UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

AREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

"EVALUACIÓN DEL EFECTO DE DIFERENTES NIVELES DE SUERO DE LECHE Y EL TIEMPO DE FERMENTACIÓN EN LOS INDICADORES FERMENTATIVOS DE LA PULPA DE CAFÉ PARA USO EN LA ALIMENTACIÓN DE RUMIANTES"

Tesis de grado previa a la obtención del Título de Médica Veterinaria Zootecnista

AUTORA:

Mónica Rosmeri Jiménez Montesdeoca

DIRECTOR:

Dr. Luis Antonio Aguirre Mendoza Mg. Sc.

LOJA-ECUADOR

2015

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

ÁREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

Dr. Luis Antonio Aguirre Mendoza.

DIRECTOR DE TESIS

CERTIFICO:

Que he revisado la presente tesis titulada "**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE DIFERENTES NIVELES DE SUERO DE LECHE Y EL TIEMPO DE FERMENTACIÓN EN LOS INDICADORES FERMENTATIVOS DE LA PULPA DE CAFÉ PARA USO EN LA ALIMENTACIÓN DE RUMIANTES**" realizada por la señorita egresada MÓNICA ROSMERI JIMÉNEZ MONTESDEOCA la misma que cumple con todos los lineamientos establecidos para su respectiva presentación normada por la Universidad Nacional de Loja, por lo cual, autorizo su presentación para los fines legales pertinentes.

Loja, Abril del 2015

Dr. Luis Antonio Aguirre Mendoza

DIRECTOR DE TESIS

"EVALUACIÓN DEL EFECTO DE DIFERENTES NIVELES DE SUERO DE LECHE Y EL TIEMPO DE FERMENTACIÓN EN LOS INDICADORES FERMENTATIVOS DE LA PULPA DE CAFÉ PARA USO EN LA ALIMENTACIÓN DE RUMIANTES"

Tesis presentada al tribunal de grado como requisito previo a la obtención del título de:

MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA.

Dr: Dubal Antonio Jumbo Jimbo, Mg. Sc. .....

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Ing: Nohemi Jumbo Benitez, Mg. Sc. .....

VOCAL DEL TRIBUNAL

Dr: Alfonso Saraguro Martinez, Mg. Sc. .....

VOCAL DEL TRIBUNAL

AUTORÍA

Yo, MÓNICA ROSMERI JIMÉNEZ MONTESDEOCA, declaro ser la autora del presente trabajo de tesis y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos, de posibles reclamos o acciones legales, por el contenido de la misma.

Adicionalmente acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja, la publicación de mi tesis en el Repositorio Institucional – Biblioteca Virtual

Autora: Mónica Rosmeri Jiménez Montesdeoca.

Firma: .....

Cedula: 1104974009

Fecha: Loja, 04 de Agosto del 2015

CARTA DE AUTORIZACIÓN DE TESIS POR PARTE DEL AUTOR PARA LA CONSULTA, REPRODUCCIÓN PARCIAL O TOTAL Y PUBLICACIÓN ELECTRÓNICA DEL TEXTO COMPLETO.

Yo, Mónica Rosmeri Jiménez Montesdeoca, declaro ser autora de la tesis titulada "**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE DIFERENTES NIVELES DE SUERO DE LECHE Y EL TIEMPO DE FERMENTACIÓN EN LOS INDICADORES FERMENTATIVOS DE LA PULPA DE CAFÉ PARA USO EN LA ALIMENTACIÓN DE RUMIANTES**" como requisito para optar al grado de: Médico Veterinario Zootecnista, autorizo al Sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que con fines académicos, muestre al mundo la producción intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera en el Repositorio Digital Institucional (RDI):

Los usuarios puedan consultar el contenido de este trabajo en el RDI, en las redes de información del país y del exterior, con las cuales tenga convenio la Universidad.

La Universidad Nacional de Loja, no se responsabiliza por el plagio o copia de la tesis que realice un tercero.

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja, a los 04 días del mes de agosto de dos mil quince, firma la autora.

Firma:.....

Autora: Mónica Rosmeri Jiménez Montesdeoca

C.I: 1104974009

Dirección: Loja, Celi-Roman

Correo Electrónico: moni18032009@hotmail.com

Celular: 0969731046

DATOS COMPLEMENTARIOS

Director de Tesis: Dr. Luis A. Aguirre Mendoza

Tribunal de Grado: Dr. Dubal Antonio Jumbo Jimbo, Mg. Sc. (PRESIDENTE)

Ing. Nohemi Jumbo Benitez, Mg. Sc. (VOCAL)

Dr. Alfonso Saraguro Martinez, Mg. Sc (VOCAL)

AGRADECIMIENTO

Mi más sincero agradecimiento a Dios, por concederme la vida, a la Universidad Nacional de Loja y a la Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia por acogerme en su seno y propiciar mi profesión profesional, así mismo a los docentes de esta prestigiosa carrera, por darme la oportunidad de formarme como persona y profesional.

A mis padres que son las personas que han luchado incansablemente para que cumpla la meta propuesta, a mi esposo y a mi hija que son mi más grande motor y motivo.

Además mi agradecimiento especial al Dr. Luis Aguirre Mendoza, Mg. Sc, director de tesis, quien supo aportar sus conocimientos y apoyo sincero durante el transcurso del proceso investigativo.

En fin agradezco a todas aquellas personas que estuvieron durante esta larga etapa brindándome su comprensión y apoyo.

DEDICATORIA

El presente trabajo fruto de mi esfuerzo lo dedico a Dios, por darme fuerzas para salir adelante y superar todos los obstáculos. A mis padres Gonzalo y Esperanza por su lucha incansable por sacarme delante de los cuales me siento orgullosa.

A Luis mi esposo, mi amigo incondicional quien siempre está conmigo en buenos y malos momentos en esta larga etapa creyendo en mí y apoyándome hasta la culminación de este trabajo investigativo, a mi hija, Doménica, mi más grande inspiración, mi gran motor y motivo.

A mi hermana Viviana, quien me ha brindado su gran apoyo moral cooperando de esta manera el logro de mis anhelos.

Y a toda mi familia porque todos ustedes merecen este triunfo.

Mónica Rosmeri

ÍNDICE GENERAL

Contenidos **Págs.**

PORTADA i
CERTIFICACIÓN ii
APROBACIÓN. iii
AUTORÍA iv
CARTA DE AUTORIZACIÓN v
AGRADECIMIENTO vi
DEDICATORIA vii
ÍNDICE GENERAL viii
ÍNDICE DE CUADROS xi
ÍNDICE DE FIGURAS xii
TÍTULO xiii
RESUMEN xiv
SUMMARY xv
1. INTRODUCCIÓN 1
2. REVISIÓN DE LITERATURA 3
2.1. CARACTERÍSTICAS Y VALOR NUTRITIVO DE LA PULPA DE CAFÉ 3
2.1.1. Características y Valor Nutritivo 3
2.1.2. Sustancias anti – nutricionales 3
2.2. FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO (FES) 5
2.2.1. Características de las FES 6
2.2.2. Ventajas 7
2.2.3 Desventajas 8
2.2.3.1 Factores que afectan la FES 8
2.2.3.2 Humedad y actividad del agua 8
2.2.3.3 Temperatura 9
2.2.3.4 pH 10
2.2.3.5 Aireación 11
2.2.3.6 Tamaño de partículas 11
2.2.3.7 Tipos de microorganismos empleados en FES 12
2.3. SUERO DE LECHE 13
2.3.1. Proteínas del Suero 13

2.3.1.1. Beta-lactoglobulina 13
2.3.1.2. Alfa-lactoalbúmina 13
2.3.1.3. Glicomacropéptido (GMP) 14
2.3.1.4. Inmunoglobulinas 14
2.3.1.5. Albúmina de suero bovino (ASB) 14
2.3.1.6. Lactoferrina 14
2.3.1.7. Lactoperoxidasa 15
2.3.2. Minerales 15
2.3.3. Vitaminas 15
2.4. TRABAJOS RELACIONADOS 16
3. MATERIALES Y MÉTODOS 18
3.1. MATERIALES 18
3.1.1. Materiales de campo 18
3.1.2. Materiales de laboratorio 18
3.1.3. Materiales de oficina 18
3.2. MÉTODOS 19
3.2.1. Ubicación geográfica. 19
3.2.2. Obtención del material. 19
3.2.3. Unidades experimentales. 19
3.2.4. Diseño experimental. 19
3.2.5. Descripción de los tratamientos. 19
3.2.6. Procedimiento. 20
3.2.7. Variables en Estudio 21
3.2.8. Toma y registro de datos 21
3.2.8.1. Composición química de la pulpa fresca 21
3.2.8.2. pH 21
3.2.8.3. Amoniaco (NH3) 21
3.2.8.4. Composición química de la pulpa biofermentada 21
3.2.8.5. Análisis estadístico 21
4. RESULTADOS 22
4.1. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA PULPA DE CAFÉ FRESCA 22
4.2. pH y AMONIACO 22
4.3. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA PULPA BIOFERMENTADA 25

4.3.1. Materia Seca y Cenizas 25
4.3.2. Proteína Cruda y Verdadera 27
4.3.3. Fibra Cruda 29
5. DISCUSIÓN 31
5.1. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA PULPA FRESCA 31
5.2. pH Y AMONIACO 31
5.3. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA PULPA BIOFERMENTADA 32
5.3.1. Materia Seca y Cenizas 32
5.3.2. Proteína Cruda y Verdadera 33
5.3.3. Fibra Cruda 33
6. CONCLUSIONES 35
7. RECOMENDACIONES 36
8. BIBLIOGRAFÍA 37
9. ANEXOS 41

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadros **Págs.**

Cuadro 1. Conformación de los tratamientos. 20
Cuadro 2. Composición química de la pulpa de café fresca, procedente del cantón Quilanga, tal como ofrecida y en base a materia seca (%). 22
Cuadro 3. Efecto del suero de leche en el pH y NH_3 en la FES de la pulpa de café hasta las 72 horas. 23
Cuadro 4. Efecto del suero de leche en el contenido de MS y cenizas en la FES de la pulpa de café. 26
Cuadro 5. Efecto del suero de leche en el contenido de P.C y P.V en la FES de la pulpa de café. 28
Cuadro 6. Efecto del suero de leche en el contenido de FC en la FES de la pulpa de café hasta las 72 horas. 30

ÍNDICE DE FIGURAS

Figuras **Págs.**

Figura 1. Variación del pH en la FES de la pulpa de café con la inclusión de diferentes niveles de suero de leche y tiempo de fermentación. . 24
Figura 2. Variación en el contenido de amoniaco en los diferentes tiempos de fermentación de la pulpa de café. 24
Figura 3. Variación en el contenido de amoniaco de acuerdo a niveles de inclusión de suero de leche en la fermentación de la pulpa. 25
Figura 4. Contenido de materia seca en la FES de pulpa de café con diferentes niveles de inclusión de suero de leche y diferentes tiempos de fermentación. 27
Figura 5. Variación en el contenido de cenizas en la FES de pulpa de café con diferentes niveles de inclusión de suero de leche hasta las 72 horas. 27
Figura 6. Contenido de proteína cruda de acuerdo a los niveles de suero de leche y tiempo de fermentación de la pulpa de café. 29
Figura 7. Contenido de proteína verdadera en la FES de pulpa de café de acuerdo al tiempo de fermentación y niveles de suero de leche..... 29
Figura 8. Contenido de fibra cruda en la FES de pulpa de café de acuerdo al tiempo de fermentación y niveles de suero de leche. 30

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE DIFERENTES NIVELES DE SUERO DE LECHE Y EL TIEMPO DE FERMENTACIÓN EN LOS INDICADORES FERMENTATIVOS DE LA PULPA DE CAFÉ PARA USO EN LA ALIMENTACIÓN DE RUMIANTES

RESUMEN

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Bromatología del Área Agropecuaria de la Universidad Nacional de Loja, con el propósito de establecer un protocolo para la biofermentación de la pulpa de café que permita mejorar su valor nutritivo y facilitar su uso en la alimentación animal. Se evaluaron cuatro niveles de suero de leche (0, 5, 10 y 15%), en cuatro periodos de tiempo (0, 24, 48 y 72 horas) mediante un diseño completamente aleatorizado con arreglo factorial 4 x 4, resultando 16 tratamientos con tres repeticiones por cada tratamiento, por lo que se utilizaron 48 frascos Erlenmeyer, donde cada uno constituyó una unidad experimental. La fermentación se efectúo en una estufa a 36 ºC., durante los periodos de tiempo establecidos, en todos tratamientos se adicionó 1,5% de urea y 0,5% de sales minerales para completar 100 g. Las variables estudiadas fueron: composición química de la pulpa fresca, indicadores de fermentación (pH y Amoniaco) y la composición química de la pulpa biofermentada. Los resultados demuestran un contenido del 9,12 % de proteína cruda y 16,28 % de fibra cruda para la pulpa fresca procedente del cantón Quilanga; los niveles de pH se mantienen constantes hasta las 72 horas de fermentación; mientras que en el nivel del 15% la tendencia es un poco diferente ya que disminuye a las 24 horas para luego incrementarse a las 48 horas y mantener una estabilidad hasta las 72 horas; el contenido de amoniaco se mantiene constante hasta las 72 horas, se incrementa considerablemente en los niveles del 10 y 15%; la materia seca disminuye a medida que avanza el tiempo de fermentación; los valores de la ceniza tienden a permanecer constantes; la proteína cruda alcanza valores del 30,52% con 15% de suero de leche hasta las 48 horas; mientras que la proteína verdadera llega hasta 9,41% en el nivel de 10% hasta las 24 horas; el contenido de fibra cruda se incrementa a las 72 horas con el nivel 5 y 10%. Se concluye que el proceso de fermentación permite incrementar el contenido de proteína de la pulpa de café, lo que facilita su uso como insumo para la elaboración de raciones suplementarias en la alimentación animal.

