

## CONTENIDO

TEMA	Página
Editorial	1
Presentación	3
CONTROL FÍSICO-QUÍMICO Y MICROBIOLÓGICO EN EL PROCESO DE POTABILIZACIÓN DEL AGUA EN EL CASERÍO EL ROSAL – CANTÓN MOCHA Ramos Juan y Espinoza Verónica	5
DETERMINACIÓN DE LA INFLUENCIA DE LAS ZONAS DE PRODUCCIÓN SOBRE EL CONTENIDO DE COMPONENTES BIOACTIVOS Y LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE CINCO FRUTAS ANDINAS. Poveda Cristina, Robalino Dolores & Espín Susana	9
EVALUACIÓN DE LA INCIDENCIA DE LA APLICACIÓN FOLIAR DE UN BIOFERTILIZANTE ELABORADO A BASE DE FRUTAS EN EL NIVEL DE CLOROFILA a Y b Y EN LA CALIDAD DEL FOLLAJE DE TOMATE RIÑÓN ( <i>Solanum lycopersicum L.</i> ), FRESA ( <i>Fragaria vesca</i> ), Y ROSAS ( <i>Rosae sp.</i> ). Andrea Quinde Y Liliana Acurio	14
DIVERSIDAD MOLECULAR DE LEVADURAS ASOCIADAS A FRUTOS DE MORA DETERMINADAS MEDIANTE TÉCNICAS MOLECULARES Cevallos Campaña Cristina, Carvajal Barriga Javier, Portero Barahona Patricia, Tufiño Coloma Carolina, Rodríguez Meza Carlos.	20
PRODUCCIÓN DE ABONO ORGÁNICO A PARTIR DE RESIDUOS DE CAÑA DE AZÚCAR Y AZOLLA CON LA APLICACIÓN DE MICROORGANISMOS EFICIENTES (EM's) Garcés María Fernanda, Pacheco María Teresa	26
EVALUACIÓN DE SOPORTES SÓLIDOS Y LÍQUIDOS, PARA LA PRODUCCIÓN DE UN BIOFERTILIZANTE A BASE DE <i>Azospirillum spp.</i> APLICABLE AL CULTIVO DE MAÍZ ( <i>Zea mays, L.</i> ) Yolanda Pallo y Ramiro Velasteguí	32
DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LAS CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO SOBRE LA VIABILIDAD DE ESPORAS Y MICELIO DE ACTINOMICETES AISLADOS DE LA RIZÓSFERA DE LEGUMINOSAS Diana Andrade y Carlos Rodríguez	40
ELABORACIÓN DE GALLETAS DE SAL UTILIZANDO HARINA DE TRIGO ( <i>Triticum aestivum</i> ) NACIONAL DE LA VARIEDAD INIAP – COJITAMBO CON SUPLEMENTOS PARCIALES DE HARINA DE TRIGO IMPORTADO Aquino Elena, Fernando Álvarez, Mario Álvarez	44

UTILIZACIÓN DE GOMA XANTHAN Y MONOGLICÉRIDO DESTILADO PARA EL MEJORAMIENTO DE LA TEXTURA DEL PAN ELABORADO A PARTIR DE ALMIDÓN DE YUCA ( <i>Manihot esculenta</i> ) Ximena Wong y Alexandra Lascano		<b>50</b>
ELABORACIÓN DE UN PRODUCTO PROTEICO ALTERNATIVO A PARTIR DE SOYA ( <i>Glycine max</i> ) Y QUINUA ( <i>Chenopodium quinoa Willd</i> ) López Susana; Alvarado Juan de Dios y Silva Mónica		<b>54</b>
HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS DE SUERO LÁCTEO CON PROTEASAS DE TRACTO DE TRUCHA ARCOIRIS ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ) PARA REDUCIR LA CONTAMINACIÓN ORGÁNICA DEL AGUA MEDIANTE LA POSIBLE APLICACIÓN COMO FERTILIZANTE ORGÁNICO. Oscar Salazar, Ana Alfaro, Cecilia Carpio		<b>60</b>
UTILIZACIÓN DE ENZIMAS AMILASAS ( <i>Fungamyl</i> ) EN LA FERMENTACIÓN ÁCIDO-LÁCTICA DE UNA COLADA DE MOROCHO ( <i>Zea mays, variedad Morochon</i> ) CON MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS (Cultivo lácteo SLB 953: <i>Lactobacillus bulgaricus</i> , ( <i>Streptococcus thermophilus</i> ) y <i>Lactobacillus casei</i> . Dario Israel Ojeda Sánchez, Gladys Cecilia Navas Miño		<b>66</b>
APROVECHAMIENTO DE RESIDUOS SOLIDOS DOMICILIARIOS EN LA OBTENCIÓN DE BOCASHI CON LA APLICACIÓN DE CENIZA VOLCÁNICA Y LA CONSTRUCCIÓN DE COMPOSTERAS DOMÉSTICAS María Daniela Garcés, María Teresa Pacheco		<b>72</b>
DESARROLLO DE UNA PELÍCULA COMESTIBLE APLICANDO MOLÉCULAS PROTEÍCAS LÁCTEAS Y PRETRATAMIENTOS DE ACEITES ESENCIALES PARA EXTENDER LA VIDA DE ANAQUEL DE TOMATE HORTÍCOLA FRESCO ( <i>Lycopersicum esculentum</i> ) Diana Sandoval Garzón, Carlos Moreno Miranda		<b>79</b>
EVALUACIÓN DEL VALOR NUTRICIONAL Y CALIDAD SENSORIAL DE TORTILLAS PRECOCIDAS ELABORADAS CON PAPA NATIVA ( <i>Solanum tuberosum ssp. andigena</i> ) DE TRES VARIEDADES (CHAUCHA ROJA, LEONA NEGRA Y YEMA DE HUEVO) ENRIQUECIDAS CON PASTA DE QUINUA ( <i>Chenopodium quinoa Willd</i> ) Eliana Guillín*, Milton Ramos y Mónica Silva		<b>86</b>
ESTUDIO DEL EFECTO DE UN RECUBRIMIENTO COMESTIBLE Y SU INCIDENCIA EN EL TIEMPO DE VIDA ÚTIL DE UVILLA ( <i>Physalis peruviana L.</i> ) Villacís Jhullana; Alvarez Fernando; Alvarez Mario; Silva Mónica		<b>91</b>
EVALUACIÓN DEL SELLADO AL VACÍO EN FUNDAS DE POLIETILENO DE ALTA DENSIDAD SOBRE LA VIDA DE ANAQUEL DE QUESOS FRESCOS Y SEMIDUROS German, María Fernanda y Alvarado, Juan de Dios		<b>96</b>

# EDITORIAL

## FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS COMPROMETIDA CON LA INVESTIGACIÓN



Galo Naranjo López

Escribir para una revista científica es comprometerse a comunicar conocimientos obtenidos a fuerza de búsqueda, de indagación, de sacrificio, de cuestionamiento de una realidad que entraña secretos descubiertos solo por aquellos que se atreven a ir más allá del mundo de las apariencias, porque su pensamiento es crítico, creativo, divergente y con sus actitudes asertivas generan propuestas que construyen ciencia con conciencia, porque transforma seres humanos.

Comprender a la Universidad en la Sociedad del Conocimiento es situarla en el campo de la Investigación, de la academia, de la innovación, de la vinculación con la sociedad, del emprendimiento, para transformar realidades que mejoren la calidad de vida de los seres humanos.

Lo digo con convicción absoluta: la investigación es consubstancial a la existencia misma de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, porque a través de cuarenta y cinco años de historia ha demostrado su compromiso con la solución de problemas de nuestro pueblo en el área de alimentos, que nos acerquen a la verdad, que generen comprensiones más profundas de la realidad alimentaria, que aporten el señalamiento de modelos teóricos y generen caminos para transitar en la construcción de ciencia.

Investigar, construir conocimiento, comunicar procesos y resultados de las investigaciones son indispensables si se requiere influenciar en la edificación de una sociedad que ubica a la vida como eje de cualquier desarrollo, por eso esta Facultad desde hace más de dos décadas publica su revista indexada en perspectiva de que el conocimiento científico llegue a todos los sectores sociales en lenguaje de crecimiento integral.

Bien por una Facultad que sabe interpretar con claridad el reto de la historia que dinamiza el sentido de su misión y visión al servicio del País.



# PRESENTACIÓN



Gladys Navas Miño

Estamos festejando el XXX Aniversario de nuestra querida Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos (FCIAL); han sido 30 años de fructífera labor, por lo tanto no podía faltar la publicación de la Revista Alimentos, Ciencia e Ingeniería 22 (1) 2014, vale la pena recordar que esta publicación apareció en el año 1992 en el mes de Agosto, es importante resaltar que se ha mantenido en el tiempo durante 22 años que corresponde al número del volumen; lo que ha permitido que esté indexada (LATININDEX). Se realizan esfuerzos para lograr incursionar en nuevas bases de datos.

La publicación científica es uno de los últimos pasos de la investigación, previo al debate externo que realiza la comunidad académica, hay que destacar la participación de los docentes e investigadores cuyos artículos fueron aprobados para esta edición. Las revistas científicas periódicas constituyen una de las manifestaciones más representativas del trabajo universitario, como fórmula dinámica y operativa de difundir los avances de los esfuerzos investigativos que se realizan, son muy escasas, por ello continuar con la publicación es un indicativo que se avanza, con grandes limitaciones y dificultades, pero se avanza.

Los estudiantes al interior de una Universidad deben ser el motor fundamental para el cambio y producción de conocimientos nuevos. Es por esto que resulta importante felicitar a los autores de los artículos generados en sus trabajos de graduación y en los proyectos de investigación, ya que el resultado de esta Revista traduce su dedicación, esfuerzo y compromiso, que importante es que transmitan sus experiencias, resultados y revisiones.

En la actualidad una de las tareas importantes inherentes a la naturaleza de la Universidad es la investigación, por ello las revistas científicas deben fortalecerse y aparecer como fruto de un trabajo organizado y motivado por el deseo de contribuir a la investigación científica que perdure en el tiempo. Nuestra revista intenta seguir estos lineamientos, al ser indexada reúne los criterios de calidad básicos, tales como el contenido de la investigación, las características técnicas y formales. Hay mucho que mejorar emulando a publicaciones internacionales con cientos de años de continua participación en el mundo de la ciencia, difundiendo el conocimiento generado y socializando los nuevos hallazgos, innovaciones e invenciones.

Los artículos publicados en esta revista recopilan lo más actual en los trabajos de graduación de las carreras de Ingeniería Bioquímica e Ingeniería de Alimentos que ofrece nuestra FCIAL, incluyendo temas de interés en los Proyectos de investigación desarrollados por los investigadores.

Se agradece al Señor Rector por el apoyo económico brindado y se solicita continúe incentivando este tipo de actividades que permiten incursionar en el mundo de la literatura científica, además es meritorio el hecho de contar con un órgano de difusión científica donde se puede dar a conocer a la comunidad universitaria lo que se puede hacer y se hace al interior de la Facultad de Ciencia e Ingeniería de Alimentos.

Nuestro agradecimiento también al Grupo Editorial integrado por: Miembros externos: Dra. Pamela Jaramillo, Dr. Borja Velásquez, Dr. Ignacio Angós y Dr. Juan Sebastián Ramirez; Miembros internos: Dr. Milton Ramos, Dr. Carlos Rodríguez, quienes forman un equipo que contribuye al quehacer científico que trasciende las fronteras de nuestra universidad y nos acerca con la comunidad académica internacional.

Se augura los mejores días para esta publicación, que la dedicación académica científica de nuestros estudiantes, investigadores, docentes, conduzcan a la escritura de nueva y mejor literatura técnica científica. Se anhela que cada vez existan más artículos técnicos y sobre todo que concurren lectores apasionados que se nutran y valoren el esfuerzo que se realiza para cumplir con este importante requerimiento humano de comunicar su pensamiento y de las Universidades de orientar a la sociedad.

Muchas gracias.

Gladys Cecilia Navas Miño.  
Decana FCIAL.

# CONTROL FÍSICO-QUÍMICO Y MICROBIOLÓGICO EN EL PROCESO DE POTABILIZACIÓN DEL AGUA EN EL CASERÍO EL ROSAL – CANTÓN MOCHA

## PHYSICO-CHEMICAL AND MICROBIOLOGICAL CONTROL IN THE PURIFICATION PROCESS FOR DRINKABLE WATER IN THE VILLAGE OF EL ROSAL – CANTÓN MOCHA

Ramos Juan y Espinoza Verónica

Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.  
Campus Académico Huachi, Av. Los Chasquis y Río Payamino, Tel: 032-400987.  
Ambato – Ecuador. e-mail: juanenriquefcial@hotmail.com; veronicaespinozaj@gmail.com.  
Gobierno Autónomo Descentralizado Municipal del cantón Tisaleo. Unidad de Agua Potable.  
Tel: (593) (3) 275 12 00

### RESUMEN

En la presente investigación se realizó un estudio del estado actual de las etapas del proceso de potabilización de agua en la planta de tratamiento del caserío El Rosal del cantón Mocha, determinándose que el tratamiento actualmente utilizado no cumple con las especificaciones establecidas por la norma INEN 1108:2011 para agua potable. Los resultados de los análisis de las propiedades físicas, químicas y microbiológicas en muestras de agua no tratada y agua tratada indican que el agua de este sector es de baja calidad debido a que no cumple con los parámetros de calidad establecidos para garantizar su utilización, por ende, el consumo del agua en este estado afecta a la salud de los consumidores de dicho sector.

Palabras Claves: Agua, proceso de potabilización, tratamiento, análisis físicos, químicos y microbiológicos.

### SUMMARY

In the present investigation a study was made of the current state of potabilization stages of the water treatment plant in the village of El Rosal canton Mocha, determining that the currently used purification treatment does not meet the specifications set by the standard INEN 1108: 2011 for drinkable water. The results of the analysis of some physical, chemical and microbiological properties of untreated and treated water samples indicated that water in this area is of low quality because it does not meet the established quality parameters ensuring their use, hence, consumption of this water affects the health of consumers in this sector.

Keywords: Water, water treatment process, treatment, physical, chemical and microbiological.

