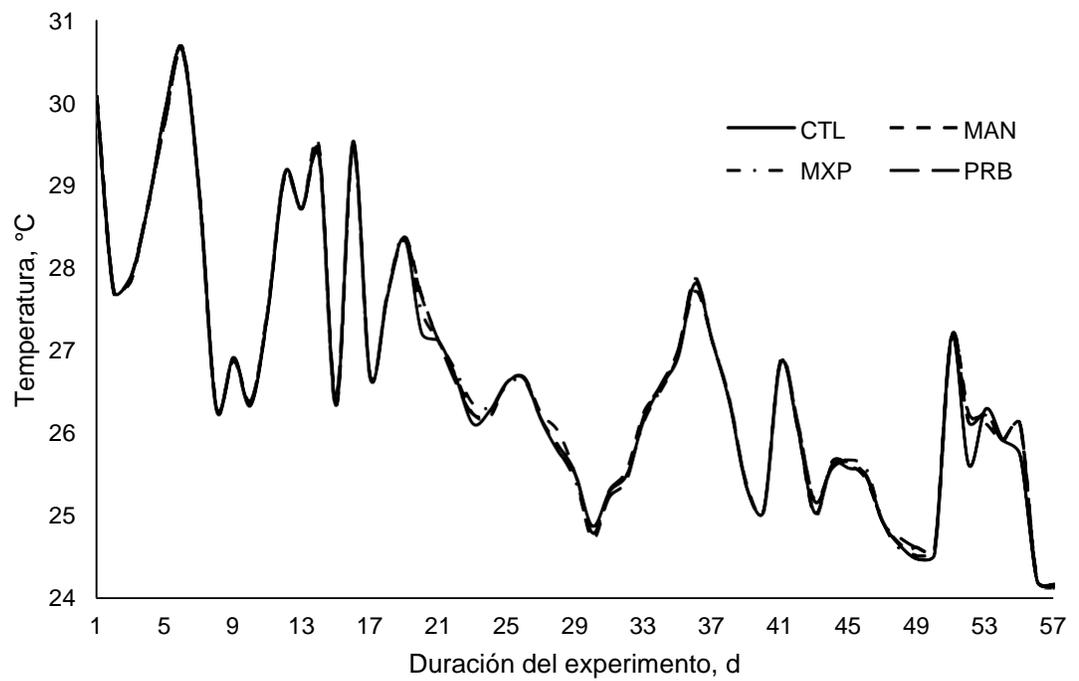


al cambio normal de temperatura ambiental a lo largo del año, pues este experimento se realizó entre los meses de agosto y septiembre. A pesar de este descenso de temperatura, los valores se mantuvieron dentro del rango adecuado para el correcto desarrollo de la especie (22 a 32 °C), por lo que no se observó una interferencia con el experimento (Gráfica 6), ni por la concentración de oxígeno, que se mantuvo en los niveles adecuados según lo proporcionado por la ficha técnica de la FAO y SAGARPA para esta especie (Gráfica 7).