SUMMARY

This work was performed at the Laboratory of Food Science within the Agricultural Area of the National University of Loja, in order to establish a protocol for the bio-fermentation of coffee pulp to improve its nutritional value and make it easier to use in animal feed. Four levels of whey (0, 5, 10 and 15%) were assessed over four time periods (0, 24, 48 and 72 hours respectively) using a completely randomized factorial design 4 x 4, resulting in 16 treatments and three repetitions per treatment. 48 Erlenmeyer flasks were used, each constituting an experimental unit. The fermentation was performed in an oven at 36°C, for the time periods set in all treatments and 1.5% urea and 0.5% mineral salts were added to make up the 100g. The variables studied were: chemical composition of the fresh pulp, fermentation indicators (pH and ammonia) and chemical composition of the bio-fermented pulp. The results showed a content of 9.12% crude protein and 16.28% crude fiber for the fresh pulp emanating from the canton of Quilanga; pH levels remained constant during the 72 hours of fermentation; whilst in the 15% treatment, the level was slightly different because it decreased at around 24 hours then increased at 48 hours and finally stabilized at 72 hours. The ammonia content remained constant up to 72 hours, but considerably increased with the treatment levels of 10% and 15% respectively. The dry matter decreased as the fermentation time progressed. The values of ash tended to remain constant; the crude protein reached values of 30.52% with the 15% whey treatment at 48 hours; while the true protein levels reached 9.41% in the treatment of 10% at 24 hours. The crude fiber content increased at 72 hours with the 5% and 10% treatment levels. It was therefore concluded that the fermentation process could increase the protein content of coffee pulp, which in turn facilitated its use as an ingredient in the development of supplementary rations in animal feed.

1. INTRODUCCIÓN

En la provincia de Loja, el proceso de beneficio húmedo del café genera grandes volúmenes de pulpa, que no tiene un uso y destino adecuados; y que pueden estar causando afecciones al medio ambiente. La producción anual de café en la provincia de Loja, es de 180.320 qq, de los cuales el 40%, es decir 108.192 qq se benefician por la vía húmeda, lo que genera una disponibilidad de 48.686 qq, de pulpa al año COFENAC (2009).

La pulpa está formada por el epicarpio y una parte del mesocarpio, presenta una humedad del 85 %, siendo una de las mayores desventajas, ya que dificulta el transporte, manejo, procesamiento y uso directo en la alimentación animal; sin embargo, su composición química favorece su uso como ingrediente en la dieta de los animales (Elías, 1978, citado por Noriega *et al.,* 2008).

Por otro lado las condiciones agroecológicas de la provincia de Loja caracterizada por la existencia de dos estaciones climáticas bien marcadas condicionan el comportamiento productivo de la ganadería bovina y no permite mantener una producción estable de leche y carne durante todo el año. Una de las alternativas para suplir la escasez de los pastos en la época seca puede ser la utilización de residuos agrícolas como: pulpa de café, que se produce en grandes cantidades y no tienen un uso adecuado, constituyendo focos de contaminación.

Se han realizado varios estudios para mejorar el valor nutritivo y disminuir el contenido de sustancias anti nutricionales presentes en la pulpa de café, mediante procesos de fermentación en estado sólido (FES), lo que ha posibilitado su uso como suplemento en la alimentación animal, con buenos resultados en el incremento de peso, gracias a la proteína microbiana que se genera durante este proceso.

La FES es un complejo proceso de transformaciones microbiológicas sobre materiales sólidos, donde el contenido de líquido está al nivel correspondiente de la actividad del agua, para asegurar el crecimiento y metabolismo de los

microrganismos, así como la formación de productos deseables (Rodríguez, 2004).

Con estos antecedentes el presente trabajo de investigación se orientó a generar un protocolo para la fermentación de la pulpa de café, utilizando diferentes niveles de suero de leche, como fuente de carbohidratos de fácil fermentación; urea como fuente de nitrógeno y sales minerales, para propiciar la producción de proteína microbiana de alto valor biológico; y de esta manera disponer de una alternativa biotecnológica que contribuya al mejoramiento del valor nutritivo de la pulpa de café y facilitar su uso en la elaboración de raciones suplementarias para la alimentación de rumiantes.

Para lograr este propósito se plantearon y cumplieron los siguientes objetivos:

- Determinar la composición química de la pulpa fresca,

- Evaluar el efecto de cuatro niveles de suero de leche y cuatro periodos de fermentación en los indicadores fermentativos: pH, amoniaco y

- Realizar el análisis bromatológico de la de la pulpa biofermentada.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. CARACTERÍSTICAS Y VALOR NUTRITIVO DE LA PULPA DE CAFÉ

2.1.1. Características y Valor Nutritivo

La pulpa de café está formada por el epicarpio y una parte del mesocarpio del fruto del cafeto, constituye alrededor del 40% del peso total del fruto en base húmeda; su humedad es del 85% y representa una de las mayores desventajas, ya que dificulta el transporte, manejo, procesamiento y uso directo en la alimentación animal; sin embargo, su composición química favorece su uso como ingrediente en la dieta de los animales (Elías, 1978, citado por Noriega *et al.,* 2008)

Desde el punto de vista nutricional la pulpa de café se presenta como alimento interesante. En el Ecuador Zambrano, (2004), determinó la siguiente composición química: 85,33% de materia seca; 14,3% de proteína cruda; 1,57% de extracto etéreo; 26,43% de fibra cruda; 43,22% de extracto libre de nitrógeno y 14,65% de cenizas; valores que no difieren de manera significativa con los reportados por Bressani (1978) y Ramírez *et al.,* (1999). Sin embargo, se debe considerar que la composición química, puede variar, en función de algunos factores como: clima, características del suelo, época de cosecha, método de procesamiento, etc.

Bressani, (1978) indican que la proteína de la pulpa de café contiene niveles similares o más altos de aminoácidos que otros productos, como harina de algodón, harina de soya, maíz; pero es deficiente en aminoácidos azufrados; el contenido de lisina es tan alto como el de la harina de soya.

2.1.2. Sustancias anti – nutricionales

Existen varias sustancias en la pulpa de café que pueden ser las responsables del efecto adverso para los animales tales como: cafeína, polifenoles y taninos.

Elevadas cantidades de dichas sustancias pueden causar mortalidad en animales menores y también en rumiantes, si son alimentados exclusivamente con la pulpa de café o con raciones altas en ella (Braham y Bressani, 1978).

a. Cafeína

El efecto fisiológico de este alcaloide es un aumento en la actividad motora, que se traduce en mayor gasto energético, que tendría como efecto final el descenso en la ganancia de peso y en la eficiencia de conversión. Tanto la cafeína como el ácido clorogénico actúan de manera conjunta (Ferrer *et al*., 1995 citado por Noriega *et al.,* 2008). También se ha observado incremento de la sed y de la evacuación urinaria, que trae como consecuencia mayor excreción de nitrógeno, Braham y Bressani, (1978). En la literatura existe discrepancia en cuanto a los valores de cafeína presentes en la pulpa de café. Ferrer *et al*. (1995) citado por Noriega *et al.,* (2008) señalan valores de 0,85% de cafeína en pulpa fresca; mientras que Ferreira *et al*. (2001) señalan valores de 11,7% en la pulpa de café ensilada.

b. Polifenoles libres

Los polifenoles libres pueden interferir con la utilización de proteínas, ligándola y formando complejos no aprovechables, pero también pueden combinarse con las enzimas digestivas y afectar su catabolismo. La unión de las proteínas con estos productos tiene un efecto sobre la digestibilidad de las proteínas y por lo tanto en la absorción de este nutriente para satisfacer las necesidades fisiológicas (Braham y Bressani, 1978, Ferrer *et al*., 1995 citado por Noriega 2009). La cantidad de fenoles libres en la pulpa se encuentra alrededor del 2,6% (Braham y Bressani, (1978). En la literatura no se dispone de información precisa de los niveles de polifenoles libres que causan toxicidad en los animales.

La información sobre los polifenoles de la pulpa de café es aún escasa, algunas veces contradictoria y a menudo difícil de interpretar, debido al uso de métodos analíticos inespecíficos. Algunos progresos se han hecho en cuanto a

la caracterización y cuantificación de estos compuestos, pero aún queda mucho por hacerse. (Ramírez, 1999).

c. Taninos

Una de las características más importantes de los taninos es probablemente su capacidad de ligar proteínas, evitando el aprovechamiento de éstas por el organismo, también pueden actuar como inhibidores enzimáticos. Los niveles de taninos en la pulpa de café varían entre 1,8 y 8,56%; sin embargo, Gómez *et al*. (1985) y Ferreira *et al*. 2000 citado por Noriega 2009) señalan que los niveles de taninos disminuyen cuando la pulpa es ensilada. Los rumiantes en crecimiento, pueden tolerar un consumo máximo de taninos de 28 g/100 kg de peso por día sin manifestar síntomas (Vargas *et al*., 1977, citado por Noriega *et al*. 2009).

2.2. FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO (FES)

La fermentación es una de las biotecnologías aplicadas, más antiguas, de conservación de la energía. Las civilizaciones Sumeria y Babilónica (6000 años A.C.) ya conocían, de modo empírico, cómo elaborar cerveza y hacia el 4000 A.C. los egipcios sabían fabricar pan a partir del trigo (FAO 1998, citado por Rodríguez, 2004).

Los procesos fermentativos se pueden dividir en fermentación líquida sumergida (FLS) y fermentación en estado sólido (FES); la diferencia mayor entre estos dos procesos biológicos, es la cantidad de líquido libre en el sustrato. En la FLS la cantidad de sustancia sólida pocas veces llega a ser mayor de 50 g/l y en la FES el contenido de sólido varía entre 20 y 70% del peso total (Mitchell *et al*. 2002, citado por Rodríguez, 2004).

La FES es un complejo proceso de transformaciones microbiológicas sobre materiales sólidos, donde el contenido de líquido en el sistema está al nivel correspondiente de la actividad del agua, para asegurar el crecimiento y el metabolismo de los microrganismos así como la formación de productos

deseables, pero sin exceder la capacidad máxima de retención de agua de la sustancia sólida Harts y col., (1992) y Durand y col., (1993), (citado por Rodríguez, 2004)

2.2.1. Características de las FES

Según Kokinan y Tanner (1990), Harts y col., (1992) y Valiño (1999) citado por Rodríguez (2004), dentro de las características más importantes de las FES se encuentran:

- Puede involucrar cultivos mixtos, microbiota indígena y la del sustrato, o ambas.
- Provee de un ambiente selectivo para un gran número de hongos filamentosos, bacterias y actinomicetos.
- Las enzimas hidrolíticas para la degradación de compuestos de alto peso molecular que son extracelulares, podrán estar libres o adheridas a la superficie de la matriz
- Proveen de mezcla de fuentes de energía y carbono y una diversidad de fuentes complejas de nutrientes.
- El crecimiento microbiano y la formación del producto ocurren cerca o en la superficie de la fase líquida, la cual está en la interface sólido – gas.
- Crecimiento apical del micelio podría permitir que se produzca simultáneamente metabolismos secundario y primario en diferentes partes del micelio.
- Los hongos comúnmente empleados son aerobios estrictos.
- Los sustratos comúnmente empleados incluyen granos de cereales, legumbres y residuos lignocelulósicos, entre otros.
- El sustrato sólido debe estar en una forma que permita la libre circulación de aire.
- El nivel de humedad del sustrato sólido, así como las demás variables a tener en cuenta en el proceso, se debe determinar para cada especie y, probablemente, para cada cepa, en dependencia del proceso productivo en cuestión.

- El nivel de líquido del sustrato para la fermentación no debe sobrepasar su nivel de retención, se toma como límite superior un 80% de humedad.
- La presencia de compuestos de carbono de altos y bajos pesos moleculares hace complejo los procesos de inducción, represión e inhibición de las enzimas.
- La humedad ligada y libre de forma externa o interna, respecto a la superficie sólida, existe en una proporción determinada por la isoterma característica del sustrato.
- La interface líquido – gas es el límite para el intercambio de oxígeno – dióxido de carbono y para la transferencia de energía cuando la relación entre la superficie del líquido y el volumen es alta.
- La densidad de biomasa de la fase líquida puede ser elevada y esto da como resultado una demanda de oxígeno y una producción de dióxido de carbono muy alta, combinado con un incremento de la temperatura.

2.2.2. Ventajas

Muchos trabajos reconocen las ventajas que tienen la FES en relación a las fermentaciones sumergidas. En este sentido, Durand *et al*. (1997) plantean que en estos procesos no se requiere necesariamente de un medio de cultivo, pues los microorganismos crecen en sustratos sólidos. Consideran además que son tecnologías limpias, pues los bajos niveles de humedad reducen los problemas de contaminación. Por otra parte, agregan que las condiciones de crecimiento de los microorganismos son similares a su hábitat natural y que debido a la alta concentración de producto que se obtiene, este se puede secar e incorporar directamente a la alimentación animal.