### INTRODUCCIÓN

El agua es imprescindible para el mantenimiento de la vida, mientras que las personas pueden pasar incluso meses sin comer, tan sólo pueden pasar algunos días sin beber agua, es por ello que se debe disponer de un abastecimiento de agua satisfactorio (suficiente, salubre y accesible).

La población cree que el agua de un río o una quebrada por ser transparente, está libre de impurezas. Realmente no es así, al agua para el consumo humano hay que someterla a un proceso de limpieza o potabilización para obtener agua de calidad.

En zonas rurales es muy difícil encontrar agua de buena calidad ya que el agua se encuentra expuesta al ambiente,

siendo afectado por pesticidas usados en la agricultura y por el pastoreo cercano al río.

En la actualidad existen muchas metodologías para potabilizar el agua, pero la premisa fundamental es que se debe asegurar en todo momento la calidad y cantidad suficiente del agua, inclusive durante los periodos con fuertes variaciones en la calidad de agua que aún no ha sido tratada.

Los moradores del caserío El Rosal del cantón Mocha de la provincia de Tungurahua desconocen los riesgos que se pueden presentar en su salud al consumir esta agua y aseguran que el agua de su sector no es potable.

Actualmente en el caserío El Rosal se dispone de una

planta de potabilización. La captación a esta planta es de 2 l/s, procedente del río Mocha – Quero.

La planta de tratamiento de agua de este sector no cuenta con una buena distribución de las etapas del proceso de potabilización, a esto se suma la ausencia de químicos que ayuden a una mejor limpieza del agua y, carece de registros de control de los parámetros físicos, químicos y microbiológicos; todo lo anterior hace que el agua sea de baja calidad, por lo que se exponen los consumidores a contraer afecciones en su salud.

La población consumidora del servicio de agua potable está conformada por 225 familias beneficiadas del agua proveniente de la planta de tratamiento del caserío El Rosal. El resto de población que no hace uso de este recurso básico recoge agua de la lluvia para uso doméstico.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se tomó en cuenta ciertos parámetros que permitieron determinar la presencia de minerales, productos tóxicos y microorganismos que perjudican directamente a la salud del consumidor.

Se aplicaron técnicas y procedimientos experimentales para determinar la presencia de estas sustancias, logrando verificar que el proceso actual de tratamiento de agua potable no es eficiente, por lo tanto se obtiene agua de baja calidad.

Los equipos utilizados para la investigación fueron proporcionados por el Departamento de la Unidad de Agua Potable del Gobierno Autónomo Descentralizado Municipal del cantón Tisaleo con el cual la Universidad Técnica de Ambato mantiene un convenio y fueron los siguientes:

Espectrofotómetro Hach DR 2800, se utilizó para analizar la concentración de hierro, manganeso, calcio, sulfatos, nitritos, nitratos, dureza y cloro libre residual. El procedimiento seguido es el siguiente: se coloca 10 ml de muestra de agua en el envase y se adiciona el reactivo respectivo para el análisis de determinado compuesto. Se deja actuar el tiempo de reacción. Se calibra el equipo para el parámetro a analizar, se coloca el blanco y luego la muestra a analizarse y se toma la lectura.

Turbidímetro de marca Hach DR 2800. El proceso de análisis comprende: Calibrar el equipo con un patrón establecido. Colocar una cantidad suficiente de muestra de agua en un vaso de precipitación y tomar lectura.

pHmetro Hach DR 2800. Para esta determinación se calibra el equipo con soluciones tampón y se determina el pH de la muestra de agua colocada en un vaso de precipitación.

Colorímetro. El color se determina mediante comparación visual de la muestra con discos especiales de cristal de color situados al extremo de tubos metálicos, que contienen a su vez tubos de vidrio de comparación llenos de agua destilada incolora. Se iguala el color de la muestra con el del tubo de agua destilada más el cristal de color calibrado, mirando a través de una superficie blanca y se calibra cada disco hasta que corresponda con el color de la escala platino- cobalto.

Para el análisis microbiológico se utilizó dispositivos de marca Quanti-Tray/2000 de IDEXX, estufa y lámpara de luz Ultra Violeta. El método consta de los siguientes pasos:

Paso 1. Añadir reactivo a la muestra (100 ml).

Paso 2. Verter en Quanti-Tray®/2000

Paso 3. Sellar en sellador Quanti-Tray® y colocar en incubadora por 24 horas.

Paso 4. Leer los resultados Quanti-Tray/2000-:

- Celdas amarillas = coliformes totales

- Celdas amarillas / fluorescentes = coliformes fecales.

Contar el número de celdas positivas y utilizar la tabla de NMP para determinar el Número Más Probable (NMP).

Se recolectó dos muestras diarias de agua en las primeras horas de la mañana. De las dos muestras, una fue de agua sin tratar (agua que aún no ha ingresado al proceso de potabilización). La segunda muestra fue de agua tratada (agua que ya ha sido sometida al proceso de potabilización). Recolectándose un total de 44 muestras, las cuales fueron analizadas y reportadas en su respectiva hoja de resultados.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se analizó cada una de las etapas del proceso de tratamiento actual de potabilización del agua en la planta del caserío El Rosal, ubicado en el cantón Mocha – provincia de Tungurahua. El tratamiento actual de potabilización consta de las siguientes etapas (Fig. 1):

Captación.- El proceso de producción de agua potable inicia con la captación de 2 l/s procedente del río Mocha – Quero. El recorrido del agua cruda a la planta es de 9 km aproximadamente, a través de una tubería que se encuentra acoplada directamente a la planta de tratamiento.

Desarenador.- La planta de tratamiento actualmente cuenta con 6 tanques desarenadores de un metro cuadrado cada uno, los cuales facilitan la limpieza del agua ya que cada tanque cuenta con tablas de madera que ayudan a retener materia orgánica o residuos del agua.

Filtración.- Con la ayuda de una torre de filtrado de material metálico de cinco pisos que facilita la limpieza



del agua de arriba hacia abajo, el proceso de limpieza continúa en dos tanques de filtrado con una profundidad de tres metros, hechos a base de cemento. Dentro de estos tanques de filtrado se cuenta con un metro de granillo y sobre éste un metro de piedra molida, su función principal es capturar la suciedad del agua, estas piedras molidas son limpiadas cada quince días para garantizar su eficiencia en el proceso.

Para ayudar al proceso de limpieza se implementó en la planta dos tanques automatizados de filtrado de novecientos litros de capacidad cada uno.

**Sedimentación.-** El agua resultante de los tanques de filtrado automatizados se conduce a dos tanques de sedimentación en donde se deja reposar varios minutos para capturar lodos o sedimentos que aún estén presentes en el agua.

**Desinfección.-** A continuación el agua es dirigida a un tanque de desinfección. Para la desinfección se utiliza 20 gramos de cloro en polvo, el cual es disuelto en un tanque de 150 litros, esta dosificación servirá para las 24 horas que dure el proceso; esta preparación se repite todos los días. La dosificación de la preparación del cloro se realiza por goteo a razón de una gota por segundo en un tanque reservorio en donde se garantiza la desinfección del agua, dejándola lista para el consumo.

**Almacenamiento del Agua Potable.-** A partir de la desinfección en el tanque de almacenamiento con capacidad de 20000 litros, el agua resultante que es el agua potable se dirigirá a las diferentes redes de distribución para el beneficio de los moradores del sector.

**Consumidores.-** El agua potable es distribuida por las redes existentes hacia las 225 familias que han sido beneficiadas con este servicio.

Cabe recalcar que no todos tienen acceso a este servicio básico por la desconfianza y/o el aporte económico que representa la manutención de la planta de tratamiento de agua potable del caserío El Rosal.

Se realizaron los respectivos análisis físico – químicos y microbiológicos en el laboratorio de análisis de Calidad de la Unidad de Agua Potable del Municipio de Tisaleo, en el cual se consideraron parámetros específicos como color, pH, Turbidez STD, conductividad, calcio, hierro, dureza, sulfatos, nitritos, nitratos cloro libre residual, coliformes totales fecales para determinar la calidad del agua del caserío El Rosal.

Se establecieron valores críticos, mediante los promedios de todos los datos resultantes de la experimentación de cada una de las características de los parámetros físicos, químicos y microbiológicos. A continuación se presentan los valores críticos en la Tabla 1.

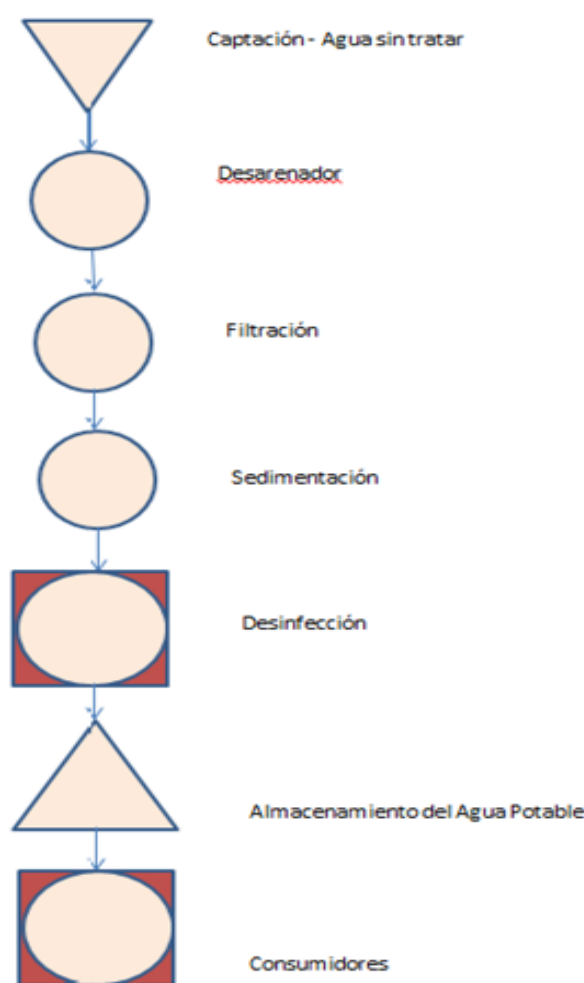


Fig. 1 Diagrama de flujo de la planta de tratamiento del caserío El Rosal

Tabla 1. Valores críticos de las propiedades del agua del caserío El Rosal

Parámetro	Unidad	Valores Críticos		
		Agua sin tratar	Agua tratada	Norma INEN
Turbiedad	NTU	41,6	6,8	5
pH	-	8,13	7,43	6,5 - 8,5
Color	Pt/Co	85	15	15
conductividad	µS/cm	1123	1154	1500
STD mg/L	mg/L	600	578	1000
Calcio, Ca <sup>2+</sup>	mg/L	18,19	16,42	70
Dureza, CaCO <sub>3</sub>	mg/L	48	45	300
Manganeso, Mn <sup>2+</sup>	mg/L	0,78	0,4	0,3
Hierro, Fe <sup>3+</sup>	mg/L	1,32	0,85	0,8
Nitritos, NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	mg/L	0,053	0,027	0
Nitratos, NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	mg/L	12,67	6,64	40
Sulfatos, SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	mg/L	39	19	200
Cloro libre residual, Cl <sub>2</sub> <sup>-</sup>	mg/L	0	0,4	0,3 - 1,0
Coliformes Totales	NMP/100 ml	2419,2	214	0,001
Coliformes Fecales	NMP/100 ml	279,4	55	0,001

Elaborado por: Verónica Narciza Espinoza Jarrín. 2013

## CONCLUSIONES

Se analizó cada una de las etapas del proceso del tratamiento actual de potabilización del agua de la planta del caserío El Rosal, de este análisis se encontró un déficit en la etapa de filtrado debido a la ausencia de limpieza en la torre de filtrado, que dificulta la limpieza del agua. Asimismo, los tanques sedimentadores no realizan un óptimo tratamiento de limpieza de la materia orgánica que se encuentran en el agua.

Estos dos procesos deficientes hacen que el agua sea de baja calidad y perjudique a la salud de los consumidores.

Se determinó la calidad del agua mediante análisis de los parámetros físicos, químicos y microbiológicos antes y después del proceso de potabilización mediante la aplicación de registros de control en donde se logró obtener datos experimentales reflejando resultados alarmantes ya que no se cumple con la norma INEN 1108:2011 para agua potable actualmente establecida.

Se realizó una comparación de resultados obteniéndose valores críticos en los parámetros de calidad, por lo que los parámetros como la turbidez, color, magnesio, hierro, coliformes totales y fecales, presentaron valores alarmantes después de la potabilización. Confirmándose que el proceso que se lleva a cabo en la planta del caserío El Rosal no es eficiente y está afectando la salud de los consumidores del sector.

Los miembros de la Junta de Agua Potable aseguran no tener apoyo económico por parte de las autoridades competentes, por lo que será difícil implementar controles continuos en el proceso de potabilización y poder garantizar la calidad del mismo y a su vez el bienestar de los usuarios.

## RECOMENDACIONES

Se recomienda a los miembros de la Junta de Agua Potable del caserío El Rosal y a la Municipalidad del cantón Mocha reestructurar las etapas del proceso de potabilización de la planta de tratamiento del caserío El Rosal para hacer de éste un proceso más eficiente y además mejorar los métodos de limpieza de cada una de las etapas de la planta de tratamiento de agua potable del caserío.

- Se recomienda a los miembros de la Junta de Agua Potable, la implementación de registros de control de los parámetros físicos, químicos y microbiológicos en la planta de tratamiento existente para garantizar la calidad del agua tomando en cuenta las Normas INEN 1108:2011 para agua potable al momento de elaborar las actividades programadas para garantizar el correcto funcionamiento del sistema, descartando defectos de operación y mantenimiento.