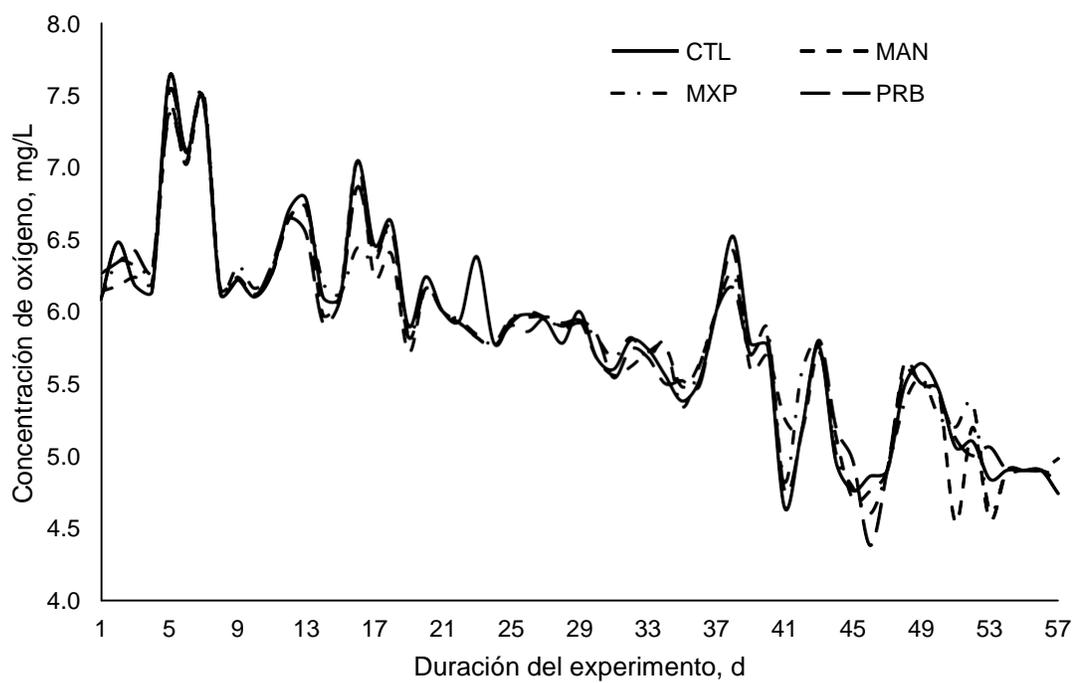
Acerca de los metabolitos de desecho, la monitorización constante de amonio y CO₂ muestra que en ningún momento se presentaron concentraciones mayores a las recomendadas para la Tilapia (FAO, 2010), quedando siempre el amonio por debajo de 1 mg/L y el CO₂ por debajo de los 30 mg/L, (Gráficas 8 y 9). A pesar de estar por debajo del máximo permitido, se presentaron en la semana cuarta y quinta un aumento de la concentración de amonio, lo cual se puede atribuir a la acumulación de desechos en el filtro, situación que fue corregida por limpieza del mismo.

El pH del agua de las peceras mostró variación a lo largo del experimento, mostrando que no existió una diferencia entre los tratamientos, por lo que se puede decir que la inclusión del BMF, el IL y su interacción no modifican el pH del agua del sistema donde se desarrollan los peces fuera de los límites establecidos para esta especie (6.5 a 8.5), y se comportaron de manera igual a la dieta control (Gráfica 10).

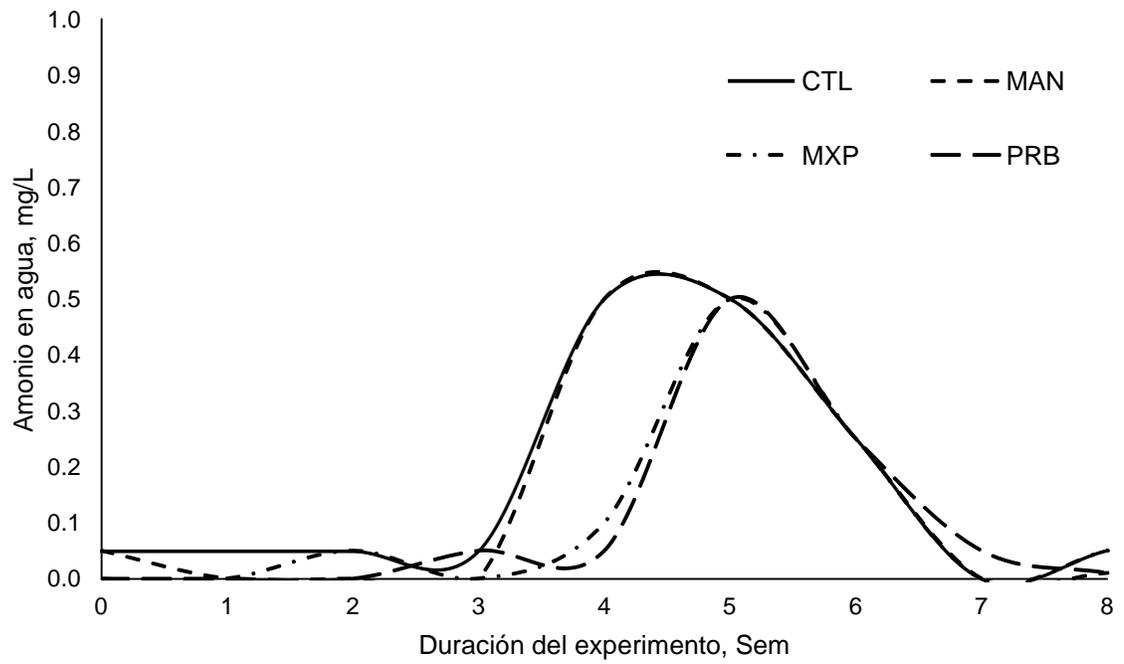
La mortandad en el experimento se mantuvo baja, siendo la mayoría de las muertes por causas de peces que saltaron fuera de la pecera y fueron encontrados h después, descartando la presencia de enfermedades