Singhania *et al.,* (2009) hacen referencia a las siguientes ventajas:

- Este tipo de fermentaciones presentan una baja demanda de agua, lo que trae consigo una disminución de los residuales líquidos del proceso.
- Se obtiene una alta concentración de los productos finales y una mayor estabilidad.
- Existe una menor represión catabólica.

- No se requiere de altas condiciones de esterilización, debido a la baja actividad de agua utilizada en estos procesos.
- La aireación se facilita a través de los espacios entre las partículas de la fibra y la mezcla de partículas.
- Tienen mayor productividad volumétrica, debido a una alta concentración de sustrato por unidad de volumen.

2.2.3 Desventajas

A pesar de las grandes ventajas que tienen estos procesos, se presentan algunas desventajas que han desalentado el uso de esta técnica para la producción industrial. Hölker *et al*. (2004) plantean que los principales obstáculos se encuentran en llevar los resultados del laboratorio a una escala mayor, debido a la acumulación de altos gradientes de temperatura. Explican que otra de las dificultades que se presentan es el control del resto de las variables de importancia en el proceso, por lo que este aspecto tiene vital importancia en el estudio de las FES. Además se señala:

2.2.3.1 Factores que afectan la FES

Entre los diferentes factores que afectan las FES se encuentran: la humedad y actividad del agua, la temperatura, el pH, la aireación y el tamaño de partículas. Estos parámetros son indicadores muy importantes en estos procesos, por lo que se controlan según los objetivos y el microorganismo empleado (Mitchell *et al*., 2002 citado por Rodríguez 2004).

2.2.3.2 Humedad y actividad del agua

La humedad es la fracción o porcentaje del peso del sustrato que le corresponde al agua. En los procesos de fermentación el agua permite la disolución de los nutrientes hidrosolubles así como facilita su acceso a las células. Permite además mantener homogénea las condiciones del cultivo y disolver los productos del metabolismo cuando son excretados al medio, facilitando de esta forma su extracción y purificación (Gutiérrez, 1995).

Uno de los efectos indirectos más importantes de este factor en la FES es la alteración de las características del sustrato. Cuando el nivel de humedad es muy alto ocurre una aglomeración de las partículas, lo cual dificulta el proceso de intercambio gaseoso interpartícula. Puede además sustraer los nutrientes solubles y aumentar el riesgo de contaminación bacteriana. Por otra parte, una alta concentración de agua pudiera aumentar el volumen del sustrato, lo cual incrementa la porosidad y esto favorece la acción y difusión de las enzimas. Mientras que los bajos niveles de humedad disminuyen la actividad de las enzimas e inhiben el crecimiento, porque los metabolitos alcanzan concentraciones inhibitorias rápidamente y se impide la accesibilidad de los nutrientes a la célula, lo cual se refleja en el rendimiento de biomasa (Mitchell *et al*., 2002 citado por Rodríguez 2004).

El por ciento de humedad en la FES puede variar entre 30 y 80% en dependencia del sólido que se utilice, el microorganismo y el objetivo del proceso (formación de producto u obtención de biomasa). La disponibilidad de agua en estas fermentaciones se puede expresar tanto en contenido de humedad como en actividad del agua (a_w) del sustrato sólido, esta última es la que afecta directamente el crecimiento microbiano. Este parámetro se utiliza para caracterizar cuantitativamente las interacciones físicas y químicas del agua en el sistema y se define como la humedad relativa de la atmósfera gaseosa en equilibrio con el sustrato. De manera que la actividad del agua es igual a la relación entre la presión parcial del vapor (p_w) en el estado de equilibrio con el agua absorbida en el sólido y la presión de vapor del agua pura (p_w^0) a esa misma temperatura (Gutiérrez 1995).

2.2.3.3 Temperatura

La temperatura es uno de los factores más importantes en los procesos de FES, donde el valor más conveniente para el desarrollo de un microorganismo se denomina temperatura óptima. También existe un valor máximo y uno mínimo en los que puede existir crecimiento microbiano. En estudios realizados con cultivos puros se encontró que para cada tipo de microorganismo existe una de temperatura óptima, sin embargo, en los cultivos mixtos es mucho más difícil encontrarla y mantenerla.

El control de esta variable, en una fermentación sólida, se considera el aspecto más crítico debido a la alta concentración de sustrato por unidad de volumen y a la baja conductividad térmica del sistema heterogéneo sólido-líquido-gas, lo que provoca la acumulación del calor metabólico en el sistema y el aumento de la temperatura del cultivo. De acuerdo a lo planteado por Gutiérrez (1995), los valores elevados de temperatura favorecen cuatro aspectos negativos:

- La actividad microbiana se desacelera o se detiene.
- Se deshidrata el medio sólido.
- El metabolismo se desvía como un mecanismo de defensa ante el calor o ante la deshidratación.
- Aumentan las necesidades de nutrientes en el sustrato.

El crecimiento microbiano en FES genera importantes cantidades de calor metabólico. La disipación de este en la superficie tiende a ser insuficiente, lo que conlleva al establecimiento de grandes gradientes de temperatura y al sobrecalentamiento del sustrato. La temperatura puede llegar a valores que a menudo limitan gravemente el crecimiento o incluso llegan a ocasionar la muerte del microorganismo, es por ello que el calor generado debe disminuirse a niveles adecuados, para lo cual se han diseñado biorreactores con aireación forzada capaz de extraerlo.

2.2.3.4 pH

El crecimiento microbiano puede causar cambios en el pH de un sustrato. La producción de ácido debido a la oxidación incompleta del sólido o la absorción de iones de amonio provocarán su disminución, mientras que la liberación de amoníaco por desaminación provoca el efecto contrario. El pH puede alcanzar valores que inhiben el crecimiento del microorganismo (Mitchell *et al*., 2002).

Según Rodríguez (2004), un valor desfavorable de este influye generalmente en dos aspectos: el funcionamiento de las enzimas, las cuales pueden alterar su actividad, y en el transporte de nutrientes al interior de la célula, lo que hace que sean más sensibles a una gran variedad de agentes tóxicos. En los

procesos de FES el pH es muy difícil de controlar y, por tanto, es conveniente utilizar los microorganismos que crezcan en un amplio intervalo.

2.2.3.5 Aireación

La aireación en las FES se utiliza para suministrar el oxígeno necesario, para extraer el dióxido de carbono formado y el calor metabólico generado. De esta forma, el flujo óptimo de aire debe tomar en consideración la naturaleza del microorganismo utilizado, los requerimientos de oxígeno para el crecimiento y la formación del producto deseado, la velocidad de generación de calor metabólico y el espesor de la masa de sólido. Este factor juega un papel fundamental, puesto que la mayoría de los microorganismos que participan en el proceso son aerobios. La aireación en las FES es más fácil que en las fermentaciones sumergidas, porque la superficie de contacto es mayor entre el aire y el líquido que está absorbido en las partículas de sustrato.

Gutiérrez (1995) comentó que la aireación es posible facilitarla en este tipo de fermentaciones a través de los espacios que se forman entre las partículas del sólido y la mezcla y apuntó su sensibilidad ante el proceso de agitación, por lo que voltear el sustrato periódicamente resulta más ventajoso que someterlos a un proceso de agitación continua.

2.2.3.6 Tamaño de partículas

El tamaño de partículas es otro de los factores importantes en la FES y está estrechamente relacionado con la transferencia de masa y la distribución de oxígeno en el proceso, así como con el secado y la altura de la cama de sólido. El análisis en la transferencia de masa se divide en dos aspectos principales: intrapartícula e interpartícula. En el primer caso influye más el tamaño y la forma del poro de la partícula; así como la porosidad; mientras que el segundo caso es el más importante y se afecta por el tamaño de la partícula, su forma y también por la humedad. Otro aspecto que influye en la transferencia de masa durante el proceso, es el cambio de estructura de las partículas de sustrato por la acción de los microorganismos.

De forma general, a medida que el tamaño de partícula es más pequeño, el grosor de la cama es menor y se favorece de esta forma la aireación en el sistema, lo que conlleva a una buena oxigenación durante la fermentación. Es importante señalar también que con tamaños de partículas muy pequeños se puede producir la compactación del sustrato y con ello la inhibición del crecimiento de los microorganismos aerobios, mientras que tamaños de partículas muy grandes disminuyen la superficie de contacto y de esta forma se dificulta la transferencia de masa.

2.2.3.7 Tipos de microorganismos empleados en FES

La baja actividad del agua que poseen los sustratos empleados en estos procesos limitan las especies microbianas que se utilizan.

a. Levaduras y bacterias

Las levaduras crecen en sustratos sólidos sólo en cantidades minoritarias de la microbiota; sin embargo, una mezcla Endomycpsis buligera y Schwanniomyces castelli se ha utilizado durante el enriquecimiento proteico de varios sustratos amiláceos. En procesos semisólidos para la obtención de etanol se han empleado cultivos puros de Saccharomyces cerevisiae.

Bacterias como Bacillus subtilis juegan un papel importante en la producción de alimentos; también se destaca el uso de Lactobacillus plantarum y Propionibacterium shermanii en la fermentación y preservación de granos con alta humedad en procesos similares al ensilaje.

b. Hongos filamentosos

Los hongos filamentosos son el grupo de microorganismos más importante para las FES y esto se debe a:

- Su hábitat natural son los sustratos sólidos
- Producen altos rendimientos de enzimas en ese medio
- Su capacidad fisiológica para vivir en sistemas con baja disponibilidad de agua, pH bajos.

- El modo hifal de su crecimiento
- Están bien adaptados a difundirse sobre y penetrar en el sustrato sólido.
- La mayoría producen esporas y los inóculos de esporas son fáciles de preparar y se pueden almacenar por largos períodos de tiempo.

Entre las especies de hongos más usadas están: Aspergillus, Rhizopus, Chaetomium, Trichoderma y los hongos de podredumbre blanca (Rodríguez 2004)

2.3. SUERO DE LECHE

El suero es un subproducto obtenido en el proceso de fabricación del queso de leche de vaca; contiene proteínas de alto valor biológico, es rico en sales minerales, vitaminas y aporta todos los aminoácidos necesarios para el organismo y además aminoácidos ramificados que favorece la síntesis proteica, ganancia de masa muscular.

2.3.1. Proteínas del Suero

2.3.1.1. Beta-lactoglobulina

Es la proteína más abundante del suero, representa aproximadamente del 50 a 55% de las proteínas del suero. La beta-lactoglobulina es una excelente fuente de aminoácidos de cadena ramificada (BCAA) y aminoácidos esenciales. Los BCAA ayudan a prevenir la degradación del glucógeno muscular y además repone el glucógeno durante el ejercicio. Además estimula la fijación de vitaminas liposolubles aumentando su biodisponibilidad.

2.3.1.2. Alfa-lactoalbúmina

Es la segunda proteína más abundante encontrada en el suero de la leche, constituyendo aproximadamente 20 a 25% de la proteína de suero. La Alfa-lactoalbúmina tiene un alto contenido de triptófano, aminoácido esencial, con beneficios potenciales para la producción de serotonina, la regulación del

sueño y mejora el estado de ánimo bajo estrés. La alfa-lactoalbúmina también es la principal proteína presente en la leche humana. Provee todos los aminoácidos esenciales y aminoácidos de cadena ramificada (BCAA) y posee una actividad potencial contra el cáncer.

2.3.1.3. Glicomacropéptido (GMP)

El Glicomacropétido es un derivado del proceso de fabricación del queso, y constituye un 0 a 15% de la proteína de suero, dependiendo del proceso de concentración y aislado de la proteína de suero. Estimula al organismo a producir colecistoquinina, la hormona liberada tras la ingestión de alimentos y que es responsable de la sensación de saciedad. Posee un efecto en la motilidad gastrointestinal y un efecto estimulador de bifidobacterias.

2.3.1.4. Inmunoglobulinas

Las inmunoglobulinas son proteínas producidas por el sistema inmunológico para luchar contra ciertos antígenos. Las inmunoglobulinas constituyen aproximadamente el 10 a 15% de la proteína de suero. Como resultado de esto, las inmunoglobulinas son a veces conocidas como anticuerpos. Cuando el organismo tiene un nivel bajo de inmunoglobulinas puede tener un riesgo de mayor infección.

2.3.1.5. Albúmina de suero bovino (ASB)

La albúmina del suero es una proteína de gran tamaño con un buen perfil de aminoácidos esenciales. La ASB representa aproximadamente 5 – 10% de la proteína de suero.

2.3.1.6. Lactoferrina

La Lactoferrina es una glicoproteína y constituye aproximadamente 1 a 2% de los componentes de proteína de suero. La lactoferrina inhibe el crecimiento de bacterias y hongos, debido a su capacidad para unirse hierro.

2.3.1.7. Lactoperoxidasa

La Lactoperoxidasa es una glicoproteína y constituye aproximadamente el 0,5% de la proteína de suero. La lactoperoxidasa es un agente antibacteriano natural. La lisozima es una enzima presente de forma natural en la leche y constituye menos del 0,1% de la proteína de suero. La lisozima tiene propiedades para aumentar la inmunidad.