## BIBLIOGRAFÍA

- APHA, AWWA, WEF (2005). Standard methods for Examination of water and Wastewater, 21era edición, Washington D.C.
- Arboleda, J. (2000). Teoría y Práctica de la Purificación del Agua. Tercera Edición, McGraw Hill- Acodal, Bogotá, págs. 4-24.
- Aristizabal, H., Galvis A. (2004). Artículo: Análisis de costos en sistemas de Potabilización de Agua, Universidad del Valle, Cali – Colombia.
- Babbitt, H. y Bauman, E. (1961). Alcantarillado y Abastecimiento de aguas negras. Editorial Oikos-tao, Barcelona – España.
- Baque, M. (2001). Diseño de un sistema de floculación de paletas giratorias para una Planta de Potabilización de Agua, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Guayaquil – Ecuador, págs. 5-19.
- Espinoza, A. (2011). Tesis: Diseño de una Planta Móvil de Potabilización de Agua, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Guayaquil – Ecuador.
- Manobanda, D. (2011). Tesis: Las aguas servidas y pluviales y su influencia en la calidad de vida de los habitantes del caserío San Carlos del cantón Mocha provincia del Tungurahua. Universidad Técnica de Ambato. Ambato – Ecuador.
- NTE INEN 1108 (Norma Técnica Ecuatoriana) (2006). Agua Potable Requisitos. Instituto Ecuatoriano de Normalización. Quito - Ecuador.
- Pourrut, P., (1995). Estudios de Geografía: El Agua en el Ecuador, págs. 21-26. Vol. 7.
- Romero, M., (2011). Boletín electrónica No. 08: Tratamientos utilizados en potabilización de agua. Facultad de Ingeniería - Universidad Rafael Landívar. Guatemala.
- Ballina, F., (2004). Paradigmas y perspectivas teórico-metodológicas en el estudio de la administración. Disponible en: <http://www.uv.mx/iiesca/revista/documents/paradigmas2004-2.pdf>.
- NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES. El Agua Potable segura es Esencial. Disponible en: <http://www.drinking-water.org/html/es/Treatment/Chemical-Disinfection-Oxidants-technologies.html#tech0>.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. (2004). Guías para la Calidad del Agua Potable, Ginebra, Tercera Edición, vol. 1. Disponible en: [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/gdwq3sp.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3sp.pdf).
- ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. (2007). Guía para la Vigilancia y Control de la Calidad del Agua en Situaciones de Emergencia y Desastre, Ecuador. Disponible en: <http://www.paho.org/Spanish/DD/PED/VigilanciaCalidadAgua.pdf>.
- PORTAL EDUCATIVO DE AMÉRICA. Filtros de Agua. Puerto. Disponible en: <http://www.salonhogar.com/ciencias/naturaleza/elagua/filtrosdeagua.htm>.
- Romero, M. Tratamientos Utilizados en Potabilización de Agua, Guatemala. Disponible en: [http://www.tec.url.edu.gt/boletin/URL\\_08\\_ING02.pdf](http://www.tec.url.edu.gt/boletin/URL_08_ING02.pdf).
- WATER TREATMENT SOLUTIONS. Desinfección del Agua, Holanda. Disponible en: <http://www.lenntech.com/espanol/Desinfeccion-del-agua/Que-es-desinfeccion.htm>.

# **DETERMINACIÓN DE LA INFLUENCIA DE LAS ZONAS DE PRODUCCIÓN SOBRE EL CONTENIDO DE COMPONENTES BIOACTIVOS Y LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE CINCO FRUTAS ANDINAS.**

## **DETERMINATION OF THE INFLUENCE OF PRODUCTION ZONES ON THE CONTENT OF BIOACTIVE COMPONENTS AND ANTIOXIDANT CAPACITY OF FIVE ANDEAN FRUITS.**

Poveda Cristina, Robalino Dolores & Espín Susana

Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos  
Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias.  
Departamento de Nutrición y Calidad. criss\_893@hotmail.com

### **RESUMEN**

La capacidad antioxidante y los compuestos bioactivos en la actualidad son de gran importancia en el campo industrial y alimentario, debido a sus múltiples beneficios en la salud humana, tanto en la prevención de enfermedades cardiovasculares y ciertos tipos de cáncer; considerándose el estudio de estos componentes naturales existentes especialmente en las frutas. Dentro de este estudio se muestrearon cinco frutas provenientes de dos zonas de producción cada una, las cuales fueron: Tomate de Árbol (*Solanum betaceum* Cav), Mora (*Rubus glaucus* Benth), Naranja (*Solanum Quitoense* Lam.), Uvilla (*Physalis peruviana* L.) y Ciruela (*Spondias purpurea*). Los análisis de carotenoides, vitamina C, polifenoles, flavonoides, antocianinas y capacidad antioxidante por el método ORAC se realizaron en los laboratorios del Departamento de Nutrición y Calidad (INIAP), encontrándose que el contenido de componentes bioactivos y la capacidad antioxidante, varía según el tipo de fruta; los valores encontrados fluctúan entre:  $109,16 \pm 50,47 - 5085,58 \pm 460,49$  mg ac. gálico /100 g muestra liofilizada para polifenoles totales,  $17,56 \pm 0,69 - 53,00 \pm 2,49$  mg ac. ascórbico / 100 g muestra fresca para vitamina C,  $9,03 \pm 1,72 - 61,03 \pm 9,46$  ug/g muestra liofilizada,  $17,58 \pm 0,93 - 125,16 \pm 17,48$  mg quercetina /100g muestra liofilizada para flavonoides,  $23,04 \pm 4,58 - 527,51 \pm 65,21$  umol Trolox/g muestra liofilizada para capacidad antioxidante y para el caso de antocianinas se encontró solo en mora de la zona 1 y 2 con valores de  $1694,89 \pm 87,44 - 1388,03 \pm 213,21$  mg/100g muestra liofilizada, respectivamente.

Palabras clave: método ORAC, antioxidante, componentes bioactivos

### **SUMMARY**

The antioxidant capacity and bioactive compounds are currently of great importance in the industrial and food sector, due to its many benefits on human health, both in preventing cardiovascular disease and certain cancers, considering the study of these components natural existing especially in fruits. In this study five fruits from two production zones each, which were sampled: Tree Tomato (*Solanum betaceum* Cav), Blackberry (*Rubus glaucus* Benth), Lulo (*Solanum quitoense* Lam) Uvilla (*Physalis peruviana* L.) and Plum (*Spondias purpurea*). The analysis of carotenoids, vitamin C, polyphenols, flavonoids, anthocyanins and antioxidant capacity by ORAC method were performed in the laboratories of the Department of Nutrition and Quality (INIAP), finding that the content of bioactive compounds and antioxidant capacity varies type of fruit, the values found range from:  $109.16 \pm 50.47$  to  $5085.58 \pm 460.49$  mg ac. gallic / 100 g lyophilized sample for total polyphenols,  $17.56 \pm 0.69$  to  $53.00 \pm 2.49$  mg ac. ascorbic acid / 100 g fresh sample for vitamin C,  $9.03 \pm 1.72$  to  $61.03 \pm 9.46$  ug / g lyophilized sample,  $17.58 \pm 0.93$  to  $125.16 \pm 17.48$  mg quercetin / 100g lyophilized sample for flavonoids,  $23.04 \pm 4.58$  to  $527.51 \pm 65.21$  umol Trolox / g lyophilized sample for antioxidant capacity and in the case of anthocyanin was found only in default of zone 1 and 2 with values of  $1694,89 \pm 87.44$  to  $1388.03 \pm 213.21$  mg/100g lyophilized sample, respectively.

Keywords: assay ORAC, antioxidants, bioactive components

## INTRODUCCIÓN

La región andina se caracteriza por tener una alta biodiversidad que resulta de la variedad de ecosistemas dada su ubicación geográfica. Diferentes estudios, han confirmado los beneficios para la salud que aporta la ingesta de frutas y verduras ricas en antioxidantes, principalmente en la reducción y prevención de enfermedades cardiovasculares, enfermedades como el cáncer, artritis, etc. (Cerón, 2010).

Estos beneficios han estimulado las investigaciones sobre la capacidad antioxidante de frutas y verduras. Orientándolas principalmente a la caracterización de diferentes tipos de frutas y su contenido de componentes antioxidantes específicos, con el fin de incrementar el valor nutricional general de las mismas (Pérez, 2009). Las frutas y vegetales contienen nutrientes que junto con las vitaminas C, E y carotenoides potencializan la actividad antioxidante. Sustancias fenólicas como los flavonoides son los componentes más comunes en frutas y vegetales que tienen una fuerte capacidad antioxidante (Cerón, 2010). Entre diferentes frutas, genotipos y cultivos, existe una marcada diferencia en cantidades y tipos de antioxidantes, las frutas estudiadas en esta investigación son: Tomate de Árbol (*Solanum betaceum* Cav), Mora (*Rubus glaucus* Benth), Naranjilla (*Solanum Quitoense* Lam.), Uvilla (*Physalis peruviana* L.) y Ciruela (*Spondias purpurea*).

## MATERIALES Y MÉTODO

### Preparación de la materia prima

Se realizó la caracterización física y química de las frutas en los laboratorios del Departamento de Nutrición y Calidad de la Estación Experimental Santa Catalina.

Las muestras de las frutas recolectadas se codificaron y registraron en el laboratorio. Una vez en el laboratorio se realizó la selección y eliminación manual de impurezas que vienen junto con la frutas. Se realizó a las muestras tres lavados consecutivos con agua destilada y se secaron al ambiente. Se separó la pulpa de las semillas y cáscara, se usó una licuadora o triturador de alimentos para lograr este fin cuando sea necesario (tomate de árbol, mora, naranjilla y uvilla) o se realizó el proceso manualmente (ciruela). Una vez obtenida la pulpa de cada fruta se procedió inmediatamente a congelarla con nitrógeno líquido y se llevó al proceso de liofilización y posterior molienda; la preparación de la muestra se realiza de acuerdo a los requerimientos específicos para cada uno de los análisis como son antocianinas, polifenoles, carotenoides y capacidad antioxidante. La determinación de vitamina C se realizó en muestra fresca.

### Determinación de antocianinas totales

Para la determinación de antocianinas se utilizó el método descrito por Sze & Oey 2012 y Rapisarda; Fanello & Maccarone, 2000, para el cual se pesó 0,25 g. de

muestra liofilizada, en vasos de precipitación, se adicionó 10 ml de buffer y se agitó por una hora sobre una placa agitadora, luego centrifugamos por 30 min a 4000 rpm, se filtró a través de papel filtro y se midió la absorbancia, frente al buffer a 510 y 700 nm. Realizar el mismo procedimiento con cada buffer pH 1,0 y 4,5.

### Determinación de polifenoles

La determinación del contenido de polifenoles totales se realizó mediante una reacción colorimétrica con el reactivo de Folin & Ciocalteu descrito por Gerogé, Brat, Alter, & Amiot, 2005; para esto pesamos entre 0,3 g a un 1 g de muestra liofilizada, en viales con tapa, se adicionó 10 ml de la mezcla acetona/agua, agitamos por 45 minutos en una placa agitadora y se centrifugó por 10 min a 3500 rpm y/o filtró a través de papel filtro. El filtrado se recogió en viales con tapa (extracto bruto y se obtiene las fracciones A y B).

### Determinación de los componentes solubles totales en agua (Fracción A)

Se tomó 25  $\mu$ l, 50  $\mu$ l ó 75  $\mu$ l del extracto bruto, se adicionó 475  $\mu$ l, 450  $\mu$ l ó 425  $\mu$ l de metanol según el tipo de fruta y medir utilizando el método de Folin a 760 nm.

### Separación de polifenoles y compuestos solubles en agua (Fracción B)

Tomar 500  $\mu$ l del extracto bruto, se adicionó 3,5 ml de agua. Se colocó 2 ml de esta solución en un cartucho OASIS previamente acondicionado (3 ml de metanol + 2 veces con 3 ml de agua), se lavó por 2 veces con 2 ml de agua y se tomó 500  $\mu$ l del extracto lavado (Fracción C) y medir utilizando el método de Folin a 760 nm.

NOTA: Después de cada análisis, lavar los cartuchos OASIS con: 3 ml de metanol puro por 4 veces. Lavar por 2 veces con 2 ml de agua destilada.

### Determinación de vitamina C

En esta determinación se utilizó el método reflectométrico de la MERCK para lo cual se pesó 30 g de muestra fresca y se llevó a un volumen conocido (200 ml) con agua destilada. Se calibró el equipo, con la curva de calibración que viene con las tirillas. Se tomó una tirilla analítica del tubo, se presionó la tecla STAR del Reflectómetro y se introdujo de forma absolutamente simultánea la tirilla analítica con ambas zonas de reacción durante aproximadamente 2 segundos en la muestra. Se eliminó el exceso de líquido de la tirilla, sacudiéndola manualmente. Cuando suena la señal acústica (5 segundos antes de transcurrir el tiempo de reacción) la tirilla ya deber estar introducida con la zona de reacción en dirección a la pantalla hasta el tope en el adaptador de tirillas, después de transcurrido el tiempo de reacción, leer en la pantalla el valor de medición en mg/l de ácido ascórbico. El valor se almacena automáticamente.

### Determinación de carotenoides

Para la determinación de carotenoides se utilizó el método descrito por Sze & Oey 2012, en este pesamos de 0,6 - 1 g de muestra liofilizada en un Erlenmeyer protegido de la luz, se adicionó 50 ml de la solución de extracción (50% Hexano, 25% Etanol, 25% Acetona y 0,1% de BHT (v/v)), se añadió 5 g de CaCl<sub>2</sub> y agitó la mezcla por 20 min a 4 °C, se agregó 15 ml de agua y agitó por 10 min a 4 °C, la mezcla se colocó en un embudo de separación, esperar hasta que se separe la fase acuosa y la fase orgánica, la fase orgánica se aforó a 50 ml con hexano y se midió la absorbancia a 450 nm  
NOTA: Para evitar la degradación de los carotenoides se debe trabajar en un cuarto oscuro y protegido de la luz.