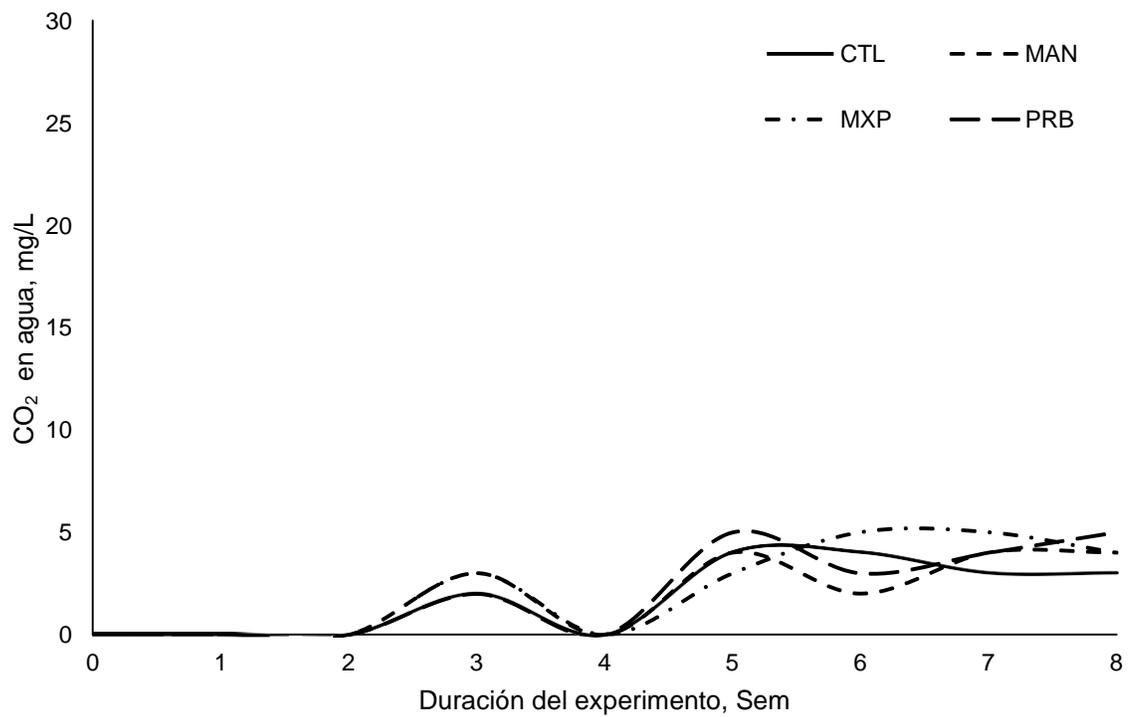
Gráfica 6. Temperatura del agua del sistema de peceras respecto al tiempo del experimento.