2.3.2. Minerales

El suero de leche tiene un gran perfil de minerales donde podemos encontrar grandes cantidades de potasio, en una proporción de 3 a 1 respecto al sodio, lo que ayuda a desechar líquidos y toxinas. Posee además una cantidad importante de calcio (en una proporción de un 50% más que en la leche), También contiene fósforo, magnesio, zinc, hierro y cobre, formando todos ellos sales de gran biodisponibilidad para el buen funcionamiento del organismo. El calcio es un elemento principal de los huesos. Es imprescindible para llevar a cabo muchas funciones del cuerpo, como la coagulación de la sangre, el funcionamiento de los nervios y músculos. El magnesio interviene en la correcta asimilación del calcio y además participa en el correcto funcionamiento del músculo cardíaco. El fósforo mejora la capacidad de concentración, la memoria y puede fortalecer el sistema nervioso. El zinc, el hierro y el cobre actúan de forma sinérgica como potentes antioxidantes, protegiendo las membranas celulares, mejorando el sistema inmunitario y favoreciendo el proceso digestivo.

2.3.3. Vitaminas

El suero de leche contiene cantidades apreciables de las vitaminas A, C, D, E y del complejo B, así como ácido orótico, que es imprescindible para la absorción de minerales como el calcio, fósforo, etc., y ácido láctico que puede mejorar el proceso de respiración celular. La vitamina A es muy importante en los procesos inmunitarios, mantiene el funcionamiento y crecimiento celular,

mantiene la integridad de la piel, mucosas y epitelios además ayuda en la función de la vista. La vitamina D tiene una función importante en la absorción de calcio y fósforo y es imprescindible para mantener para los huesos y dientes sanos. La vitamina E posee un papel esencial en la prevención de daños a las estructuras tales como las membranas celulares. La vitamina C es un gran antioxidante que refuerza el sistema inmunitario, es esencial para la estructura correcta y el mantenimiento de los vasos sanguíneos, cartílagos, músculos y huesos. El suero de leche contiene además cantidades significativas de muchas de las vitaminas del complejo B, y es especialmente rica en vitamina B12. La vitamina B 12 es muy importante para mantener la salud de los nervios y las células rojas de la sangre, tiene un papel importante en la producción de energía y en la división de las células.

2.4. TRABAJOS RELACIONADOS

Morgan (2003), al someter la pulpa de café a fermentación en estados solido con 10% de miel final y 0,5% de urea, se logra transformar este contaminante en un producto, al que se le denominó Pulpa de Café Enriquecida, con características bromatológicas que permiten su empleo como alimento animal.

El mayor incremento en biomasa proteica de la pulpa de café enriquecida se alcanzó a las 48 horas de fermentación con 5,23 unidades porcentuales PV, la cual es algo más de las dos terceras partes de la proteína total que compone el alimento.

La pulpa de café enriquecida, elaborada tanto de forma rústica como de forma industrial, posee características bromatológicas que permiten el empleo de ambas en el pienso Sabaneta sin causar alteraciones perceptibles. Los valores obtenidos se encuentran en el rango de las fermentaciones efectuadas en el laboratorio.

Lozano (2015), con el propósito de establecer un protocolo para la biofermentaciòn de la pulpa de café que permita mejorar su valor nutritivo y facilitar su uso en la alimentación animal. Se evaluaron cuatro niveles de jugo de caña (0, 5, 10 y 15%), en cuatro periodos de tiempo (0, 24, 48 y 72 horas)

mediante un diseño completamente aleatorizado con arreglo factorial 4 x 4, resultando 16 tratamientos con tres repeticiones por cada tratamiento, por lo que se utilizaron 48 frascos Erlenmeyer, donde cada uno constituyó una unidad experimental. La fermentación se efectúo en una estufa a 36 ºC, durante los periodos de tiempo establecidos, en todos tratamientos se adicionó 1,5% de urea y 0,5% de sales minerales para completar 100 g. Las variables estudiadas fueron: composición química de la pulpa fresca, indicadores de fermentación (pH y Amoniaco) y la composición química de la pulpa biofermentada. Los resultados demuestran un contenido del 9,12 % de proteína cruda y 16,28 % de fibra cruda para la pulpa fresca procedente del cantón Quilanga; los niveles de pH se incrementan hasta las 24 horas, luego disminuyen a las 48 horas y se mantienen estables hasta las 72 horas; el contenido de amoniaco se mantiene constante hasta las 48 horas, luego se incrementa a las 72 horas; la materia seca disminuye a medida que avanza el tiempo de fermentación; la proteína cruda alcanza valores del 30,63% con 5% de jugo de caña hasta las 48 horas; mientras que la proteína verdadera llega hasta 12,9 en el nivel de 5% hasta las 72 horas; el contenido de fibra cruda se incrementa hasta las 48 horas y luego disminuye a las 72 horas. Se concluye que el proceso de fermentación permite incrementar el contenido de proteína de la pulpa de café, lo que facilita su uso como insumo para la elaboración de raciones suplementarias en la alimentación animal.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

3.1.1. Materiales de campo

- Recipiente para toma de muestras
- Cámara fotográfica
- Registros
- Pulpa de café

3.1.2. Materiales de laboratorio

- Espectrofotómetro
- Cromatografo
- Estufa
- Equipo para análisis químico proximal.
- Peachimetro.
- Urea.
- Sales minerales.
- Reactivos
- Suero de leche.
- Frascos de color ámbar
- Matraces

3.1.3. Materiales de oficina.

- Computadora.
- Papel.
- Esferos.
- Cartuchos de tinta.
- Impresora.

.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Ubicación geográfica.

La presente investigación se la realizo en el laboratorio de Bromatología de la Universidad Nacional de Loja, ubicado en el sector La Argelia a una altitud 2150 msnm, temperatura promedio de 16ºC, precipitación anual de 730 mm, humedad relativa del 75 %, correspondiéndole la formación ecológica bosque seco montano bajo (bs-MB).

3.2.2. Obtención del material.

El material (pulpa fresca) se la obtuvo mediante un muestreo estratificado, es decir de la parte superior, media e inferior de la pila, luego se mezcló para obtener una muestra homogénea.

3.2.3. Unidades experimentales.

Se trabajó con 48 unidades experimentales, cada frasco Erlenmeyer constituyo una unidad experimental.

3.2.4. Diseño experimental.

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado, con arreglo factorial 4 x 4 (niveles de suero de leche x tiempo de fermentación) con 16 tratamientos y tres repeticiones por cada tratamiento.

3.2.5. Descripción de los tratamientos.

Se evaluó dos factores: niveles de suero de leche (0, 5, 10 y 15%) y tiempo de fermentación (0, 24, 48 y 72 horas) de manera que resultaron 16 tratamientos conformados de la siguiente manera:

Cuadro 1. Conformación de los tratamientos.

FACTOR 1 (Suero de leche)	FACTOR 2 (Tiempo de fermentación)	TRATAMIENTOS	Repeticiones
0% de suero de leche	0 horas	T_1 0% de suero de leche a 0 horas	3
	24 horas	T_2 0% de suero de leche a 24 horas	3
	48 horas	T_3 0% de suero de leche a 48 horas	3
	72 horas	T_4 0% de suero de leche a 72 horas	3
5% de suero de leche	0 horas	T_5 5% de suero de leche a 0 horas	3
	24 horas	T_6 5% de suero de leche a 24 horas	3
	48 horas	T_7 5% de suero de leche a 48 horas	3
	72 horas	T_8 5% de suero de leche a 72 horas	3
10% de suero de leche	0 horas	T_9 10% de suero de leche a 0 horas	3
	24 horas	T_{10} 10% suero de leche a 24 horas	3
	48 horas	T_{11} 10% suero de leche a 48 horas	3
	72 horas	T_{12} 10% suero de leche 72 horas	3
15% de suero de leche	0 horas	T_{13} 15% suero de leche a 24 horas	3
	24 horas	T_{14} 15% suero de leche a 48 horas	3
	48 horas	T_{15} 15% suero de leche a 72 horas	3
	72 horas	T_{16} 15% suero de leche a 24 horas	3
TOTAL			**48**

Elaboración: La Autora

3.2.6. Procedimiento.

En función de los tratamientos definidos, se procedió a pesar la pulpa de café y el suero de leche; a todos los tratamientos se adiciono 0,5 % (0,5 g) de sales minerales y 1,5% (1,5 g) de urea, para completar 100 g. Se mezcló y colocó en los frascos Erlenmeyer, que fueron incubados a una temperatura de 26 ºC durante los periodos de tiempo establecidos.

Transcurrido el tiempo de fermentación correspondiente, se procedió a extraer de la estufa los frascos Erlenmeyer de cada tratamiento; de pulpa biofermentada a las que se adicionaron 45 ml de agua destilada para agitarlas a 150 rpm durante 30 minutos. Luego se procedió a filtrar con gasa en vasos de precipitación; en el líquido sobrenadante se midió el pH inmediatamente; mientras que para el amoniaco se preservaron las muestras en refrigeración con 5 ml ácido clorhídrico (0,1 N) y dos gotas ácido ortofosfórico respectivamente.

El resto de material de los frascos Erlenmeyer se utilizó para análisis bromatológico.

3.2.7. Variables en Estudio

- Composición química de la pulpa fresca
- pH,
- Amoniaco (NH_3),
- Composición química de la pulpa biofermentada.

3.2.8. Toma y registro de datos

3.2.8.1. Composición química de la pulpa fresca

Se realizó el análisis bromatológico de la pulpa fresca para determinar el contenido de materia seca, cenizas, fibra cruda y proteína cruda, extracto etéreo y extracto libre de nitrógeno, siguiendo la metodología de la AOAC (1995).

3.2.8.2. pH

Se determinó en el líquido sobrenadante con la ayuda de un peachimetro digital.

3.2.8.3. Amoniaco (NH3)

Se determinó mediante espectrofotometría ultravioleta con una longitud de onda de 650 nm, en las muestras de líquido sobrenadante preservadas en refrigeración, siguiendo el procedimiento descrito en el protocolo respectivo.

3.2.8.4. Composición química de la pulpa biofermentada

En el resto del material (pulpa biofermentada) se realizó el análisis bromatológico con las siguientes determinaciones: materia seca, cenizas, fibra cruda y proteína cruda según el método de la AOAC (1995). La proteína verdadera se determinó mediante la técnica de Bernstein.

3.2.8.5. Análisis estadístico

Los resultados de cada una de las variables, debidamente procesados fueron sometidos al análisis de varianza y prueba de rango múltiple de Duncan (1959), con la ayuda del programa estadístico Info Stat versión 2012, (Anexo 1).

4. RESULTADOS

4.1. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA PULPA DE CAFÉ FRESCA

La composición química de la pulpa de café fresca procedente de la planta despulpadora ubicada en la cabecera cantonal de Quilanga se detalla en el siguiente cuadro.

Cuadro 2. Composición química de la pulpa de café fresca, procedente del cantón Quilanga, tal como ofrecida y en base a materia seca (%).

Tipo de muestra	Base de cálculo	M.S.	Cz	E.E.	P.C.	F.C.	E.L.N.
Pulpa de café fresca	TCO	26.53	3.16	0.61	2.42	4.32	16.02
	BS	100,0	11.91	2.30	9.12	16.28	60.39

Fuente: Laboratorio de Nutrición Animal AARNR – UNL (2014)

Cz: Cenizas, E.E: Extracto Etéreo, P.C: Proteína Cruda, F.C: Fibra Cruda, E.L.N: Extracto Libre de Nitrógeno, M.S: Materia Seca

El contenido de materia seca de la pulpa de café fresca fue de 26,53 %. En base seca se determinó un contenido de cenizas del 11,91%; el extracto etéreo presentó un porcentaje del 2,3 %; la proteína cruda estuvo por el orden del 9,12 %; la fibra cruda alcanzó 16,28% y el extracto libre de nitrógeno presentó un contenido del 60,39 %.

4.2. pH y AMONIACO

En el líquido sobrenadante, producto de la dilución mediante agitación y filtrado de la pulpa de café biofermentada, en cada tratamiento, se determinó los valores de pH y amoniaco, como indicadores del proceso de fermentación. Los resultados se detallan en el siguiente cuadro y figuras.

Cuadro 3. Efecto del suero de leche en el pH y NH_3 en la FES de la pulpa de café hasta las 72 horas.

Indicadores	Suero de leche (%)	Tiempo de fermentación (horas)				EE(±) y Signif.
		0	24	48	72	
pH	0	4,54[def]	4,60[f]	4,57[ef]	4,59[f]	0,03 P=0,0050
	5	4,45[cd]	4,45[c]	4,46[cd]	4,49[cde]	
	10	4,22[b]	4,16[b]	4,14[ab]	4,06[a]	
	15	5,23[i]	5,05[g]	5,16[hi]	5,11[gh]	
NH_3 (Meq/l)	Tiempo de fermentación (horas)					
	0	24	48	72		1,45 P=0,3865
	46,77[a]	45,07[a]	43,98[a]	47,13[a]		
	Niveles de suero de leche					
	0	5	10	15		1,45 P<0,0001
	41,84[a]	39,11[a]	47,34 [b]	54,66[c]		

En los niveles 0, 5 y 10% de inclusión de suero de leche, los valores de pH se mantienen constantes hasta las 72 horas de fermentación; mientras que en el nivel del 15% la tendencia es un poco diferente ya que disminuye a las 24 horas para luego incrementarse a las 48 horas y mantener una estabilidad hasta las 72 horas.