#### **Determinación de flavonoides**

Para la determinación flavonoides se utilizó el método descrito por Huang, Chang & Shao, 2006. En el cual para la extracción de la muestra se pesó de 0,1 a 1 g de muestra liofilizada, se disolvió con 10 ml de metanol al 80%, se agitó por 10 min a 45 °C a 150 rpm y centrifugamos a 3000 rpm por 10 min. El sobrenadante es recolectado en un balón de 25 ml, el precipitado se extrajo con 5 ml de metanol al 80% por dos veces (repetir los pasos anteriores), los sobrenadantes fueron combinados y aforados a 25 ml con metanol al 80% y se procedió con el método el cual consiste en tomar una alícuota de cada una de las muestras 0,5 ml, se agregó 1,5 ml de metanol al 95%, 0.1 ml de cloruro de aluminio al 10%, 0,1 ml de acetato de potasio 1M y 2,8 ml de agua destilada, se incubó a temperatura ambiente por 30 min (obscuridad) y se midió a 415 nm.

#### **Determinación de capacidad antioxidante (ORAC)**

La capacidad antioxidante fue determinada mediante el método ORAC descrita por el CITA, 2010. En el cual se pesó en un frasco ámbar de 30 ml de 0,5 a 1,0 g de muestra liofilizada, se agregó a cada frasco ámbar 15 ml de acetona al 70%, coloque una pastilla magnética, tape el frasco, se agitó durante 10 min en el agitador magnético y luego en el baño ultrasónico durante 10min. Agitamos 10 min más en el agitador magnético, se dejó 5 min en reposo y trasvasó el sobrenadante con ayuda de una varilla agitadora a un tubo Falcon de 15 ml, luego centrifugamos a 3700 rpm por 5 minutos. Se repiten las extracciones por dos veces y la tercera extracción del sólido obtenido en la segunda extracción con 10 ml. Si se trata de mora liofilizada, hacer la extracción inicial con 10 ml de acetona 70% y continúe con los siguientes pasos. Se recolectó los sobrenadantes de cada extracción en un balón de 250 ml cubierto con papel aluminio, se colocó el balón de 250 ml en el rotavapor (en un baño de agua a 40°C) y eliminar la acetona (partiendo de 40 ml de extracto, como la acetona tiene una concentración de 70%, al evaporar la acetona se espera un volumen final de 12 ml). Quitamos el balón del rotavapor y trasvasamos cuantitativamente el líquido a una jeringa de 10ml con un filtro de 0,45 µm acoplado

en el extremo de la jeringa. Colocamos el émbolo de la jeringa con cuidado, presionamos el émbolo y recogemos el filtrado en un balón aforado de 25 ml. Se lavó el balón con 5 ml de agua ultrapura y trasvasó el lavado a la jeringa. Se filtró y luego, aforó el balón con agua ultrapura, se trasvasó el filtrado (extracto acuoso) a una botella ámbar y se guardó en el refrigerador hasta hacer las diluciones.

Para la preparación de la placa se realizó lo siguiente: se preparó la placa con 215 µL de agua ultrapura en los pocillos. Se colocó 25 µL de cada una de las soluciones patrón. Se colocó 25 µL de la dilución escogida para cada una de las frutas, posteriormente colocamos la placa en el soporte de placas del espectrofluorómetro e inicie el análisis. El equipo va agregar 150 µL de la fluoresceína automáticamente, espera 30 min para calentar y estabilizar la temperatura interna, después, agrega 25 µL de la solución de AAPH automáticamente. Luego agita la placa (15s) y mide la intensidad de fluoresceína cada minuto en cada pozo de la placa por 45 min. Cuando el análisis termina, se abre el compartimiento de la placa. Se lavó la placa, retiró las botellas con las soluciones, se lavó los inyectores por cuatro veces con 5000 µl de agua ultrapura cada inyector, se apagó la lámpara y el sistema de calentamiento interno del equipo.

#### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos para el contenido de capacidad antioxidante y componentes bioactivos.

Como se puede observar en la tabla 1, el contenido de compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante, varía según el tipo de fruta; los valores encontrados fluctúan entre: 109,16 ± 50,47 - 5085,58 ± 460,49 mg ac. gálico/100 g muestra liofilizada para polifenoles totales, 17,56 ± 0,69 - 53,00 ± 2,49 mg ac. ascórbico / 100 g muestra fresca para vitamina C, 9,03 ± 1,72 - 61,03 ± 9,46 µg/g muestra liofilizada, 17,58 ± 0,93 - 125,16 ± 17,48 mg quercetina /100g muestra liofilizada para flavonoides, 23,04 ± 4,58 - 527,51 ± 65,21 µmol Trolox/g muestra liofilizada para capacidad antioxidante y para el caso de antocianinas se encontró solo en mora de la zona 1 y 2 con valores de 1694,89 ± 87,44 - 1388,03 ± 213,21 mg/100g muestra liofilizada respectivamente.

Según análisis realizados en el CITA, 2010 los valores obtenidos de capacidad antioxidante para mora, tomate de árbol, naranjilla y uvilla son de 455,23 µmol Trolox/g muestra liofilizada, 106,4 µmol Trolox/g muestra liofilizada, 248,66 µmol Trolox/g muestra liofilizada, 35,9 µmol Trolox/g muestra liofilizada respectivamente, los cuales son valores comparativos con los obtenidos en los análisis realizados en este trabajo de investigación.

Para carotenoides, polifenoles y antocianinas los resultados expresados por Mertz, 2009 en muestra liofilizada para polifenoles y en fresco para antocianinas y capa-

Tabla 1. contenido total de polifenoles, vitamina c, carotenoides, antocianinas, flavonoides y capacidad antioxidante de cinco frutas andinas (media  $\pm$  desviación estándar).

Tratamientos	Polifenoles (mg ac. Gálico/100 g muestra liofilizada)	Vitamina C (mg/100 g ac. ascórbico)	Carotenoides (ug/g muestra liofilizada)	Antocianinas (mg/100g muestra liofilizada)	Flavonoides (mg Quercetina /100g muestra liofilizada)	Ensayo ORAC
						Capacidad antioxidante (umol Trolox/g muestra liofilizada)
Tomate de árbol (Pelileo)	343,16 $\pm$ 116,59	27,33 $\pm$ 4,57	61,03 $\pm$ 9,46	ND	35,49 $\pm$ 3,92	73,30 $\pm$ 5,26
Tomate de árbol (Chaltura)	357,20 $\pm$ 69,60	19,89 $\pm$ 2,08	51,40 $\pm$ 9,31	ND	22,18 $\pm$ 1,23	50,86 $\pm$ 5,05
Mora (Ambato)	4789,20 $\pm$ 840,76	25,24 $\pm$ 1,75	9,03 $\pm$ 1,72	1694,89 $\pm$ 87,44	125,16 $\pm$ 17,48	527,51 $\pm$ 65,21
Mora (Guaranda)	5085,58 $\pm$ 460,49	29,13 $\pm$ 4,71	11,07 $\pm$ 0,90	1388,03 $\pm$ 213,21	108,70 $\pm$ 8,72	490,87 $\pm$ 61,63
Uvilla (Píllaro)	813,80 $\pm$ 164,42	53,00 $\pm$ 2,49	37,31 $\pm$ 11,20	ND	19,53 $\pm$ 1,32	31,13 $\pm$ 4,58
Uvilla (Mejía)	109,16 $\pm$ 50,47	30,44 $\pm$ 1,50	24,73 $\pm$ 6,98	ND	17,58 $\pm$ 0,93	23,04 $\pm$ 4,58
Ciruella (Petrillo)	460,03 $\pm$ 99,12	42,67 $\pm$ 1,74	22,63 $\pm$ 4,22	ND	37,38 $\pm$ 2,04	31,70 $\pm$ 4,72
Ciruella ( Juntas de Pacífico)	414,34 $\pm$ 82,87	36,11 $\pm$ 2,96	23,94 $\pm$ 3,37	ND	38,70 $\pm$ 4,63	24,62 $\pm$ 4,15
Naranja (Archidona)	816,48 $\pm$ 115,77	31,56 $\pm$ 9,73	47,27 $\pm$ 1,19	ND	36,40 $\pm$ 2,23	124,84 $\pm$ 7,97
Naranja (El Reventador)	603,12 $\pm$ 73,00	17,56 $\pm$ 0,69	25,75 $\pm$ 3,57	ND	33,17 $\pm$ 1,96	62,96 $\pm$ 4,69

Elaborado por: Cristina Poveda, 2014

capacidad antioxidante son valores comparables con los obtenidos en este trabajo para el caso de mora, tomate de árbol y naranja los valores reportados son de 6300 mg/100 g muestra liofilizada para mora; 650 mg/100 g muestra liofilizada para naranja y 308-570 mg/100 g muestra liofilizada para el tomate de árbol.

De igual manera se ha identificado que las zonas de producción ejercen influencias sobre la composición química de las frutas a pesar de que tienen el mismo manejo agronómico y son de la misma variedad, pero como se observa en la tabla la ubicación geográfica tiene una relación directa con el contenido de los compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante existente en cada una de las frutas.

#### Análisis de correlación

En este estudio se utilizó el coeficiente de correlación con la finalidad de determinar si existen relaciones directas o indirectas entre los componentes bioactivos y la capacidad antioxidante, como un primer acercamiento para evaluar sus efectos biológicos. En el cual se ha encontrado que la uvilla y naranja tienen una relación directa entre componentes bioactivos y capacidad antioxidante de las dos zonas de producción. Pero para el caso de la mora, tomate y ciruela no existe una buena correlación entre la capacidad antioxidante y el contenido de compuestos bioactivos.

De igual manera para los análisis de relación entre los factores climáticos y el contenido de componentes bioactivos y capacidad antioxidante dio como resultado que la mayoría de correlaciones determina que los

factores climáticos: temperatura, altitud, precipitación anual y humedad relativa tiene una relación directa con el contenido de los compuestos bioactivos y capacidad antioxidante dependiendo de la fruta y el compuesto antioxidante.

#### CONCLUSIONES

Se determinó la influencia de las zonas de producción sobre el contenido de compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante de cinco frutas andinas como son: mora, uvilla, tomate de árbol, naranja y ciruela. Para este trabajo se realizó muestreos en dos zonas de producción, con el mismo manejo agronómico y de la misma variedad para cada una de las frutas. Después de realizar los análisis para la determinación de los compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante se determinó que la mora tiene el mayor contenido de estos compuestos seguida de la naranja y tomate de árbol, la uvilla y ciruela son similares en cuanto a la cantidad de compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante. Además se determinó que entre zonas de producción existe diferencia en el contenido de los compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante. Entre las zonas consideradas, las frutas con mayor capacidad antioxidante fueron: mora de Ambato, uvilla de Píllaro, naranja de Archidona, tomate de árbol de Pelileo y ciruela de Petrillo.

Se correlacionó el contenido de compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante con las zonas de producción obteniendo que existe una buena relación entre el contenido de componentes bioactivos, capacidad antioxidante y cada uno de los factores climáticos pertene-

cientes a cada zona estudiada.

Se estableció la relación entre los compuestos bioactivos, capacidad antioxidante y factores ambientales de cada zona, para lo cual se realizó correlaciones de Pearson que nos indicó que para cada fruta existen factores ambientales que influyen directamente y en forma particular sobre sus componentes bioactivos y capacidad antioxidante.

Se identificó el mejor compuesto bioactivo y la fruta con las mejores propiedades antioxidantes con los análisis realizados. La mora es una de la mejores frutas pero vale recalcar que las otra fruta también tienen un contenido de capacidad antioxidante notorio, lo cual permite escoger cualquiera de ellas para realizar la identificación individual de los compuestos bioactivos para la incorporación al nuevo alimento funcional ya que en este trabajo se determinó los compuestos bioactivos totales. Los compuestos bioactivos en mayor cantidad son los polifenoles y flavonoides ya que están presentes en gran cantidad en la mayoría de frutas.

#### REFERENCIAS

- Cerón, I., Higuera, J., & Cardona, C. (2010). Capacidad antioxidante y contenido fenólico total de tres frutas cultivadas en la región andina. *Vector* 5, 17-26 pp.
- CITA. (2010). Determinación de la actividad antioxidante. Método ORAC, AQCITA-M037 con espectrofluorómetro Bioteck. Costa Rica.
- Dhuique-Mayer, C., Caris-Veyrat, C., Ollitrault, P., Curk, F., & Amiot, M. (2005). Varietal and Interspecific Influence on Micronutrient Contents in Citrus from the Mediterranean Area. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (6), 2140-2145 pp.
- Gerogé, S., Brat, P., Alter, P., & Amiot, M. (2005). Rapid Determination of Polyphenols and Vitamin C in Plant-Derived Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1370-1373 pp.
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 53, 1841-1856 pp.
- Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J., & Prior, R. (2002). High-Throughput Assay of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) Using a Multichannel Liquid Handling System Coupled with a Microplate Fluorescence Reader in 96-Well Format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(16), 4437-4444 pp.
- Huang, Y., Chang, Y., & Shao, Y. (2006). Effects of genotype and treatment on the antioxidant activity of sweet potato in Taiwan. *Food Chemistry*, 98(3), 529.
- Merck. (2003). Test de ácido ascórbico, método reflectométrico con tiras de ensayo 25/450 mg/L. Darmstadt, AL.
- Mertz, C., Gancel, A., Gunata, Z., Alter, P., Dhuique-Mayer, C., Vaillant, F., y otros. (2009). Phenolic compounds, carotenoids and antioxidant activity of three tropical fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22, 381-387 pp.
- Pérez, A. M. (2009). Los productos derivados de frutas: Fuentes de antioxidantes. Costa Rica: Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos.
- Pérez, A. M. (2009). Los productos derivados de frutas: Fuentes de antioxidantes. Costa Rica: Investigadora CITA-UCR Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA).
- Rapidasarda, P., Fanella, F., & Maccarone, E. (2000). Reliability of Analytical Methods for Determining Anthocyanina in Blood Orange Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2249-2252 pp.
- Sze, Y. L., & Oey, I. (2012). Effects of processing on anthocyanins, carotenoids and vitamin C in summer fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 48, 1577-1587 pp.
- Vasco, C., Ruales, J., & Afaf, K. E. (2008). Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food Chemistry*, 111, 816-823 pp.
- Zuleta, A., Esteve, M., & Frígola, A. (2009). ORAC y TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry*, 114, 310-316 pp.