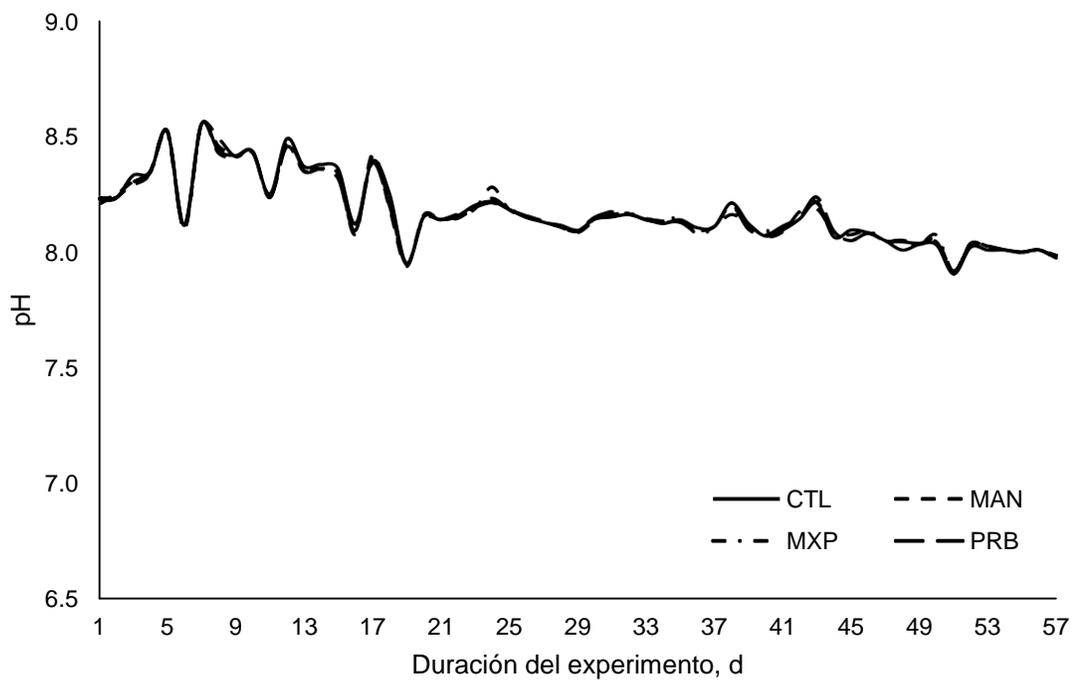
Gráfica 7. Concentración de oxígeno en el agua del sistema de peceras respecto al tiempo del experimento.



Gráfica 8. Concentración de amonio en el agua del sistema de peceras respecto al tiempo del experimento.



Gráfica 9. Concentración de CO₂ en el agua del sistema de peceras respecto al tiempo del experimento.



Gráfica 10. pH del agua del sistema de peceras respecto al tiempo del experimento.



parasitarias o bacterianas a la revisión de los peces muertos. De tal manera que la sobrevivencia se mantuvo entre 92 y 100 % por tratamiento (Cuadro 15). Esta tasa de sobrevivencia es la adecuada para la especie, pues se maneja entre 90 y 100 %, de acuerdo a las fichas técnicas de la FAO y SAGARPA, además, es similar a lo encontrado por otros autores para el crecimiento de la tilapia (Reque *et al.*, 2010).

Respecto a los parámetros de la obtención del filete, se determinó que existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, es decir, existió un efecto producido por la inclusión del BFM y el IL en las dietas (Cuadro 16). La dieta que mejor rendimiento de filete produjo fue la dieta control ($P > 0.05$), con un 52.33 % de filete por peso fresco, le siguió la dieta MAN, que tuvo un rendimiento de filete de 51.15 %, muy cercano al control, mientras que la dieta MXP y la PRB se alejaron considerablemente de las dos primeras, pues tuvieron un rendimiento de filete de 44.51 % y 46.44 % respectivamente. Estos resultados son concordantes con los presentados por Rojas *et al.*, en 2011, donde las mediciones morfométricas concuerdan para peso de canal, longitud y rendimiento de filete (Rojas-runjaic *et al.*, 2011).