El análisis estadístico del contenido de amoniaco no muestra interacción entre los factores en estudio; de acuerdo al tiempo de fermentación se mantienen los valores constantes hasta las 72 horas; mientras que de acuerdo a los niveles de suero de leche el comportamiento es diferente, ya que se mantiene estable en los niveles 0 y 5% y luego se incrementa considerablemente en los niveles del 10 y 15%.

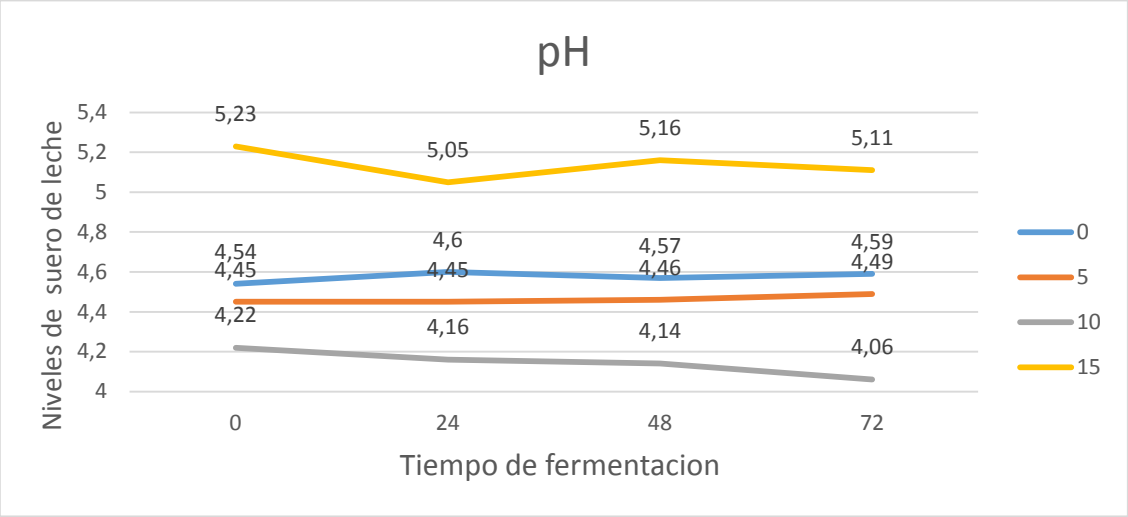

Figura 1. Variación del pH en la FES de la pulpa de café con la inclusión de diferentes niveles de suero de leche y tiempo de fermentación.

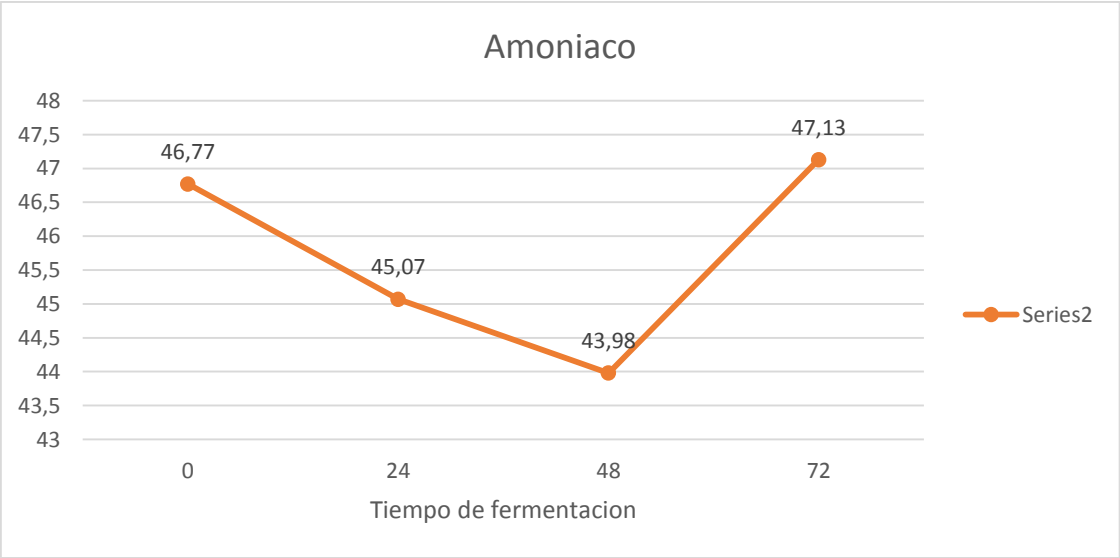

Figura 2. Variación en el contenido de amoniaco en los diferentes tiempos de fermentación de la pulpa de café.

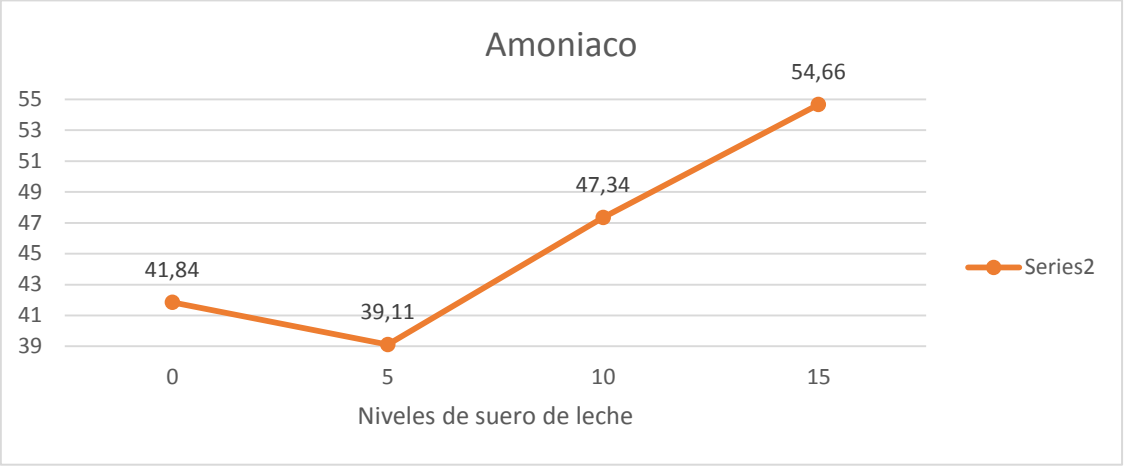

Figura 3. Variación en el contenido de amoniaco de acuerdo a niveles de inclusión de suero de leche en la fermentación de la pulpa.

4.3. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA PULPA BIOFERMENTADA

En la pulpa biofermentada se realizó el análisis bromatológico para determinar el contenido de materia seca, cenizas, fibra cruda y proteína cruda según el método de la AOAC (1995). La proteína verdadera se determinó mediante la técnica de Bernstein. Los resultados se presentan a continuación.

4.3.1. Materia Seca y Cenizas

El contenido de materia seca y cenizas de la pulpa de café biofermentada se explican en el siguiente cuadro y figuras.

Cuadro 4. Efecto del suero de leche en el contenido de MS y cenizas en la FES de la pulpa de café.

Materia Seca	**Tiempo de fermentación (horas)**				**EE(±)y Signif**
	0	**24**	**48**	**72**	0,20 P<0,0001
	20,64[c]	19,24[b]	18,92[ab]	18,62[a]	
	Niveles de suero de leche				
	0	**5**	**10**	**15**	0,20 P<0,0001
	21,09[d]	19,89[c]	18,87[b]	17,57[a]	

Indicadores	**Suero de leche (%)**	**Tiempo de fermentación (horas)**				**EE(±) y Signif.**
		0	**24**	**48**	**72**	
Cenizas	**0**	9,48[b]	9,67[c]	9,30[b]	9,21[b]	0,08 P=0,0001
	5	9,78[c]	9,41[b]	8,96[a]	8,76[a]	
	10	10,31[d]	10,72[e]	10,90[e]	10,74[e]	
	15	11,79[g]	12,12[h]	12,11[h]	11,39[f]	

El análisis estadístico del contenido de materia seca no reveló interacción entre el tiempo de fermentación y los niveles de inclusión del suero de leche. Se observa una clara tendencia a disminuir a medida que avanza el tiempo de fermentación y se incrementan los niveles de inclusión de suero; lo que posiblemente se deba a la transformación de los productos finales de la hidrólisis que ocurre durante la fermentación y que son de carácter volátil.

El contenido de cenizas presentó interacción altamente significativa entre los factores en estudio; sin embrago no se visualiza una tendencia clara en función al tiempo de fermentación, donde los valores tienden a permanecer constantes; pero de acuerdo a los niveles de suero se presenta un incremento en el contenido de cenizas; lo que se puede deber al aporte de minerales por parte del suero.

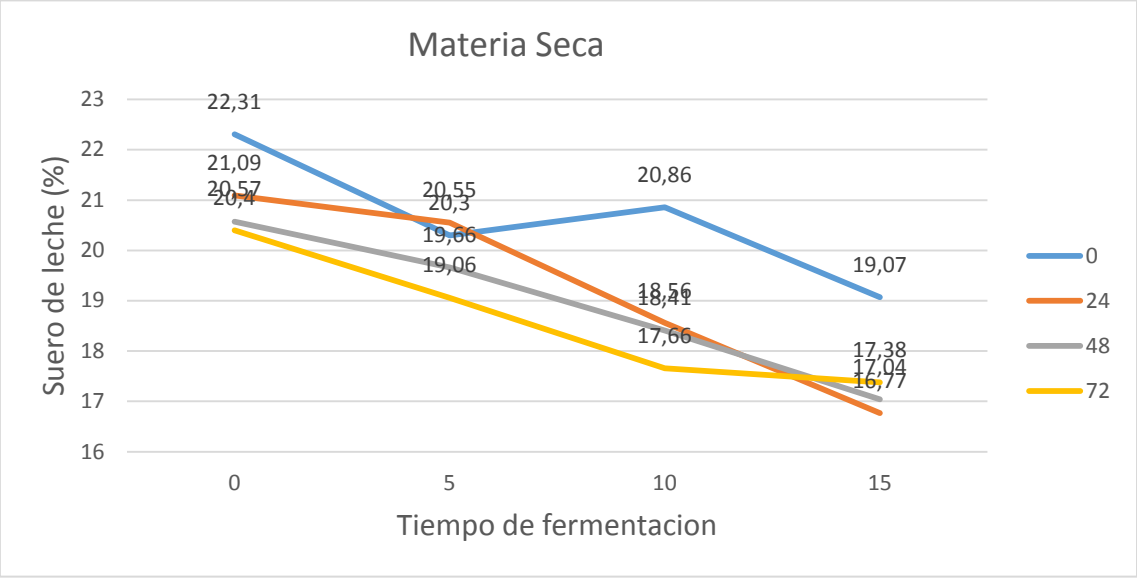

Figura 4. Contenido de materia seca en la FES de pulpa de café con diferentes niveles de inclusión de suero de leche y diferentes tiempos de fermentación.

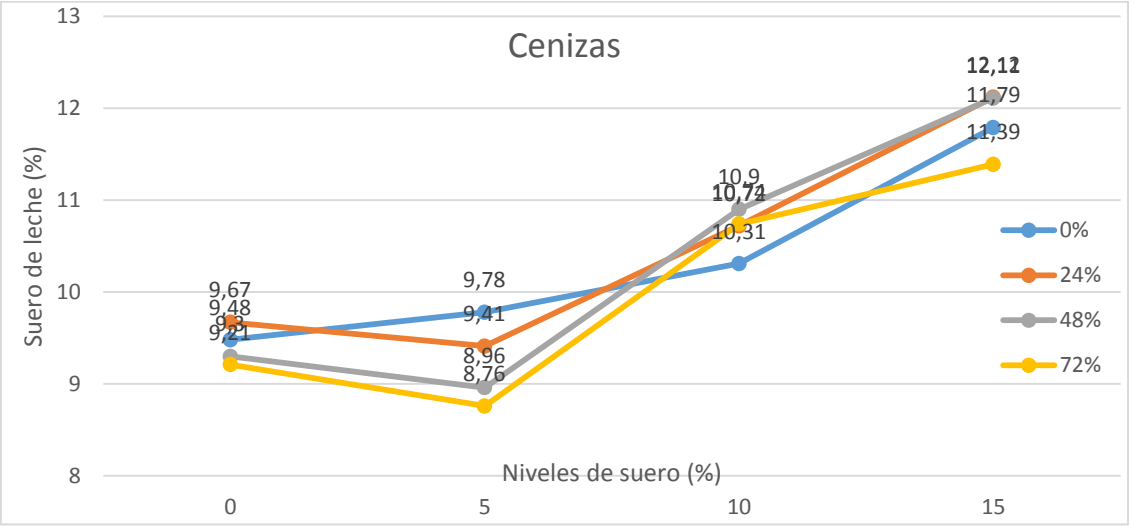

Figura 5. Variación en el contenido de cenizas en la FES de pulpa de café con diferentes niveles de inclusión de suero de leche hasta las 72 horas.