# **EVALUACIÓN DE LA INCIDENCIA DE LA APLICACIÓN FOLIAR DE UN BIOFERTILIZANTE ELABORADO A BASE DE FRUTAS EN EL NIVEL DE CLOROFILA a Y b Y EN LA CALIDAD DEL FOLLAJE DE TOMATE RIÑÓN (*Solanum lycopersicum L.*), FRESA (*Fragaria vesca*), Y ROSAS (*Rosae sp.*).**

## **IMPACT OF LEAF TREATMENT WITH BIOFERTILIZERS BASED ON FRUITS IN THE LEVEL OF a AND b CHLOROPHYLL, AND FOLIAGE QUALITY IN KIDNEY TOMATO (*Solanum lycopersicum L.*), STRAWBERRY (*Fragaria vesca*), AND ROSES (*Rosae sp.*)**

ANDREA QUINDE Y LILIANA ACURIO

Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos. Carrera de Ingeniería Bioquímica. Universidad Técnica de Ambato. Av. Los Chasquis y Rio Payamino. Ambato, Ecuador.

### **RESUMEN**

Se evaluó la influencia de la aplicación de un fertilizante biológico a base de frutas en el incremento de clorofila a y b, y la calidad obtenida en el follaje de tres especies vegetales: tomate riñón (*Solanum lycopersicum L.*), fresa (*Fragaria vesca*), y rosas (*Rosae sp.*). Se evaluaron seis formulaciones distintas. Tres formulaciones contenían papaya, babaco, banano, melón, y naranja en un 10% cada una y un 50% de melaza fermentándose una durante 7 días, otra 14 días y otra 21 días, las otras tres formulaciones contenían papaya, babaco, banano, melón, y naranja en un 9.5% cada una, un 50% de melaza y 1.25% de toronjil y manzanilla, que son hierbas medicinales, fermentándose también una durante 7 días, otra 14 días y otra 21 días. La concentración de cada formulación era de 4 mL/L de agua. La aplicación se hizo desde el día diez después de la plantación hasta el día 36 de su desarrollo, cada 7 días. En cada aplicación cada planta recibió aproximadamente 110 mL de solución del biofertilizante. Los resultados mostraron que la mejor formulación fue la elaborada a base de frutas sin hierbas medicinales y fermentada durante 14 días. Las especies vegetales mostraron un incremento significativo en los niveles de clorofila a y b, además de mejorar porcentualmente otros parámetros como el tamaño del tallo, longitud, anchura, y color de las hojas, y la reducción de defectos con respecto a los testigos, logrando una mejor calidad de follaje.

Palabras clave: biofertilizante, frutas, clorofila, foliar.

### **ABSTRACT**

The influence of the application of biological fertilizers based on fruits were evaluated in the increase of a and b chlorophyll, and the quality obtained in the foliage of three plant species: kidney tomato (*Solanum lycopersicum L.*), strawberry (*Fragaria vesca*), and roses (*Rosae sp.*). Six different formulations were evaluated: Three formulations were constituted by papaya, babaco, banana, melon, and orange 10% each and 50% molasses. The first was fermented for 7 days, the second 14 days and the third 21 days; the other three formulations were constituted by papaya, babaco, bananas, melon, and orange, 9.5% each, 50% molasses and 1.25% lemon balm and chamomile, which are medicinal herbs. They were also fermented the first for 7 days, the second 14 days and the another 21 days. The concentration of each formulation was 4 mL/L of water. The treatments started at the tenth day after planting until day 36 of development, and it was done every 7 days. In each treatment each plant received about 110 mL of biofertilizer. The best results were obtained with the formulation prepared from fruits without herbs and fermented for 14 days. Plant species showed a significant increase in the levels of a and b chlorophyll, and improved other parameters such as stem size, length, width, and color of the leaves, and defect reduction, achieving a better quality of foliage.

Key words: bio-fertilizer, fruits, chlorophyll, leaf.



## INTRODUCCIÓN

Los biofertilizantes son aquellos que provienen de organismos vegetales, animales, microorganismos y de sus residuales como desechos de alimentos, restos de cultivos que se obtienen de la degradación y mineralización de materiales orgánicos (estiércol, desechos de la cocina, pastos y residuos de cosechas, incorporados al suelo en estado verde, etc.) que se utilizan en suelos agrícolas con el propósito de activar e incrementar la actividad microbiana de la tierra o la mejora del crecimiento de las plantas (Álvarez, 2011). Un tipo de biofertilizantes son los foliares que son de consistencia líquida, preparados con una base de melaza que se aplican al follaje de los cultivos, aportan nutrientes a las plantas como nitrógeno amoniacal, hormonas, vitaminas, aminoácidos, actúan como fitoreguladores y además aumentan la población de microorganismos en el suelo y en la planta misma (Eibner, 1996). El biofertilizante a base de frutas es un abono de elaboración artesanal que resulta de la fermentación aeróbica o anaeróbica de frutas y melaza, pudiendo también agregarse algunas hierbas conocidas por sus riqueza nutritiva o principios activos capaces de alimentar a las plantas o protegerlas del ataque de plagas. Este abono de frutas, se puede utilizar tanto para la producción de frutas, hortalizas, granos, raíces, tubérculos y cultivos tales como café, cacao y plantas ornamentales (Suquilanda, 2003).

La fertilización foliar complementa a la fertilización realizada al suelo, o bien, para corregir deficiencias específicas en el mismo período de desarrollo del cultivo. La eficiencia de la fertilización foliar es superior a la de la fertilización al suelo, la principal ventaja es que la dilución aplicada a las hojas es absorbida en una elevada proporción, no inferior al 90%; por el contrario los fertilizantes aplicados al suelo se pierden en un 50% o más, por diferentes motivos, la aplicación continua no solo incrementa la producción, sino que, no altera el medio ambiente, siendo la práctica agronómica más promisoría para el siglo XXI (Ramírez, 2000).

Las investigaciones realizadas en el país con respecto a la aplicación de biofertilizantes al

follaje de las plantas, han tenido como resultado la mejora en varios aspectos de la calidad en toda clase de cultivos (Venegas, 2008). Tanto el manejo integrado de un cultivo como el seguimiento de buenas prácticas agrícolas, son elementos fundamentales para que un agricultor logre certificar su cultivo y colocarlo en la cadena de comercialización por ser inocuo para la salud humana (Mendoza, 2004).

## METODOLOGÍA Y MATERIALES

El presente trabajo se llevó a cabo en el cantón Ambato, provincia de Tungurahua. El experimento se realizó en un invernadero cuyas condiciones climáticas fueron: temperatura mínima: 10°C, temperatura máxima:

25°C, humedad relativa: 70% y luminosidad: 2. Para la elaboración de los biofertilizantes las frutas se pesaron en una balanza CAMRY EK3252, lavaron, picaron en trozos pequeños colocaron en proporciones establecidas (Tabla 1) dentro de un recipiente de 20 L de capacidad formando una mezcla homogénea seguida de 1 L de melaza, proceso que se repitió hasta completar ocho capas de fruta picada y ocho capas de melaza, tras la última capa de melaza y fruta se colocó una tapa de madera y una pesa de 5 kg para que actúe como prensa, favoreciendo el proceso de fermentación. La temperatura y pH se determinaron diariamente durante el proceso de fermentación. Se evaluaron seis formulaciones (Tabla 1) en tres especies vegetales: tomate riñón (*Solanum lycopersicum* L.), fresa (*Fragaria vesca*), y rosas (*Rosae* sp.).

Tabla 1. Especificaciones de las formulaciones.

	Formulación					
	1	2	3	4	5	6
Banano	10%	10%	10%	9.50%	9.50%	9.50%
Melón	10%	10%	10%	9.50%	9.50%	9.50%
Papaya	10%	10%	10%	9.50%	9.50%	9.50%
Babaco	10%	10%	10%	9.50%	9.50%	9.50%
Naranja	10%	10%	10%	9.50%	9.50%	9.50%
Manzanilla	0%	0%	0%	1.25%	1.25%	1.25%
Toronjil	0%	0%	0%	1.25%	1.25%	1.25%
Melaza	50%	50%	50%	50%	50%	50%
Días de Fermentación	7	14	21	7	14	21

Elaborado por: Andrea Quinde, 2014

Los biofertilizantes se aplicaron de manera foliar en las especies vegetales desde el día diez después de la plantación hasta el día 36 de su desarrollo en una dosis de 4 mL/L de agua, cada planta recibió aproximadamente 110 mL de la solución de biofertilizante cada 7 días, utilizando un aspersor con capacidad para 2 L.

Para la cuantificación de la clorofila en las hojas de las especies vegetales se utilizó el método propuesto por Val, Heras y Mongue (2011), empleando un espectrofotómetro THERMO SCIENTIFIC GENESYS 20. La medición de hojas, tallos, color de hojas, y cuantificación de defectos se los realizó de acuerdo a la metodología publicada por la FAO (2013).

## RESULTADOS

La temperatura en los biofertilizantes se mantuvo entre 15 a 30 °C, mientras que el pH disminuyó con respecto al tiempo. Los análisis químicos indicaron que los biofertilizantes elaborados poseen un porcentaje de nitrógeno

(N) entre 0,259% y 0,334%, de 80,16 mg/100mL a 94,62 mg/100mL de magnesio (Mg) y además 1597 µg/100mL a 2080 µg/100mL de hierro (Fe).

El aumento de clorofila a en las tres especies vegetales con respecto al testigo fueron de: 1164% para el tomate riñón, 1064% para la fresa y de 541% para las rosas, mientras que con respecto a la clorofila b el aumento en porcentaje en el tomate riñón fue de 640%, en la fresa de 425% y en las rosas de 325%. El análisis de varianza correspondiente a la clorofila a estableció que existe una diferencia significativa entre los tres factores en estudio (plantas, formulación, días de fermentación) al 95% de confianza; resultados similares se obtuvieron en el análisis de varianza correspondiente a la clorofila b. En las Figuras 1 y 2 (Anexos) se observa el aumento de clorofila a y b con respecto al tiempo de tratamiento en las plantas, las tres especies vegetales muestran una tendencia ascendente, siendo más pronunciada en el tomate riñón.

La evolución del largo y ancho de las hojas de las tres especies vegetales tratadas con las diferentes formulaciones de biofertilizantes muestran que en todos los tratamientos el tomate riñón es la planta que posee un mayor crecimiento porcentual con respecto al testigo conforme al tiempo de estudio; en la fresa y rosa se observa la misma tendencia pero en menor magnitud. En las Figuras 3 y 4 (Anexos) se muestra el aumento del largo y ancho de las hojas con respecto al tiempo de tratamiento.

Los datos de medición para los tallos mostraron que la especie vegetal con mayor crecimiento es el tomate riñón, mientras que la fresa y la rosa presentan un aumento menos evidente. Los porcentajes de aumento con respecto a los testigos en las tres especies vegetales se encuentran en las Tablas 1, 2 y 3 (Anexos). La evolución del tamaño del tallo frente a los días de tratamiento se muestra en la Figura 5 (Anexos).

Los valores de color de hoja evaluados de acuerdo a la escala de color propuesta por la FAO (2003) muestran un aumento similar en las tres especies vegetales, el porcentaje de aumento de color en las hojas con respecto al testigo se encuentran en las Tablas 1, 2 y 3 (Anexos). La evolución del color en las hojas de las tres especies vegetales estudiadas se muestra en la Figura 6.

Los defectos disminuyeron en las tres especies vegetales durante el tratamiento con los biofertilizantes, mejorando la calidad de las plantas (Figura 7).

El costo de elaboración del biofertilizante establecido como mejor tratamiento fue de \$1.82 por Litro mientras que el costo de un agroquímico de uso común en el sector agrícola es de \$38.00 el Litro es decir existe un ahorro del 95% al elaborar y aplicar el biofertilizante.

La formulación que presento mejores resultados en las tres especies vegetales y en todos los parámetros fue la elaborada a base de frutas sin hierbas medicinales y

fermentada durante 14 días.

## RESULTADOS Y CONCLUSIONES

### Características Físicas y Químicas de los biofertilizantes

Los biofertilizantes se obtuvieron por fermentación alcohólica, bioreacción donde se degradan azúcares como la melaza y la fructosa en alcohol y dióxido de carbono (Vázquez y Dacosta, 2007). Las condiciones adecuadas para que las levaduras actúen son a un pH entre 3,5 a 6,5 y una temperatura no mayor a 30°C, al producirse la fermentación el azúcar va transformándose en alcohol etílico como producto principal, esto hace que la densidad del biofertilizante vaya disminuyendo a medida que avanza la fermentación, obteniéndose así un líquido macerado con varios nutrientes (Vargas, 2010), estos tuvieron un porcentaje de nitrógeno entre 0,259% y 0,334% al contener nitrógeno actúa eficientemente en las plantas porque es uno de los elementos esenciales en el desarrollo de las especies vegetales. Al poseer una alta cantidad de magnesio que es uno de los microelementos sumamente necesarios en la planta porque no solamente ocupa la posición central de las moléculas de clorofila, sino que también forma parte de varios procesos vitales como la síntesis de carbohidratos, proteínas, grasas y vitaminas se asegura una nutrición completa en las plantas (Summers, 2011), asimismo la cantidad de hierro contenida en los biofertilizantes es importante ya que este asume la función de catalizador de los procesos respiratorios y de la formación de la clorofila mediante la síntesis de las porfirinas.

### Clorofila a y b

La presencia de la clorofila a y b en las plantas es indispensable ya que estos pigmentos son los que hacen posible que la planta pueda absorber la luz necesaria para realizar la fotosíntesis, proceso fundamental para fabricar materia orgánica (Alligener, 1996). La función de la clorofila a y b es similar, ya que lo único que las diferencia es un radical en su estructura química que hace que el espectro visible que absorben sea mayor; es así, que de las especies vegetales en estudio se obtuvo que el tomate riñón es la hortaliza que mayor concentración de clorofilas presentó, seguido de la fresa y finalmente de la rosa durante el tratamiento con los biofertilizantes. La razón por la que el tomate riñón produjo mayor cantidad de clorofila que las otras dos especies vegetales puede deberse a que el tomate riñón va desarrollando sus hojas más rápidamente y en mayor cantidad que las demás plantas, es decir las hojas poseen un área foliar extensa y joven, factor que incide en la absorción de los nutrientes contenidos en el biofertilizante, principalmente magnesio y hierro, los cuales actúan directamente en la formación de las clorofilas (Peat, 2010).