Este efecto se puede explicar por la inclusión del BFM, que proporciona antioxidantes al pez, de manera que este disminuye el estrés oxidativo y permite que produzca más masa muscular, gracias a que al haber menor cantidad de radicales libres, estos generan menor daño a los tejidos musculares y favorecen el desarrollo muscular (Dhillon *et al.*, 2013).



Cuadro 15. Supervivencia de los peces por tratamiento durante el experimento completo

Tratamiento¹	Peces Iniciales	Peces al Final	Supervivencia
1.- Control	50	46	92 %
2.- MAN	50	49	98 %
3.- MXP	50	50	100 %
4.- PRB	50	47	94 %

¹ MAN indica tratamiento con BFM al 10 %, PRB tratamiento con IL al 3 % y MXP tratamiento con ambos (10 y 3 % respectivamente).



Cuadro 16. Rendimiento de filete promedio de los peces por tratamiento al sacrificio

Tratamiento ¹	Rendimiento de filete, % ²	D.E.
CTL	52.33 ^a	3.83
MAN	51.15 ^{ab}	3.84
MXP	44.51 ^c	6.06
PRB	46.44 ^{bc}	2.71

¹ MAN indica tratamiento con BFM al 10 %, PRB tratamiento con IL al 3 % y MXP tratamiento con ambos (10 y 3 % respectivamente).

² Diferentes literales entre columna indican diferencia estadística significativa en la comparación de medias de Tukey (P > 0.05)



CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Del presente trabajo se concluye que la acuacultura es una excelente alternativa para la producción de proteína de origen animal de manera accesible y segura, además de ecológica, sin embargo, el principal costo que conlleva el manejo de una piscifactoría se da en el alimento, lo cual obliga al productor a buscar un alimento que presente un balance adecuado entre costo y calidad.

Se concluye también que para desarrollar un alimento para peces que se encuentre en un rango adecuado de costo es necesario utilizar fuentes alternas de proteína, y una alternativa adecuada para suplir proteína de alto costo es la adición de subproductos de manzana fermentados en estado sólido.

Las levaduras contenidas en el inóculo producido en la fermentación fueron incapaces de actuar como probióticos en el pez, no lograron mantenerse en el tracto digestivo del mismo, y no proporcionaron ningún beneficio digestivo, sino que la influencia que tuvieron en el desarrollo piscícola fue estadísticamente negativa, evitando que los peces desarrollen su total potencial, por lo que no se recomienda el uso de la levadura *Kluyveromices lactis* en la dieta de peces Tilapia.

Se llega a la conclusión de que el bagazo de manzana presenta compuestos antioxidantes, pues la manzana es rica en los mismos, y estos servirán para evitar el estrés oxidativo en el pez por los radicales libres de oxígeno, mejorando su rendimiento productivo respecto a la ganancia de peso, crecimiento en longitud, tasa de conversión alimenticia y rendimiento de filete.

Se concluye que la utilización del BFM proporciona compuestos antioxidantes de la familia de los polifenoles en cantidades significativas, que



mejoran los parámetros productivos del pez, obteniendo una mejor ganancia de peso, crecimiento en longitud, tasa de conversión alimenticia y rendimiento de filete, mientras que la inclusión del IL no produce una diferencia positiva respecto al control. Por lo tanto, se puede decir que las levaduras *Kluyveromyces lactis* utilizadas en el inóculo presentan un efecto negativo significativo respecto a los parámetros productivos.

La inclusión del BMF en la dieta de tilapia es entonces una buena manera de atacar la contaminación producida por los subproductos de manzana generados en las industrias procesadoras de la manzana y darles un uso productivo en la acuicultura.