4.3.2. Proteína Cruda y Verdadera

Los contenidos de proteína cruda y verdadera de la pulpa de café biofermentada, de acuerdo a los factores en estudio, se resumen en el cuadro 5 y figuras 8 y 9.

Cuadro 5. Efecto del suero de leche en el contenido de P.C y P.V en la FES de la pulpa de café.

Indicadores	Suero de leche (%)	Tiempo de fermentación (horas)				EE(±) y Signif.
		0	24	48	72	
Proteína cruda	0	25,06[a]	27,17[a]	26,09[c]	24,90[a]	0,13 P<0,0001
	5	25,11[a]	25,69[b]	25,98[c]	27,16[d]	
	10	27,91[e]	29,14[g]	29,25[g]	28,69[f]	
	15	28,63[f]	29,54[g]	30,52[h]	30,28[h]	
Proteína verdadera	0	6,98[d]	5,92[a]	5,91[a]	6,40[b]	0,07 P<0,0001
	5	6,72[c]	7,48[e]	7,14[d]	7,66[e]	
	10	8,35[f]	9,41[i]	8,73[g]	8,69[g]	
	15	8,72[g]	8,70[g]	9,32[i]	8,93[h]	

El contenido de proteína cruda presentan interacción entre los niveles de suero de leche y tiempo de fermentación, observándose incremento hasta las 48 horas luego disminuye y permanecer constante a las 72 horas; de acuerdo a los niveles de suero, los valores de proteína se incrementan, hasta alcanzar el porcentaje más alto con el 15% hasta las 48 horas con 30,52%.

En lo referente al contenido de proteína verdadera se observa una tendencia clara a subir con los niveles de inclusión de suero, en cambio con de acuerdo al tiempo de fermentación, los valores permanecen constantes. Los valores más altos de proteína verdadera se registran a las 24 y 48 horas con 10 y 15 % de suero de leche con 9,41 y 9,32 % respectivamente.

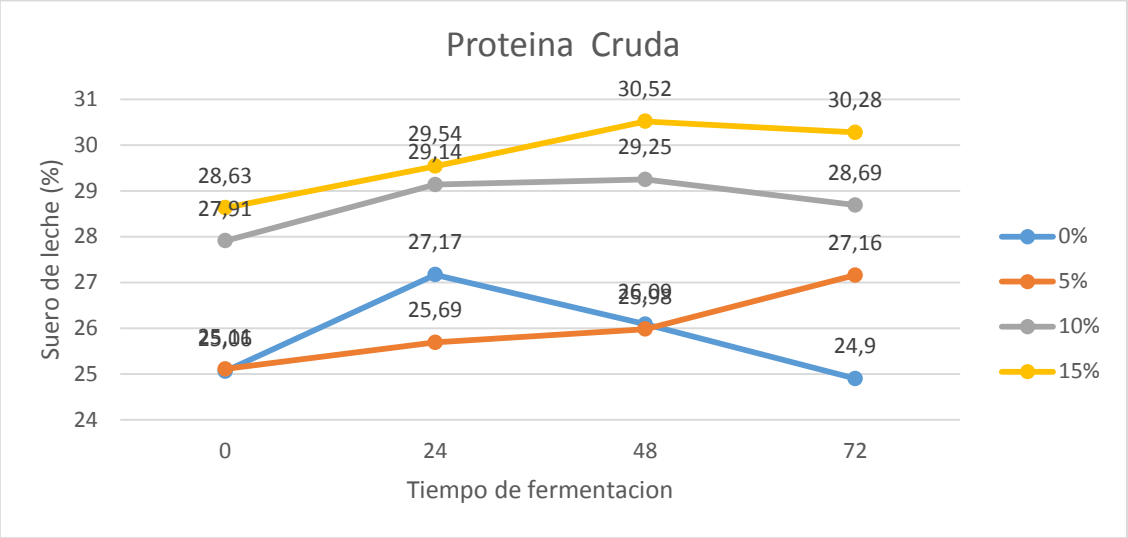

Figura 6. Contenido de proteína cruda de acuerdo a los niveles de suero de leche y tiempo de fermentación de la pulpa de café.

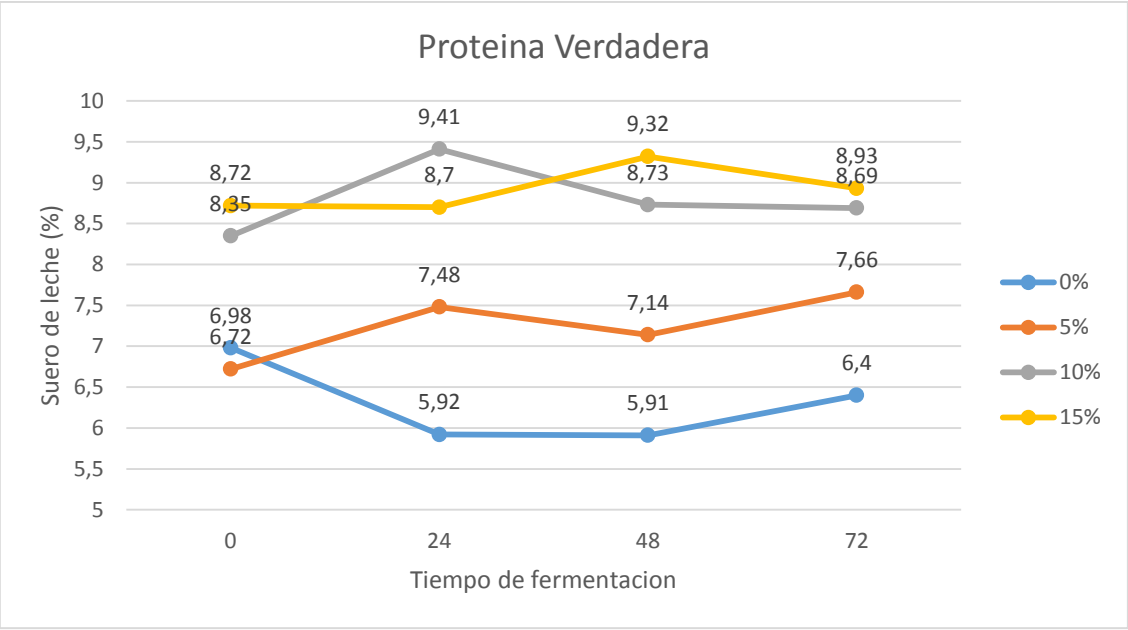

Figura 7. Contenido de proteína verdadera en la FES de pulpa de café de acuerdo al tiempo de fermentación y niveles de suero de leche.

4.3.3. Fibra Cruda

En el cuadro 6 y figura nueve se expone el contenido de fibra cruda de la pulpa de café biofermentada, en función del tiempo de fermentación y niveles de inclusión de suero de leche.

Cuadro 6. Efecto del suero de leche en el contenido de FC en la FES de la pulpa de café hasta las 72 horas.

Indicadores	Suero de leche (%)	Tiempo de fermentación (horas)				EE(±) y Signif.
		0	24	48	72	
Fibra cruda	0	14,65[c]	13,79[b]	13,96[b]	12,95[a]	0,12 P<0,0001
	5	14,51[c]	14,48[c]	14,85[c]	15,24[d]	
	10	15,22[d]	16,12[e]	16,09[e]	17,16[fg]	
	15	14,47[f]	18,11[h]	17,05[f]	16,25[e]	

El contenido de fibra cruda varía de acuerdo al tiempo de fermentación sin presentar una tendencia clara en los niveles 0 y 15%, no así en los niveles 5 y 10% donde se incrementa hasta las 72 horas. De acuerdo a los niveles de suero la tendencia es más clara ya que se incrementa alcanzando el mayor porcentaje en el nivel del 15% a las 24 horas con 18,11%

En estudios similares de FES, se encontró que hay una concentración relativa de la FC en el producto final por ser el menos degradado por los microorganismos durante la fermentación.

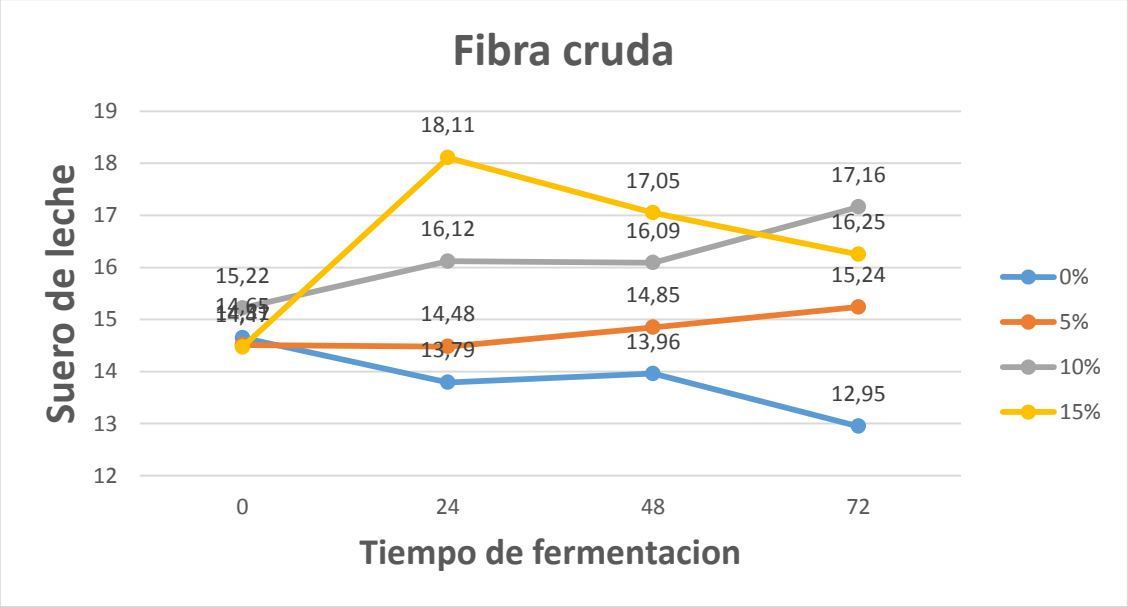

Figura 8. Contenido de fibra cruda en la FES de pulpa de café de acuerdo al tiempo de fermentación y niveles de suero de leche.

5. DISCUSIÓN

5.1. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA PULPA FRESCA

El contenido de materia seca de la pulpa de café fresca tal como ofrecido fue de 26,53%; mientras que en base seca el contenido de proteína cruda fue de 9,12 %; valor que no concuerda con los reportados por Bressani, (1978). Ramírez, (1999) y Zambrano (2004) los que superan el 12%; posiblemente se deba a las condiciones agroecológicas de la zona de estudio, a la variedad de café y a las condiciones de manejo del cultivo. El contenido de fibra cruda es similar a los reportados por los investigadores mencionados y está por el orden del 16,28 %.

5.2. pH Y AMONIACO

Los valores de pH se ven afectados por el tiempo de fermentación y los niveles de inclusión de suero de leche, así se observa que se mantienen constantes en los niveles 0, 5 y 10% de suero de leche hasta las 72 h de fermentación; pero en el nivel del 15% la tendencia es diferente ya que disminuye a las 24 h para luego incrementarse a las 48 h y mantenerse estable a las 72 h.

El análisis estadístico del contenido de amoniaco no muestra interacción entre los factores en estudio. De acuerdo al tiempo de fermentación se mantienen valores constantes hasta las 72 horas; mientras que de acuerdo a los niveles de inclusión de suero de leche el comportamiento es diferente, ya que se mantiene estable en los niveles 0 y 5% y se incrementa considerablemente en los niveles del 10 y 15%.

En estudios realizados por Rodríguez *et al.*, (2004) se menciona que existe una relación directa entre el pH y el contenido de amoniaco, lo que se explica porque el amoniaco es retenido en el sustrato. El amoniaco puede ser utilizado por los microorganismos para la síntesis de proteína microbiana, como resultado se tiene un considerable incremento de la biomasa microbiana en el sustrato fermentado.

En relación a estos dos indicadores fermentativos, se señala que los procesos de fermentación en estado sólido, no solo depende de los sustratos empleados, sino también de factores biológicos y físicos-químicos como la disponibilidad energética, temperatura, pH, aireación, tiempo de incubación de la muestra, que pueden influir en su crecimiento (Rodríguez *et al.*, 2001; Pandey *et al*,. 2001).

5.3. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA PULPA BIOFERMENTADA

5.3.1. Materia Seca y Cenizas

El contenido de MS disminuye a medida que avanza el tiempo de fermentación, lo que puede deberse a la hidrólisis de la urea y desaminación de péptidos y aminoácidos con la producción de amoníaco que se pudiera volatilizar en dependencia del pH final del proceso, por los microorganismos presentes en el ecosistemas durante sus procesos metabólicos para síntesis celular, oxidándolos a ácidos grasos (que pudieran ser usados por levaduras y bacterias), CO_2 y H_2O (Rodríguez, 2005). Parte del agua producida durante la oxidación de las moléculas, pudiera evaporarse por el calor metabólico que se genera durante el proceso de FES (Mitchell *et al.*, 2002, Pandey *et al.*, 2001; citados por Ramos *et al*., 2007). Esto coincide con el comportamiento evaluado en los valores de MS a 24, 48 y 72 h de fermentación (19,24; 18,92; 18,62) respectivamente donde se observa que dichos valores son menores a la hora 0 y al nivel que no presenta suero.