### Hojas

Mohammadian, et al. (2009), determinaron que las hojas poseen una estructura llamada cutícula que desempeña un papel importante en la absorción de nutrientes por parte de la planta, la cutícula varía de acuerdo a la especie vegetal, algunas poseen menor cantidad de cera

y otras mayor cantidad lo que dificulta la absorción de nutrientes e influye en el desarrollo de los órganos de la planta. Las hojas se desarrollan gradualmente a medida que la planta crece, pero existen nutrientes que hacen que este desarrollo sea mayor y de mejor calidad. Las hojas del tomate riñón se desarrollan en mayor magnitud debido a que la cutícula de sus hojas secreta menor cantidad de ceras en comparación a la fresa y a la rosa, esto hace que los nutrientes aplicados de manera foliar necesiten menos tiempo en contacto con la hoja para que puedan ser absorbidos y utilizados.

### Tallos

El desarrollo del tallo en el tomate riñón es mayor debido a la capacidad alta de absorción de nutrientes contenidos en el biofertilizante por la estructura de la epidermis del tallo, resultados que se asemejan a los del estudio "Influencia de algunos bioestimulantes en el crecimiento y productividad del tomate (*Lycopersicon esculentum* L.). Variedad Lignón" realizado por

### Mineiro (2003).

### Color de Hojas

El color de las hojas depende de la presencia de clorofila a y b en la planta, ya que son los dos pigmentos que dotan de color verde a las hojas de las plantas. A medida que las plantas forman clorofila estas aumentan de tonalidad, a un color más verdoso y tendrán mejor aspecto y vigor. Esto se observó en las hojas de las tres especies vegetales ya que aumentaron la tonalidad debido a que las plantas asimilan los nutrientes esenciales en la formación de clorofila, como el hierro y el magnesio, produjeron mayor cantidad clorofila y por lo tanto el color de las hojas aumentó (Hess y Foy 2003). La FAO (2002), asevera que mientras se produzca clorofila a y b el aspecto y tonalidad de las hojas de las plantas mejorara con relación al tiempo.

### Defectos en las especies vegetales

Los defectos en las plantas según Suquilanda (1996), se producen principalmente por la falta de macro y micronutrientes. La falta de ciertos nutrientes como el nitrógeno, hierro, magnesio, boro, zinc, entre otros, causa varios defectos en la planta como hojas pálidas, decoloración de las hojas y tallos, coloración marrón, y amarillamiento de los bordes. Las tres especies vegetales (tomate riñón, fresa y rosa) presentaron una disminución de defectos con la aplicación del biofertilizante foliar, pues absorbieron los nutrientes necesarios para disminuir sus deficiencias. El follaje de las fresas presentó un mayor número de defectos, los que fueron reduciendo con la aplicación de los biofertilizantes. Además de aportar nutrientes a las plantas, el biofertilizante fabricado posee características de un insecticida, alejando de este modo las posibles plagas de las plantas.

### Costos

Según Gudynas, E. (2012) la utilización de biofertilizantes en la agricultura permite implementar una forma sostenible y sustentable de obtener una producción

de calidad en cultivos orgánicos. El biofertilizante que reportó mejores resultados en las especies vegetales fue elaborado a base de frutas y fermentado durante 14 días, el costo de producción para 1 L de este fue de \$1,82 que al ser comparado con el precio comercial del agroquímico Biozyme \$38,00 existe una diferencia significativa. El costo de aplicación para una hectárea tomando en cuenta que la dosis a ser utilizada es de 4 mL/L con el biofertilizante es de \$14,56 mientras que con el agroquímico Biozyme es de \$304, es decir el ahorro en aplicación al utilizar el biofertilizante elaborado a base de frutas es del 95%.

### REFERENCIAS

- Alligener, N. (1996) Química Orgánica. Editorial Reverté, Madrid – España. 350 pp.
- Álvarez, E. (2011) Fertilizantes orgánicos foliares, 2da Edición, Machala-Ecuador.
- Eibner, R. (1996). Foliar fertilization, importance and prospects in crop production. pp. 3-13. In: A. Alexander (Ed.). Foliar fertilization. Proceedings of the First International Symposium of Foliar Fertilization by Schering Agrochemical Division. Berlin.
- Gudynas, E. (2012). Producción Orgánica en América Latina. Crecimiento sostenido con énfasis exportador. Centro Latino Americano de Ecología Social.
- Hess, F. y Foy, C. (2003). Interacción de agentes tensoactivos con las cutículas de las plantas. *Weed Technology*, 14, 807-812.
- Mendoza, T. (2004). Aminoácidos. [En línea] Argentina, disponible en: [www.uvademesa.d/AminoacidosHMDJASA.a%20bril04.pdf](http://www.uvademesa.d/AminoacidosHMDJASA.a%20bril04.pdf)
- Mineiro, L. (2003), Influencia de algunos bioestimulantes en el crecimiento y productividad del tomate (*Lycopersicon esculentum* L.). Variedad Lignón. Quito – Ecuador.
- Mohammadian, M., Watling, J. y Hill, R. (2009). Tapones estomáticos y su impacto en la invasión de hongos. *Agathis robusta*. *Australian Journal of Botany*, 57, 389-395.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura FAO. (2013). Métodos de Análisis en plantas. Roma- Italia.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura FAO. (2002). Tomate Riñón. [En línea]. Disponible en: <http://www.fao.org/inpho/content/documents/vlibrary/AE620s/Pfrescos/TOMATE.HT>
- Peat, J. (2010). Aspectos Técnicos sobre Cuarenta y Cinco Cultivos Agrícolas de Costa Rica. Dirección General de Investigación y Extensión Agrícola. Ministerio de Agricultura y Ganadería. San José, Costa Rica.
- Ramírez, F. (2000). Fertilidad de Suelo y Nutrición de Plantas. Corporación Misti S.A. Lima – Perú.
- Summers, P. (2011). Importancia del Magnesio y el Azufre en una fertilización equilibrada. Clase de nutrición de plantas en cultivos protegidos. Salto. Curso horticultura, Facultad de Agronomía. Uruguay.
- Suquilanda, V. (1996). Agricultura orgánica, alternativa tecnológica del futuro. Fundagro. Quito, Ecuador.
- Suquilanda, V. (2003). Elaboración de abonos Orgánicos para la producción de hortalizas. Agricultura orgánica, alternativa tecnológica del futuro. Fundagro. Quito, Ecuador.
- Val, J. Heras, L. Mongue E. (2011). Nuevas Ecuaciones para la determinación de pigmentos fotosintéticos en acetona. Zaragoza - España.
- Vargas, E. (2010). Elaboración y caracterización de fertilizantes orgánicos fermentados con estiércol de vaca fresco (bioles). Departamento de Botánica Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Ocampo Velázquez, R. V. Facultad de Ingeniería Universidad Autónoma de Querétaro
- Vázquez, H y Dacosta, O. (2007). Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas. Departamento de Sistemas, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Azcapotzalco, México y Oficina de Consejo, Desarrollo y Transferencia Tecnológica, Dijon, Francia.
- Venegas, T. (2011). Biofertilización Foliar Complementaria para Nutrición y Sanidad en Producción de papas. La Paz, Bolivia.

## ANEXOS

Tabla 1. Porcentajes de aumento en el Tomate riñón.

	Biofertilizante 3	
	Testigo	Mejor Tratamiento
Clorofila a	100%	1164%
Clorofila b	100%	640%
Hojas Ancho	100%	492%
Hojas Largo	100%	269%
Tamaño de Tallo	100%	192%
Color de la hoja	100%	300%
Defectos	100%	133%

Elaborado por: Andrea Quinde, 2014

Tabla 2. Porcentajes de aumento en la Fresa.

	Biofertilizante 3	
	Testigo	(mejor tratamiento)
Clorofila a	100%	1014%
Clorofila b	100%	425%
Hojas Ancho	100%	171%
Hojas Largo	100%	156%
Tamaño de Tallo	100%	84%
Color de la hoja	100%	265%
Defectos	100%	520%

Elaborado por: Andrea Quinde, 2014

Tabla 3. Porcentajes de aumento en las Rosas.

	Biofertilizante 3	
	Testigo	(mejor tratamiento)
Clorofila a	100%	541%
Clorofila b	100%	325%
Hojas Ancho	100%	67%
Hojas Largo	100%	7%
Tamaño de Tallo	100%	58%
Color de la hoja	100%	50%
Defectos	100%	58%

Elaborado por: Andrea Quinde, 2014

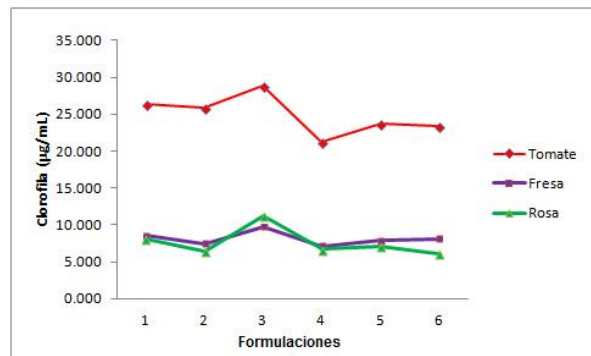


Figura 1. Aumento de clorofila a con cada tratamiento

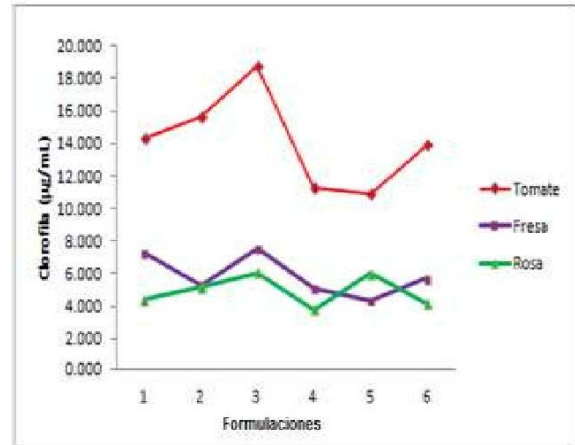


Figura 2. Aumento de clorofila b con cada

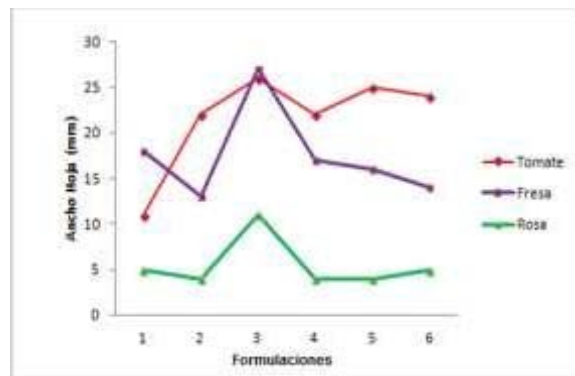


Figura 3. Aumento del ancho de hojas con cada tratamiento.

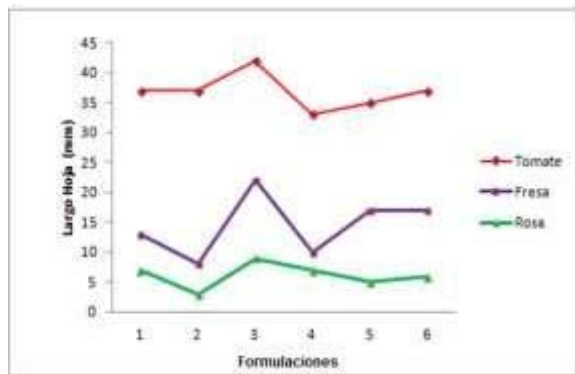


Figura 4. Aumento del largo de hojas con cada tratamiento.

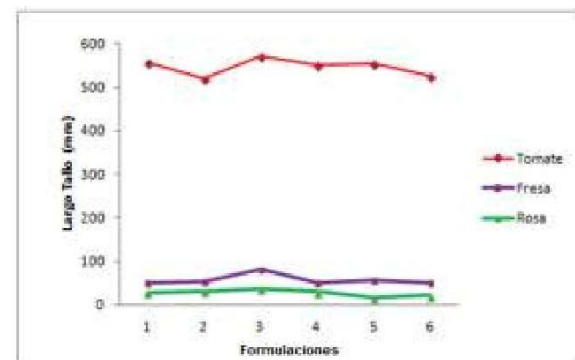


Figura 5. Aumento del tamaño del tallo con tratamiento, cada tratamiento.

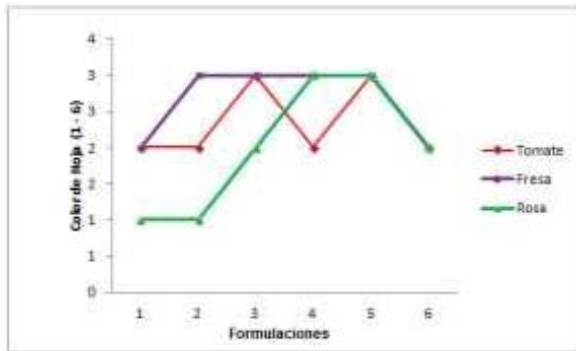


Figura 6. Aumento del color de hojas con cada tratamiento.

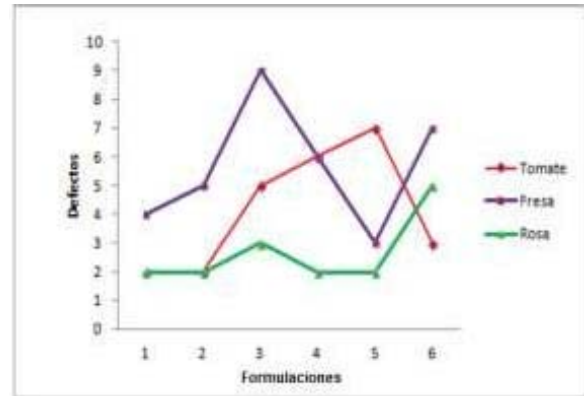


Figura 7. Disminución de defectos en las plantas con cada tratamiento.