LITERATURA CITADA

- Ajila, C. M., F. Gassara, S. K. Brar, M. Verma, R. D. Tyagi y J. R. Valéro. 2011. Polyphenolic antioxidant mobilization in apple pomace by different methods of solid-State fermentation and evaluation of Its antioxidant activity. *Food Bioprocess Technol.* 5:2697–2707.
- Atwood, H. L., J. R. Tomasso, K. Webb y D. M. Gatlin. 2003. Low-temperature tolerance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: effects of environmental and dietary factors. *Aquac. Res.* 34:241–251.
- Bhalla, T. C. y M. Joshi. 1994. Protein enrichment of apple pomace by co-culture of cellulolytic moulds and yeasts. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 10:116–7.
- Brenes, A., A. Viveros, S. Chamorro y I. Arija. 2016. Use of polyphenol-rich grape by-products in monogastric nutrition. A review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 211:1–17.
- Crivelenti, L. Z. y A. V Mundim. 2011. Valores bioquímicos séricos de tilapia del nilo (*Oreochromis niloticus*) en cultivo intensivo. *Rev. Investig. Vet. Peru* 22:318–323.
- Dhillon, G. S., S. Kaur, S. K. Brar y M. Verma. 2012. Potential of apple pomace as a solid substrate for fungal cellulase and hemicellulase bioproduction through solid-state fermentation. *Ind. Crops Prod.* 38:6–13.
- Dhillon, G. S., S. Kaur y S. K. Brar. 2013. Perspective of apple processing wastes as low-cost substrates for bioproduction of high value products: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 27:789–805.
- Díaz-Plascencia, D. 2011. Desarrollo de un inóculo a base de levaduras y su efecto en la cinética de fermentación in vitro en raciones para vacas Holstein altas productoras. Tesis de Doctorado. Facultad de Zootecnia y Ecología. Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua, Chih. México.
- Fagbenro, O. y K. Jauncey. 1998. Physical and nutritional properties of moist fermented fish silage pellets as a protein supplement for tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Anim. Feed Sci. Technol.* 71:11–18.
- FAO. 2010. *World aquaculture 2010*. 1st ed. (FAO Fisheries and Aquaculture Department, editor.). Rome.
- García, Y. D., B. S. Valles y A. P. Lobo. 2009. Phenolic and antioxidant composition of by-products from the cider industry : Apple pomace. *Food Chem.* 117:731–738.



- Reque, V. R., J. R. E. de Moraes, M. A. de Andrade Belo y F. R. de Moraes. 2010. Inflammation induced by inactivated *Aeromonas hydrophila* in Nile tilapia fed diets supplemented with *Saccharomyces cerevisiae*. *Aquaculture* 300:37–42.
- Ribeiro, C. S., R. G. Moreira, O. a. Cantelmo y E. Esposito. 2014. The use of *Kluyveromyces marxianus* in the diet of red-stirling tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus) exposed to natural climatic variation: Effects on growth performance, fatty acids, and protein deposition. *Aquac. Res.* 45:812–827.
- Rojas-runjaic, B., D. A. Perdomo y D. E. García. 2011. Rendimiento en canal y fileteado de la tilapia (*Oreochromis niloticus*) variedad Chitralada producida en el estado Trujillo , Venezuela. *Zootec. Trop.* 29:113–126.
- SAGARPA y CONAPESCA. 2012. Anuario estadístico de acuicultura y pesca 2011.
- Sahin, K., C. Orhan, H. Yazlak, M. Tuzcu y N. Sahin. 2014. Lycopene improves activation of antioxidant system and Nrf2/HO-1 pathway of muscle in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with different stocking densities. *Aquaculture* 430:133–138.
- SAS Institute, Inc. 2006. SAS/STAT users guide: Statics Version 9 Cary, North Carolina. U.S.A.
- Secretaría de Salud. 1995. Norma oficial mexicana NOM-092-SSA1-1994 Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.