Las cenizas o minerales, son sales y óxidos de los diferentes elementos químicos. Es en base a esos elementos, que en el lenguaje de la Producción Animal, se nombra y se conoce a los minerales (Cárdenas *et al.*, 2008). La pulpa de café fresca presenta valores promedio de 4-6% de cenizas en base a materia seca (Montoya *et al.*, 2004; Mora, 1999), valores que se vieron incrementados de manera significativa ($P<0.0001$) en cada uno de los tratamientos del actual estudio y que fueron superiores a lo indicado en la pulpa de café fresca. Este comportamiento puede atribuirse a que se adicionó 0,5% de premezcla mineral a la pulpa de café.

Argamentería *et al.* (1997), citado por Mier, (2009), señalan que las cenizas indican el contenido mineral de un alimento; sin embargo, si el porcentaje es alto, mayor del 15 % sobre MS, es seguro que hubo contaminación con tierra, lo que corrobora con los resultados que no son mayores de 15 % siendo el valor más alto (12,12 y 12:11) en 24 y 48 h horas respectivamente.

5.3.2. Proteína Cruda y Verdadera

El contenido de proteína cruda reportado para la pulpa de café fresca fue de 9,12 %; mientras que en FES con suero de leche el contenido de proteína llegó hasta 30,52% a las 48 horas; valores muy superiores a los reportados por Morgan (2003) que estuvieron por el orden del 19,95 %.

El incremento en el contenido de proteína puede atribuirse a que se mantuvo un pH dentro de un rango adecuado para el crecimiento de los microorganismos, estos a su vez hacen uso de la energía disponible en forma de carbohidratos solubles que el suero proporciona, utilizada para la retención de amoniaco y posterior conversión de NNP en nitrógeno proteico a través de procesos físico – biológicos Valiño *et al.*, (1994). Ramos *et al*., (1990) indican que la eficiencia de conversión de los carbohidratos solubles a proteína puede llegar a valores de 61%, debido al desarrollo de la microbiota que se establece en el sistema cuando este le proporciona las condiciones adecuadas.

En cuanto a la proteína verdadera es el indicador más importante de la síntesis microbiana. Por tanto los incrementos observados en éste parámetro confirman que los carbohidratos y el nitrógeno ureico fueron utilizados en la formación de protoplasma celular (Rodríguez *et al.*, 2001), indicando que la máxima eficiencia alcanzada para el paso de nitrógeno no proteico a nitrógeno proteico se llevó a cabo cerca a las 24 h de fermentación con el 10% de inclusión de suero.

5.3.3. Fibra Cruda

Los valores de FC fueron variables para los diferentes tratamientos, mostrando valores desde 12,95 hasta 18,11%. Se puede mencionar que a las 24 horas con el 15% de inclusión se presentan valores elevados comparados al resto de tratamientos.

Se puede decir que la FES permite disminuir considerablemente el contenido de fibra cruda, si comparamos que la pulpa fresca tiene un valor de 26,25 %.

6. CONCLUSIONES

En base a los resultados y discusión de cada una de las variables en estudio se llega a las siguientes conclusiones:

- La pulpa de café fresca procedente del cantón Quilanga presentó un apreciable contenido de proteína y fibra cruda con 9,12 % y 16,26 % respectivamente; lo que la convierte en un residuo agrícola interesante para la alimentación animal.

- Los indicadores de fermentación (pH y amoniaco) revelan una mayor actividad microbiana con la inclusión de 15% de suero de leche hasta las 48 horas.

- La materia seca disminuye con el tiempo de fermentación debido pérdidas de productos finales de la hidrólisis que ocurre durante la fermentación y que son de carácter volátil.

- El contenido de proteína cruda fue mayor con la inclusión del 15% de suero de leche hasta las 48 horas de fermentación; mientras que la proteína verdadera alcanzó su mayor porcentaje a las 24 horas con el 10% de suero de leche.

- El contenido de fibra cruda se vio afectado por los factores en estudio observándose una concentración relativa en el producto final por ser el menos degradado por los microorganismos durante la fermentación.

- Los resultados obtenidos permiten deducir que el mejor protocolo para la fermentación de la pulpa de café es el que contiene 15% de suero de leche hasta las 48 horas.

7. RECOMENDACIONES

En base a los resultados y conclusiones obtenidos en el presente trabajo de investigación se pueden formular las siguientes recomendaciones:

- En el proceso de fermentación en estado sólido (FES) de la pulpa de café utilizar el 15% de suero de leche durante 48 horas de fermentación a 26ºC, ya que presenta los mejores indicadores fermentativos y mayor contenido de nutrientes.

- Continuar con nuevos trabajos de investigación, orientados a identificar y controlar de mejor manera los factores que intervienen en la fermentación en estado sólido (FES) para mejorar la eficiencia del proceso.

- Realizar nuevos trabajos de investigación con pruebas de fermentación en campo, análisis de digestibilidad y evaluación con animales.

- Difundir los resultados con productores interesados en la temática a fin de propiciar su aplicación como una alternativa que permita el reciclaje de residuos agrícolas y el mejoramiento de la alimentación animal.

8. BIBLIOGRAFÍA

AOAC, 1995. Official Methods of Analysis 16va Edition Association of Official Analytical Chemists Washington, EUA.

ARGAMENTERÍA, 1997. Centro de Investigación Aplicada y Tecnología Agroalimentaria (CIATA), p. 1-127.

BRAHAM J Y R. BRESSANI. 1978. Pulpa de café. Composición tecnología y utilización. Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá, INCAP. Guatemala. pp. 19 – 29; 45 – 60.

BRESSANI, 1978. Subproductos del fruto de café. Pulpa de café: composición, tecnología y utilización.

CÁRDENAS, 2008. Evaluación de la pulpa de café en aves: Digestibilidad y energía metabolizable. Arch. Latinoam. Prod. Anim.

COFENAC, 2009. Informe técnico. 45p.

DUNCAN, 1959. Inprovement of Malysian cocoa vean flavor by modification of harvesting, fermentation and drying methods the sime-cadburyprocess.

DURAND, 1997. Beneficio del café. La Republica, San Salvador.

ELIAS, 1978. Composición química de la pulpa de café y otros sub productos. En Braham J. y R.Tecnología y Utilización. Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá Ciudad de Guatemala, Guatemala. págs. 19 - 29.

FAO, 1998. La ganadería bovina en América Latina. Escenario 2008 – 2009 y tendencias del sector. P 51 – 71.

FERRER, 1995. Ensilaje de la pulpa de café. Rev. Fac. Agron. Vol. 12, págs. 417-428.

FERREIRA, 2001. Factores antinutricionales de la cascara de pulpa deshidratada de café (Caffea arabica L.) almacenadas en diferentes períodos Rev. Bras.

GÓMEZ, 1985. Relación entre los niveles de inclusión de la pulpa de café y contenido proteínico en raciones para animales monogástricos. Arch. Latinoam.

GUTIÉRREZ, M. 1995. Escalamiento de procesos con fermentación sólida. Curso avanzado sobre procesos biotecnológicos del Instituto de Biotecnología de la UNAM, México.

HÖLKER, 2004. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. Applied Microbiology and Biotechnology.

LOZANO, 2015. Establecimiento de un protocolo para la biofermentación de la pulpa de café con la inclusión de cuatro niveles de jugo de caña, en cuatro periodos de tiempo.

MORA, 1999. Nutrición animal. Sexta. Edit. EUNED. Zaragoza, España.

MIER QUIROZ MA. (2009). Caracterización del valor nutritivo y estabilidad aeróbica de ensilados en forma de microsilos para maíz forrajero. [Tesis de maestría]. Cordoba: Departamento de producción animal, Universidad de Córdoba.

MITCHELL, 2002. Scale-up strategies for parked-bed bioreactors for solid-state fermentación. Process Biochemistry.

MONTOYA, 2004. Tesis de Magíster, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

MORGAN, S. F. 2003 "LA PULPA DE CAFÉ ENRIQUECIDA. Un aporte al desarrollo sostenible en la zona montañosa de Guantánamo". Tesis presentada en opción al grado de Doctor en Ciencias Veterinarias. Centro Universitario de Guantánamo. Instituto de Ciencia Animal. Cuba.

NORIEGA, 2008. Utilización de la pulpa de café en la alimentación animal. Zootecnia Tropical. Vol. 26(4). pp. 411 – 419.

NORIEGA, 2009. Composición química de la pulpa de café a diferentes tiempos de ensilaje para su uso potencial en la alimentación animal. Zootecnia Tropical. Vol. 27(2). pp. 135 – 141.

PANDEY, 2001. Solid-state fermentación. Bioclemical Engineering Journal.

RAMÍREZ, 1999. Pulpa Ensilada. Producción, caracterización y utilización en alimentación animal. Universidad Nacional Experimental de Táchira – Venezuela. pp. 129 – 139.

RAMOS, 1990. Producción de Pleurotus ostreatus var. Frorida sobre residuales del café Tesis de Master en Biotecnología. ESPOCH ECUADOR.

RAMOS, C. RAMÍREZ, 2007. Actividad antioxidante de la pulpa de café y sus derivados. VI Jornadas Científico Técnicas Univ. Nac. Exp. Táchira, San Cristóbal, Táchira, Venezuela.

RODRIGUEZ, 2001. Cultivo de Pleurotus pulmonarius en pulpa de café", Cenicafé 45/3, 1994, págs. 81-92.

RODRÍGUEZ, 2004. Manejo de residuos en la agroindustria cafetera. Seminario Internacional: Gestión Integral de Residuos sólidos y Peligrosos.

RODRÍGUEZ, 2005. Decolourisation of mushroom farm wastewater by Pleurotus ostreatus, en Biodegradation, vol., 19, págs. 519- 526.

RODRÍGUEZ, A. Z. 2004. Uso del boniato (Ipomoea batata lam) en la tecnología de fermentación en estado sólido de la caña de azúcar (Saccharum officinarum). Tesis presentada en opción al grado de Doctor en Ciencias Veterinarias. Universidad Agraria de la Habana. Instituto de Ciencia Animal. Cuba. pp. 8 – 11.

SINGHANIA, 2009. Incremento de la capacidad antioxidante de extractos de pulpa de café por fermentación láctica en medio sólido.

VALIÑO, 1994. Composición de es- 58 Revista Cubana de Ciencia Agrícola, Tomo 40, No. 1, 2006. pecies de bacterias aisladas del proceso de obtención de la Saccharina. II. Bacterias gram positivas. Rev. Cubana Cienc. Agríc.

VALIÑO, 1999. Influencia de la aireación en la biotransformación del bagazo de caña por Trichoderma viride M5-2 en un biorreactor estático de fermentación sólida. Rev. Cubana Cienc. Agríc. 36:152.

ZAMBRANO, G. D. 2004. Contribución al estudio de los subproductos agroindustriales del trópico húmedo ecuatoriano para la alimentación de rumiantes" Tesis presentada en opción al grado de Doctor en Ciencias Veterinarias. Instituto de Ciencia Animal. pp. 61 – 63

9. ANEXOS

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
ÁREA AGROPECUARIA Y RECURSOS NATURALES RENOVABLES
CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA.

ANEXO 1. Análisis estadístico de las variables en estudio mediante arreglo factorial 4x4 (Niveles de suero de leche por tiempo de fermentación) con la ayuda del programa Infostat versión 2012.

pH

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
pH	48	0,99	0,98	1,11

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	6,24	15	0,42	160,74	<0,0001
Suero de leche	6,15	3	2,05	791,17	<0,0001
Tiempo	0,02	3	0,01	2,34	0,0916
Suero de leche*Tiempo	0,08	9	0,01	3,40	0,0050
Error	0,08	32	2,6E-03		
Total	6,33	47			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,0026 gl: 32

Suero de leche	Medias	n	E.E.				
10,00	4,15	12	0,01	A			
5,00	4,46	12	0,01		B		
0,00	4,58	12	0,01			C	
15,00	5,14	12	0,01				D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0,05)

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,0026 gl: 32

Tiempo	Medias	n	E.E.		
72,00	4,56	12	0,01	A	
24,00	4,56	12	0,01	A	
48,00	4,58	12	0,01	A	B
0,00	4,61	12	0,01		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0,05)

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,0026 gl: 32

Suero de leche	Tiempo	Medias	n	E.E.					
10,00	72,00	4,06	3	0,03	A				
10,00	48,00	4,14	3	0,03	A	B			
10,00	24,00	4,16	3	0,03		B			
10,00	0,00	4,22	3	0,03		B			
5,00	24,00	4,45	3	0,03			C		
5,00	0,00	4,45	3	0,03			C	D	
5,00	48,00	4,46	3	0,03			C	D	
5,00	72,00	4,49	3	0,03			C	D	E	
0,00	0,00	4,54	3	0,03				D	E	F
0,00	48,00	4,57	3	0,03					E	F
0,00	72,00	4,59	3	0,03						F
0,00	24,00	4,60	3	0,03						F

15,00	24,00	5,05	3	0,03		G		
15,00	72,00	5,11	3	0,03		G	H	
15,00	48,00	5,16	3	0,03			H	I
15,00	0,00	5,23	3	0,03				I

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0,05)

Amoniaco

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
Amoniaco	48	0,72	0,59	10,94