# DIVERSIDAD MOLECULAR DE LEVADURAS ASOCIADAS A FRUTOS DE MORA DETERMINADAS MEDIANTE TÉCNICAS MOLECULARES

## MOLECULAR DIVERSITY OF YEASTS ASSOCIATED TO BLACKBERRY FRUITS DETERMINED BY MOLECULAR TECHNIQUES

Cevallos Campaña Cristina, Carvajal Barriga Javier, Portero Barahona Patricia, Tufiño Coloma Carolina, Rodríguez Meza Carlos.

Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.  
crodriguezmeza@hotmail.com

Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Centro Nacional para la Investigación de la Biomasa (CNIB) - Colección de Levaduras Quito Católica.

### RESUMEN

Los frutos en su ambiente natural representan hábitats de gran importancia para las levaduras. La presente investigación se enfocó en determinar la diversidad de levaduras asociadas a frutos de mora recolectados en la provincia de Tungurahua. De los 23 cultivos obtenidos se procedió a extraer ADN genómico de cada uno, para realizar la amplificación por PCR que corresponde a la región de la ITS1, ITS2 y ADNr 5.8S. El fragmento resultante fue usado para la digestión enzimática usando HhaI, HaeIII y HinfI. Los patrones resultantes fueron usados para establecer una comparación con aquellos depositados en la base de datos de la CLQCA (Colección de Levaduras Quito Católica). De las 23 levaduras se obtuvieron 9 perfiles de restricción, de los cuales 6 fueron positivamente identificados como *Meyerozyma guilliermondii*, tres como *Hanseniaspora meyeri*, tres como *Whickerhamomyces onychis*, dos como *Galactomyces geotrichum* y una como *Pichia manshurica*. Las restantes levaduras no fueron identificadas mediante esta técnica porque no presentaron patrones de bandas similares con los de la base de datos. La ubicación taxonómica de los mismos fue determinada mediante la secuenciación de la región 26S del ADNr, dando como resultado: tres aislados de *Clavispora lusitaneae*, dos de *Metschnikowia pulcherrima* uno correspondiente a *Candida sorbosivorans* y dos correspondientes a *Pichia membranifaciens*. Los datos obtenidos en el presente trabajo demuestran la gran diversidad de levaduras presentes en frutos de mora, aportando con conocimientos básicos para encontrar la posible aplicación biotecnológica de las mismas.

Palabras clave: levaduras, diversidad, moras, identificación molecular.

### SUMMARY

Fruits in their natural environment represent important habitats for yeasts. The survey was focused in the determination of the diversity of yeasts associated to blackberry fruits from Tungurahua province. From 23 cultures obtained, genomic DNA was extracted, and used for PCR amplification of the ITS1, ITS2 and 5.8S rDNA region. The obtained fragment was used for an enzymatic digestion using HhaI, HinfI and HaeIII. The resulting patterns were compared with the ones from CLQCA (Quito Católica Yeast Collection) database. From 23 yeast strains, 9 restriction profiles were obtained, 6 profiles were identified as *Meyerozyma guilliermondii*, three of them corresponded to *Hanseniaspora meyeri*, three as *Whickerhamomyces onychis*, two as *Galactomyces geotrichum* and one as *Pichia manshurica*. The remaining yeasts were not identified by this technique because they did not match similar band patterns with the ones from the CLQCA database. The taxonomic status of these cultures was determined by 26S rDNA sequencing giving as result: three isolates of *Clavispora lusitaneae*, two isolates of *Metschnikowia pulcherrima* one corresponding to *Candida sorbosivorans* and two corresponding to *Pichia membranifaciens*. The data obtained in this research demonstrate the great diversity of yeast associated to blackberry fruits, providing basic knowledge to find potential biotechnological applications.

Keywords: yeasts, diversity, blackberry fruits, molecular identification.

## INTRODUCCIÓN

La palabra inglesa 'yeast' tiene sus equivalentes en otros idiomas basada en las palabras espuma o levantarse, tal es el caso en español, 'levadura', la cual se direcciona hacia el proceso fermentativo mediante el cual se produce la cerveza y el vino. Por esta razón se ha pensado siempre en las levaduras como hongos ascomicetos fermentativos. Se ha descubierto que algunas taxas son basidiomicéticas. Ahora las levaduras son conocidas como hongos que se reproducen asexualmente mediante gemación o fisión, las cuales se encuentran en una disposición en su gran mayoría por células aisladas (Kurtzman et. al., 2011).

Alrededor de 1000 especies de levaduras han sido descritas, pero nuevas especies se están caracterizando regularmente y existe una considerable biodiversidad de levaduras no explotadas en la Tierra (Walker, 2009).

Algunas técnicas de biología molecular son muy útiles en la detección de nuevas especies levaduriformes en ambientes naturales lo cual permite a los científicos hallar formas de conservar y explotar el potencial biotecnológico de levaduras no-sacaromicéticas (Walker, 2009).

Las levaduras no son tan ubicuas como las bacterias en ambientes naturales, no obstante se pueden aislar del suelo, agua, plantas, animales e insectos. Los hábitats preferidos de las levaduras son los tejidos vegetales (hojas, flores y frutos), pero otras especies se encuentran en una relación de comensalismo o parasitismo con animales. Algunas levaduras, la más notable *Candida albicans*, es un patógeno oportunista en humanos. Otras especies pueden ser aisladas de ambientes especializados o extremos, como por ejemplo aquellos con pH bajo, hábitats con altas concentraciones de sal o azúcar, bajas temperaturas (algunas levaduras han sido aisladas de regiones polares), y baja disponibilidad de oxígeno (tracto intestinal de animales) (Walker, 2009).

Las levaduras se encuentran con frecuencia en las hojas y las flores, aunque en número muy pequeño, siendo los insectos un importante vector de diseminación de las mismas. Están sobre la epidermis de frutas y pueden penetrar a los tejidos subyacentes como resultado de un daño mecánico. El suelo es un importante reservorio, desde el cual pueden llegar a los alimentos, pero también suelen hallarse en el agua de lagos y ríos. Su presencia depende de la temperatura, el pH, la humedad y la disponibilidad de azúcares simples (Carrillo et. al. 2007).

Las levaduras constituyen la causa más común de alteración de frutas y jugos, pues tienen azúcares fermentables y elevada acidez. Comúnmente asociadas con el deterioro de las frutas secas están *Zygosaccharomyces rouxii* y especies de *Hanseniaspora*, *Candida*,

*Debaryomyces* y *Pichia*. También forman parte de la microbiota de productos lácteos y cárnicos. Las levaduras de las pasturas y suelo de los corrales pueden ser transportadas a los mataderos y de allí a las carcasas. *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus luteolus*, *Rhodotorula mucilaginosa* y *Debaryomyces hansenii* suelen hallarse en carcasas de cordero y cerdo. Por otra parte, *Schwanniomyces* y *Lipomyces* son géneros típicos del suelo (Carrillo et. al. 2007).

Para el análisis de la microbiota de levaduras, alcanzar la identificación de los aislados es esencial. La identificación tradicional se realiza a partir de promedios de métodos fenotípicos para determinar características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas. Sin embargo, los métodos de identificación tradicional para levaduras requieren experiencia considerable y habilidad para evaluar las pruebas específicas (Deak and Beuchat, 1996; Dlauchy et al.1999).

## MATERIALES Y MÉTODOS.

Extracción y determinación de la concentración de ADN genómico de Levaduras

En tubos de centrifugación de 1,5 ml con 0,4 g de microesferas de vidrio (425-600  $\mu\text{m}$  de diámetro, desinfectadas en HCl), se añadieron 500  $\mu\text{l}$  de buffer de lisis (6g de Tris [50mM] (Invitrogen), 14.5g NaCl [250mM], 100ml EDTA 50mM pH 8 (Panreac), 3g SDS [0,3%] (Sigma), 1000ml Agua, pH 8) y se autoclavó. Posteriormente, suficiente biomasa de levadura (48-72 horas de cultivo) fue transferida mediante el uso de puntas estériles. La suspensión de biomasa fue agitada durante 3 minutos en un vortex, a máxima velocidad, e incubada a 65°C durante una hora. Luego de la incubación, se agitó nuevamente durante tres minutos para proceder a la centrifugación (Sorvall® RMC 14), durante 30 minutos a 8500 rpm. Se transfirieron 300 $\mu\text{L}$  del sobrenadante a un tubo nuevo estéril, para finalmente medir la concentración del ADN en el espectrofotómetro (Nanodrop). El ADN genómico se conservó a -20°C.

Previo al uso, el espectrofotómetro Nanodrop, fue calibrado para permitir la determinación de la concentración del ADN genómico obtenido para los 23 aislados de levaduras estudiados. Se enciende el ordenador y en el escritorio se selecciona el programa Nanodrop 2000. Se escoge la opción ácidos nucleicos. Se da un clic en YES al proceso de calibración. Se levanta la tapa del Nanodrop y se carga con 2 $\mu\text{L}$  de la solución blanco (buffer de lisis) y se seleccionó BLANK. Después de unos segundos se cargaron 2 $\mu\text{L}$  de cada muestra, ingresando sus respectivos códigos seleccionando la opción MEASURE. Las concentraciones están dadas en ng/ $\mu\text{L}$ , además, se reportan los datos del coeficiente de absorbancias de soluciones ADN (260nm) sobre soluciones de proteínas que hacen lo propio a una absorbancia de 280nm proporcionando una estimación del grado de pureza de los

ácidos nucleicos. Cuando se terminó de medir todas las muestras, se escogió la opción REPORT y se mandó a imprimir.

### PCR-ITS

Para la amplificación de la región ITS mediante PCR, se utilizaron los primers sintéticos ITS1 (5' -TCCG-TAGGTGAACCTGCGG- 3') e ITS4 (5' -TCCTC-CGCTTATTGATATGC- 3'). La PCR se realizó a partir del ADN extraído y conservado. Previa a la reacción de PCR se debe realizar la dilución correspondiente de acuerdo a la concentración de ADN de cada muestra hasta obtener 5ng/μl de cada muestra.

Se prepararon los tubos para la reacción de PCR con 45μL de máster mix (10μL buffer Gotaq [5x], 4μL dNTP's [10mM], 3μL primer ITS1 [5μM], 3μL primer ITS4 [5μM], 0.4μL GoTaq polimerasa, 24.6μL agua ultrapurificada) más 5μL dilución de ADN de cada muestra.

Se termocicló para que se lleve a cabo la reacción en cadena de la polimerasa, los ciclos del termociclador se prepararon bajo las siguientes condiciones: un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, 40 ciclos de desnaturalización a 93°C por un minuto cada ciclo, 40 ciclos de annealing a 55°C por dos minutos cada ciclo, 40 ciclos de extensión a 72°C por 2 minutos cada ciclo y un ciclo de extensión final a 72°C por 10 minutos. Dando un total de tiempo de reacción de 3 horas con 35 minutos aproximadamente.

Se verificó el producto de PCR en gel de agarosa al 0.8% corrido a 100V durante 40 minutos de la siguiente manera, se cargaron en el gel aproximadamente 5μl de cada muestra, incluyendo en cada gel 6μl de marcador de peso molecular de 100pb TrackIt™ DNA Ladder. Las bandas se hicieron evidentes mediante el transluminador Spectroline Ultraviolet. Las imágenes se registraron en disquete de 3½ por Fisher Bioblock Scientific.

### ITS-RFLP

Se realizó la digestión del producto de PCR-ITS mediante el empleo de tres enzimas de restricción: HhaI (5' - 3' GCG CC), HaeIII (5' GG CC) y HinfI (5' GANT C). La reacción de digestión se realizó en un volumen final de 15μl conteniendo 5μl del mix para RFLP - ITS (2.2μL agua libre de endonucleasas, 2μL buffer, 0.8μL de enzima de restricción) y 10 μl del producto de amplificación de ITS.

Se incubaron los tubos con mix a 37°C durante 12 horas. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% a 80V durante 2 horas en búfer TBE 0.5X, teñidos con bromuro de etidio (10 mg/ml). Se cargaron en el gel 10μl de muestra incluyendo en cada gel 6μL de marcador de peso molecular de 100pb TrackIt™ DNA Ladder. Las bandas se evidenciaron mediante el transluminador

Spectroline Ultraviolet. Las imágenes se registraron en disquetes de 3½ por Fisher Bioblock Scientific. Los patrones de bandas obtenidos se compararon con la base de datos interna CLQCA. Si no se encontraron patrones similares se preparó una PCR del segmento 26S a partir de las muestras de ADN desconocidas, se realizó un gen clean y se envió a MACROGEN en Seúl - Korea del Sur para realizar la secuenciación.

### Electroforesis

Se preparó el buffer TBE 10X (108g de Tris, 55g de ácido bórico, 20mL de EDTA [0.5M] (pH 8) y 1000 mL de agua destilada) de la siguiente manera y se autoclavó.

Se realizó el gel de agarosa al 0.8% (1.6g de agarosa, 100 mL de TBE [0.5x], 12.5μL de bromuro de etidio [10 mg/ml]). El búfer TBE 0.5X se usa tanto para la preparación del gel como para la corrida.

Se corrió el gel de PCR - ITS con 5μL de muestra en cada pocillo, utilizando 6μL marcador de peso molecular de 100 pb TrackIt™ DNA Ladder. El tiempo de corrida fue de 40 minutos a 80 voltios. Para la corrida del gel ITS - RFLP se emplearon 10μL de muestra en cada pocillo, en el siguiente orden: Producto de amplificación del ITS, HhaI, HaeIII, HinfI. Se utilizaron 6μL de marcador de peso molecular de 100 pb TrackIt™ DNA Ladder. El tiempo de corrida fue de 2 horas a 80 voltios.

### Secuenciación del Dominio D1/D2 del gen ribosomal 26S

La secuenciación del dominio D1/D2 del gen ribosomal de la subunidad grande 26S fue llevada a cabo para identificaciones dudosas. Para la amplificación del dominio D1/D2 se usaron los primers NL1 (5' - GCATAT-CAATAAGCGGAGGAAAAG-3') y NL4 (5' GGTC-CGTGTTTCAAGACGG-3'). Las reacciones fueron llevados a cabo en un termociclador bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, apareamiento a 55°C por 30 seg, y extensión a 72°C por 1 min, con una extensión final de 10 min a 72°C. Posterior a esto se realizó un gen clean.