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2088,02	15	139,20	5,56	<0,0001
Suero de leche	1693,88	3	564,63	22,53	<0,0001
Tiempo	78,48	3	26,16	1,04	0,3865
Suero de leche*Tiempo	315,66	9	35,07	1,40	0,2295
Error	801,85	32	25,06		
Total	2889,86	47			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 25,0578 gl: 32

Suero de leche	Medias	n	E.E.			
5,00	39,11	12	1,45	A		
0,00	41,85	12	1,45	A		
10,00	47,34	12	1,45		B	
15,00	54,66	12	1,45			C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0,05)

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 25,0578 gl: 32

Tiempo	Medias	n	E.E.				
48,00	43,98	12	1,45	A			
24,00	45,07	12	1,45	A			
0,00	46,77	12	1,45	A			
72,00	47,13	12	1,45	A			

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0,05)

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 25,0578 gl: 32

Suero de leche	Tiempo	Medias	n	E.E.						
5,00	24,00	37,28	3	2,89	A					
5,00	0,00	37,96	3	2,89	A					
5,00	48,00	39,49	3	2,89	A	B				
0,00	48,00	39,97	3	2,89	A	B				
0,00	0,00	40,33	3	2,89	A	B				
0,00	72,00	41,45	3	2,89	A	B	C			
5,00	72,00	41,72	3	2,89	A	B	C			
10,00	24,00	43,02	3	2,89	A	B	C	D		
0,00	24,00	45,63	3	2,89	A	B	C	D	E	
10,00	48,00	46,07	3	2,89	A	B	C	D	E	
10,00	0,00	48,16	3	2,89		B	C	D	E	
15,00	48,00	50,40	3	2,89			C	D	E	
10,00	72,00	52,09	3	2,89				D	E	F
15,00	72,00	53,25	3	2,89					E	F
15,00	24,00	54,34	3	2,89					E	F
15,00	0,00	60,64	3	2,89						F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0,05)

Materia Seca

Variable	N	R²	R² Aj	CV
MS	48	0,88	0,83	3,59

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	118,54	15	7,90	16,35	<0,0001
Suero de leche	80,88	3	26,96	55,77	<0,0001
Tiempo	28,59	3	9,53	19,71	<0,0001
Suero de leche*Tiempo	9,08	9	1,01	2,09	0,0611
Error	15,47	32	0,48		
Total	134,01	47			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,4834 gl: 32

Suero de leche	Medias	n	E.E.				
15,00	17,57	12	0,20	A			
10,00	18,87	12	0,20		B		
5,00	19,89	12	0,20			C	
0,00	21,09	12	0,20				D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0,05)

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,4834 gl: 32

Tiempo	Medias	n	E.E.			
72,00	18,62	12	0,20	A		
48,00	18,92	12	0,20	A	B	
24,00	19,24	12	0,20		B	
0,00	20,64	12	0,20			C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0,05)

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,4834 gl: 32

Suero de leche	Tiempo	Medias	n	E.E.						
15,00	24,00	16,77	3	0,40	A					
15,00	48,00	17,04	3	0,40	A					
15,00	72,00	17,38	3	0,40	A	B				
10,00	72,00	17,66	3	0,40	A	B				
10,00	48,00	18,41	3	0,40		B	C			
10,00	24,00	18,56	3	0,40		B	C			
5,00	72,00	19,06	3	0,40			C	D		
15,00	0,00	19,07	3	0,40			C	D		
5,00	48,00	19,66	3	0,40			C	D	E	
5,00	0,00	20,30	3	0,40				D	E	F
0,00	72,00	20,40	3	0,40					E	F
5,00	24,00	20,55	3	0,40					E	F
0,00	48,00	20,57	3	0,40					E	F
10,00	0,00	20,86	3	0,40					E	F
0,00	24,00	21,09	3	0,40						F
0,00	0,00	22,31	3	0,40						G

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0,05)

Fibra Cruda

Variable	N	R²	R² Aj	CV
FC	48	0,99	0,99	1,30

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	126,40	15	8,43	233,23	<0,0001
Suero de leche	110,92	3	36,97	1023,28	<0,0001
Tiempo	0,17	3	0,06	1,60	0,2098
Suero de leche*Tiempo	15,31	9	1,70	47,09	<0,0001
Error	1,16	32	0,04		
Total	127,56	47			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,0361 gl: 32

Suero de leche	Medias	n	E.E.				
0,00	12,54	12	0,05	A			
5,00	13,81	12	0,05		B		
10,00	15,46	12	0,05			C	
15,00	16,51	12	0,05				D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0,05)

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,0361 gl: 32

Tiempo	Medias	n	E.E.	
0,00	14,53	12	0,05	A
48,00	14,55	12	0,05	A
72,00	14,55	12	0,05	A
24,00	14,68	12	0,05	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0,05)

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,0361 gl: 32

Suero de leche	Tiempo	Medias	n	E.E.								
0,00	72,00	11,93	3	0,11	A							
0,00	24,00	12,28	3	0,11		B						
0,00	48,00	12,58	3	0,11		B						
0,00	0,00	13,38	3	0,11			C					
5,00	24,00	13,55	3	0,11			C	D				
5,00	0,00	13,56	3	0,11			C	D				
5,00	48,00	13,86	3	0,11				D				
5,00	72,00	14,26	3	0,11					E			
10,00	0,00	14,47	3	0,11					E			
10,00	48,00	15,37	3	0,11						F		
10,00	24,00	15,53	3	0,11						F		
15,00	72,00	15,56	3	0,11						F		
15,00	48,00	16,39	3	0,11							G	
10,00	72,00	16,46	3	0,11							G	
15,00	0,00	16,71	3	0,11							G	
15,00	24,00	17,36	3	0,11								H

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0,05)

Proteína Cruda

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
PC	48	0,98	0,97	1,58

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	222,35	15	14,82	89,17	<0,0001
Suero de leche	204,60	3	68,20	410,25	<0,0001
Tiempo	10,17	3	3,39	20,38	<0,0001
Suero de leche*Tiempo	7,59	9	0,84	5,07	0,0003
Error	5,32	32	0,17		
Total	227,67	47			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,1662 gl: 32

Suero de leche	Medias	n	E.E.				
0,00	23,39	12	0,12	A			
5,00	24,29	12	0,12		B		
10,00	27,52	12	0,12			C	
15,00	28,26	12	0,12				D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0,05)

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,1662 gl: 32

Tiempo	Medias	n	E.E.		
0,00	25,08	12	0,12	A	
48,00	26,01	12	0,12		B
24,00	26,16	12	0,12		B
72,00	26,21	12	0,12		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0,05)

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,1662 gl: 32

Suero de leche	Tiempo	Medias	n	E.E.								
0,00	72,00	22,93	3	0,24	A							
0,00	0,00	22,94	3	0,24	A							
5,00	0,00	23,46	3	0,24	A	B						
0,00	48,00	23,51	3	0,24	A	B	C					
5,00	24,00	24,03	3	0,24		B	C					
0,00	24,00	24,20	3	0,24		B	C					
5,00	48,00	24,24	3	0,24			C					
5,00	72,00	25,42	3	0,24				D				
10,00	0,00	26,52	3	0,24					E			
15,00	0,00	27,39	3	0,24						F		
10,00	72,00	27,51	3	0,24						F		
10,00	48,00	27,96	3	0,24						F	G	
10,00	24,00	28,08	3	0,24						F	G	
15,00	24,00	28,32	3	0,24							G	H
15,00	48,00	28,33	3	0,24							G	H
15,00	72,00	28,99	3	0,24								H

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0,05)

Proteína Verdadera

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
PV	48	1,00	0,99	1,37

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	72,26	15	4,82	472,67	<0,0001
Suero de leche	65,87	3	21,96	2154,44	<0,0001
Tiempo	0,32	3	0,11	10,36	0,0001
Suero de leche*Tiempo	6,07	9	0,67	66,19	<0,0001
Error	0,33	32	0,01		
Total	72,59	47			

Test: Duncan Alfa=0,05

Error: 0,0102 gl: 32

Suero de leche	Medias	n	E.E.				
0,00	5,72	12	0,03	A			
5,00	6,81	12	0,03		B		
10,00	8,42	12	0,03			C	
15,00	8,53	12	0,03				D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0,05)

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,0102 gl: 32

Tiempo	Medias	n	E.E.		
0,00	7,26	12	0,03	A	
48,00	7,32	12	0,03	A	
24,00	7,42	12	0,03		B
72,00	7,47	12	0,03		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0,05)

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,0102 gl: 32

Suero de leche	Tiempo	Medias	n	E.E.								
0,00	24,00	5,27	3	0,06	A							
0,00	48,00	5,33	3	0,06	A							
0,00	72,00	5,90	3	0,06		B						
0,00	0,00	6,39	3	0,06			C					
5,00	0,00	6,39	3	0,06			C					
5,00	48,00	6,67	3	0,06				D				
5,00	24,00	6,99	3	0,06					E			
5,00	72,00	7,17	3	0,06						F		
10,00	0,00	7,94	3	0,06							G	
10,00	72,00	8,33	3	0,06								H
15,00	24,00	8,34	3	0,06								H
15,00	0,00	8,34	3	0,06								H
10,00	48,00	8,34	3	0,06								H
15,00	72,00	8,49	3	0,06								H
15,00	48,00	8,96	3	0,06									I
10,00	24,00	9,07	3	0,06									I

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0,05)

Cenizas

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
C	48	0,99	0,99	1,34

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	70,09	15	4,67	277,81	<0,0001
Suero de leche	66,31	3	22,10	1314,12	<0,0001
Tiempo	0,82	3	0,27	16,30	<0,0001
Suero de leche*Tiempo	2,96	9	0,33	19,54	<0,0001
Error	0,54	32	0,02		
Total	70,62	47			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,0168 gl: 32

Suero de leche	Medias	n	E.E.			
0,00	8,52	12	0,04	A		
5,00	8,63	12	0,04	A		
10,00	10,19	12	0,04		B	
15,00	11,36	12	0,04			C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0,05)

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,0168 gl: 32

Tiempo	Medias	n	E.E.			
72,00	9,47	12	0,04	A		
0,00	9,69	12	0,04		B	
48,00	9,70	12	0,04		B	
24,00	9,84	12	0,04			C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0,05)

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,0168 gl: 32

Suero de leche	Tiempo	Medias	n	E.E.									
5,00	72,00	8,20	3	0,07	A								
5,00	48,00	8,36	3	0,07	A	B							
0,00	48,00	8,38	3	0,07	A	B							
0,00	72,00	8,48	3	0,07		B	C						
0,00	24,00	8,61	3	0,07			C	D					
0,00	0,00	8,63	3	0,07			C	D					
5,00	24,00	8,81	3	0,07				D					
5,00	0,00	9,14	3	0,07					E				
10,00	0,00	9,71	3	0,07						F			
10,00	72,00	10,30	3	0,07							G		
10,00	24,00	10,33	3	0,07							G		
10,00	48,00	10,41	3	0,07							G		
15,00	72,00	10,91	3	0,07								H	
15,00	0,00	11,28	3	0,07									I
15,00	24,00	11,62	3	0,07									J
15,00	48,00	11,64	3	0,07									J

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0,05)

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

ÁREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

ANEXO 2: Fotografías del trabajo de campo

Figura 1: Pesaje de la urea y sales minerales.

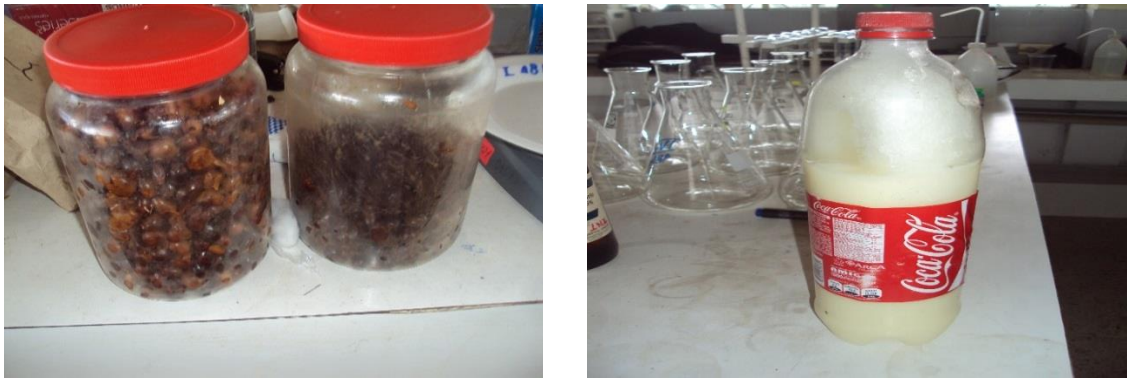

Figura 2: Adquisición de los materiales para el experimento.

Figura 3: Identificación de las unidades experimentales.

Figura 4: Montaje del experimento.

Figura 5: Proceso de fermentación (estufa a 26ºC).

Figura 6: Preparación de submuestras para medir indicadores de fermentación.

Figura 7: Determinación de pH y Amoniaco

Figura 8: Determinación de materia seca

Figura 9: Preparación de muestras para el análisis bromatológico.

Figura 10: Determinación de proteína verdadera.

Figura 11: Determinación de Fibra Cruda.

Figura 12: Determinación de Cenizas.