### Sistema de Purificación (gen clean)

Se añadió igual volumen de Membrane Binding Solution a la reacción de PCR. Y se procedió con una centrifugación y lavado de la siguiente manera, se insertaron las minicolumnas en tubos de centrifugación Eppendorf. Se transfirió el producto PCR preparado a la minicolumna ensamblada. Se incubó a temperatura ambiente por 1 minuto. Se centrifugó a 16000rpm por 1 minuto, se eliminó el líquido fluido y se reinsertó la minicolumna en el tubo de centrifugación Eppendorf. Se añadieron 700μL de Membrane Wash Solution (adicionar etanol), se centrifugó a 16000rpm por 1 minuto, se eliminó el líquido fluido y reinsertó la minicolumna



en el tubo. Se realizó de nuevo el paso 4 con 500µL de Membrane Wash Solution, se centrifugó esta vez a 16000rpm por 5 minutos. Se vaciaron los tubos y se re-centrifugaron las columnas ensambladas por 1 minuto con la tapa de la microcentrífuga abierta para permitir la evaporación de etanol residual. Cuidadosamente se transfirieron las minicolumnas a tubos limpios Eppendorf de centrífuga de 1.5mL. Se añadieron 50 µL de agua libre de nucleasas a la minicolumna. Se incubaron a temperatura ambiente por 1 minuto y se centrifugaron a 16000rpm por 1 minuto. Se eliminaron las minicolumnas y se almacenó el ADN a -20°C. Posterior a este proceso se enviaron las muestras de ADN a la empresa Macrogen en Seúl (Korea del Norte) para que se realicen las respectivas secuenciaciones.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 1. Tamaños de los productos de PCR y fragmentos de restricción obtenidos para los aislados de levaduras.

Código	Especie	Producto de Amplificación	Longitudes de los Fragmentos de Restricción (bp)			
			HhaI	HaeIII	Hinfi	
CLQCA 12-074	CC001	<i>Candida sorbosivorans*</i>	400	150+100	220+170	200
CLQCA 12-077	CC011	<i>Clavispora lusitaneae*</i>	370	220+150	370	220+150
CLQCA 12-081	CC017					
CLQCA 12-083	CC022					
CLQCA 12-086	CC029	<i>Metschnikowia pulcherrima*</i>	390	200+100	290+100	200
CLQCA 12-090	CC038					
CLQCA 12-088	CC036	<i>Pichia membranifaciens*</i>	480	200+100	380+100	300+200
CLQCA 12-093	CC042					
CLQCA 12-078	CC012	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	500	200	350+100	250
CLQCA 12-079	CC014					
CLQCA 12-080	CC016					
CLQCA 12-082	CC018					
CLQCA 12-094	CC043					
CLQCA 12-096	CC049					
CLQCA 12-087	CC035					
CLQCA 12-089	CC037	<i>Hanseniaspora meyeri</i>	750	380	750	340+180
CLQCA 12-091	CC039					
CLQCA 12-075	CC002	<i>Whickerhamomyces onychis</i>	600	420+180	320+110	210
CLQCA 12-076	CC004					
CLQCA 12-095	CC046	<i>Galactomyces geotrichum</i>	320	320	320	200+120
CLQCA 12-085	CC026					
CLQCA 12-092	CC041					
CLQCA 12-084	CC025	<i>Pichia manshurica</i>	400	220+120	300+100	200

CLQCA, 2013

\*Aislados identificados mediante la secuenciación de la región 26S del ADNr

## DISCUSIÓN

Las especies de levaduras pueden ser identificadas y caracterizadas de acuerdo a varios criterios basados en la morfología celular (por ejemplo, modo de división celular y forma de la espóra), fisiología (por ejemplo, pruebas de fermentación y asimilación) inmunología (por ejemplo, inmunofluorescencia), y mediante técnicas de biología molecular (por ejemplo, Filogenia por ADN ribosomal, reasociación de ADN, composición e hibridación de ADN basal, Cariotipificación, polimorfismos de amplificación al azar de ADN (RAPD) de las secuencias del dominio D1/D2 de la subunidad 26S del rDNA (ADN ribosomal), polimorfismos de longitud del fragmento de restricción (RFLP). Los análisis moleculares de secuenciación se han estado usando crecientemente por taxónomos de levaduras para así categorizar especies nuevas (Walker, 2009).

Este trabajo muestra información importante sobre la diversidad de levaduras asociadas a frutos de mora ya que las levaduras son microorganismos muchas veces ignorados. Se utilizaron técnicas moleculares para su identificación ya que son más sencillas y más fiables que la caracterización tradicional. Los datos obtenidos en este estudio pueden ser útiles para la selección de levaduras con características deseables para la industria, considerando importante la evaluación del potencial biotecnológico de estos aislados, en futuras investigaciones.

Se eligieron aislados asociados a frutos de mora provenientes de la provincia de Tungurahua. Esta fruta presenta condiciones óptimas de pH y azúcares para el desarrollo de levaduras. Las levaduras fueron aisladas luego fermentación espontánea de los frutos en un medio selectivo.

A partir de 23 cepas aisladas de levaduras, fueron obtenidos 9 perfiles de restricción diferentes. La tabla 1 contiene las longitudes de los amplificadores por PCR – ITS y de los fragmentos obtenidos después de la digestión con las tres enzimas de restricción. Cinco de los 9 grupos fueron identificados después de comparar los fragmentos de los productos de restricción con la base de datos de la Colección de Levaduras Quito Católica (CLQCA). Las especies identificadas para estos grupos fueron, 6 perfiles de restricción como *Meyerozyma guilliermondii*, tres como *Hanseniaspora meyeri*, tres como *Whickerhamomyces onychis*, dos como *Galactomyces geotrichum* y una como *Pichia manshurica*. Para la identificación de los demás grupos, fue necesaria la secuenciación del dominio D1/D2 de la subunidad grande 26S rDNA, ya que no se contaron con patrones similares a los de la base de datos, los resultados fueron *Candida sorbosivorans*, *Clavispora lusitaneae*, *Metschnikowia pulcherrima* y *Pichia membranifaciens*. Las especies que presentaron mayor abundancia entre las cepas estudiadas fueron *Meyerozyma guilliermondii* (26%), *Clavispora lusitaneae* (13%), *Hanseniaspora meyeri* (13%) y *Whickerhamomyces onychis* (13%).

La especie más dominante fue *Meyerozyma guilliermondii* con 6 aislados obtenidos, la cual está ampliamente distribuida en la naturaleza, los aislados en los que se basaron los estudios de Kurtzman provinieron de Argentina, Holanda, México, Italia, Alemania, Filipinas, Israel, Estados Unidos, Brasil. Obteniéndose los aislados de excrementos de insectos, flores, frutos, lodo y como patógenos oportunistas en humanos y animales. *Meyerozyma guilliermondii* produce la vitamina riboflavina y xilitol. Ambos compuestos son producidos por otras levaduras también, pero los avances biotecnológicos pueden darle a *Meyerozyma guilliermondii* una oportunidad para la producción industrial de estos com-

puestos. La *riboflavina* se utiliza a nivel mundial como complemento nutricional en humanos y animales. El xilitol se utiliza como edulcorante sustituto del azúcar especialmente en gomas de mascar.

Tres aislados coincidieron con los perfiles de restricción de *Hanseniaspora meyeri*, según Kurtzman, 2011, *Hanseniaspora meyeri* se ha aislado principalmente de hábitats naturales (flores, frutas, tallos, raíces, tallos en descomposición y drosophilidos) en Hawaii y Sudáfrica y en jugo de uva dañado en Georgia, Estados Unidos. Todavía no se conocen sus usos potenciales en biotecnología y es inocuo para animales de sangre caliente y humanos ya que no es capaz de crecer a 37°C.

Se identificaron tres aislados como *Whickerhamomyces onychis*, su hábitat principal es incierto. Los aislados reportados en el libro de Kurtzman, 2011 se han obtenido de una uña humana infectada, polvo, esputo y agua de mar.

*Whickerhamomyces onychis* Es una de las pocas levaduras que asimila 2,3-butanodiol, un producto de fermentación bacteriana y puede ser un patógeno oportunista en humanos (Kurtzman, 2011).

Dos aislados correspondieron al perfil de restricción de *Galactomyces geotrichum* la cual se caracteriza por crecer en ambientes ácidos por ello Kurtzman reporta que *Galactomyces geotrichum* se ha encontrado en frutas cítricas o en el suelo de huertos de frutos cítricos. Siendo también la responsable de la fermentación ácida de alimentos y no posee cualidades patógenas ya que es incapaz de crecer a 37°C

Un perfil de restricción se asoció a *Pichia manshurica* la cual es una levadura común en fermentaciones espon-táneas, comúnmente se la encuentra en material vegetal en descomposición.

Los cuatro perfiles de restricción restantes se enviaron a secuenciar a la empresa Macrogen en Korea del Sur ya que no presentaron similitud con los de la base de datos de la CLQCA. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 2. Las secuencias obtenidas fueron utilizadas para realizar la búsqueda de otras similares en la base de datos del genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), utilizando el programa blastn.

Tres aislados correspondieron a *Clavispora lusitaniae*, la cual según Kurtzman, 2011, se ha aislado originalmente de varios sustratos como especímenes clínicos de Noruega, Holanda y Finlandia. Del tracto digestivo de un cerdo en Portugal, de leche de vaca con mastitis en Grecia, de excrementos de Cuervo y jugo de cítricos en Israel, en raíces de cactus, en tejido necrótico de cactus, en agave, en los efluentes de una destilería de tequila, en moscas de la fruta, en México. En los efluentes

de una fábrica de chocolates en Canadá. Su ecología no está bien definida ya que tiene gran variedad de hábitats, en su mayoría se han encontrado en plantas de cactus o agave sin ser considerada cactofílica. No es un patógeno verdadero pero ha sido reconocido como un organismo infeccioso oportunista aislado de pacientes con deficiencias inmunitarias.

Dos de ellos correspondieron a *Metschnikowia pulcherrima* de la cual Kurtzman, 2011 describe que se han aislado de uvas, cerezas, ciruelas, mosca de la fruta en Canadá, de flores gloria de la mañana en la isla Gran Caimán y de frutas y flores de desecho en California. Se encuentran normalmente en estructuras ricas en nutrientes en plantas como en frutos los cuales también sirven de alimento para insectos. Actualmente se la ha estado utilizando en agricultura como un agente de bio-control contra putrefacción de manzana. La levadura aparentemente tiene un amplio espectro de actividad killer afectando al hongo azul (*Penicillium sp*) y *Botrytis sp*. Se ha demostrado que la pulcherrimina (pigmento difusible rosa pardo que se puede observar cuando se cultiva a la levadura en agar) de las especies de *Metschnikowia* inhibe el crecimiento de *Botrytis cinerea* como también el de otros hongos, levaduras y bacterias que se encuentran en las fermentaciones de vinos. La inhibición se debe al secuestro de iones de hierro de las especies objetivo, dado que *Metschnikowia* excreta un precursor soluble, el cual al combinarse con los iones férricos forma el característico pigmento marrón insoluble. Clínicamente se la asocia como un patógeno oportunista en humanos.

Se identificó un aislado como *Candida sorbosivorans*, la cual según Kurtzman, 2011, se estudió de un cultivo proveniente del estómago de un abejorro, otro proveniente de esputo (Holanda), del pico de una golondrina de mar muerta (Finlandia), de una bebida de zarzaparrilla negra (*Ribes nigrum*) (Holanda), en pulpas de frutas congeladas provenientes de Brasil, de un escarabajo (*Aetina concolor*) de flores gloria de la mañana (*Ipomoeae cairica*) provenientes de Hawaii. Se han aislado las especies de fermentaciones industriales en donde el sorbitol era convertido en sorbosa. Estudiada la cepa aislada del sorbitol industrial, se examinó su crecimiento en glucosa, *L-sorbosa* y *sorbitol*, *C. sorbosivorans* mostró un rápido crecimiento en sorbitol. Aún no se encuentran usos biotecnológicos pero en agricultura y alimentos se ha reportado la existencia de esta especie en frutas frescas y pulpas congeladas siendo *C. sorbosivorans* el cultivo predominante aislado. Capaz de hidrolizar proteínas y pectinas.

Dos aislados se identificaron como *Pichia membranifaciens* la cual según Kurtzman, 2011 se aisló originalmente de frutas, vinos y cervezas en un estudio levado a cabo en Holanda e Italia. *Pichia membranifaciens* se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza y a

menudo encontrada en putrefacciones de frutas de desecho y bebidas fermentadas. Se lo puede considerar un organismo descomponedor de alimentos. No crece a 37°C y por tanto carece de importancia clínica.

### CONCLUSIONES

De los 23 aislados se obtuvieron 9 genotipos distintos, los cuales demuestran gran biodiversidad de levaduras asociadas a frutos de mora.

De los 9 perfiles de restricción, 5 fueron identificados mediante RFLP y 4 mediante la secuenciación parcial del gen ribosomal 26S.

Los datos obtenidos en este estudio pueden ser útiles para la selección de levaduras con características deseables para la industria, considerando importante la evaluación del potencial biotecnológico de estos aislados, en futuras investigaciones.

### REFERENCIAS

Carrillo L., Audisio M., Bejarano N., Gómez S., Ancansi G., Benítez M., 2007. Manual de Microbiología de los Alimentos. Argentina. Asociación Cooperadora de la Facultad de Ciencias Agrarias UNJU, San Salvador de Jujuy. Pág. 40 – 43.  
Deák T., Chen J., Beuchat L., 2000. Molecular Characterization of *Yarrowia lipolytica* and *Candida zeylanoides* isolated

from poultry. *Applied and Environmental Microbiology* 66, pp. 4340-4344.

Deák T., Beuchat L., 1996. Handbook of Food Spoilage Yeasts. CRC Press Boca Raton, USA.

Dlauchy D., Tornay-Lehoczki J., Péter, G., 1999. Restriction enzyme analysis of PCR amplified rDNA as a taxonomic tool in yeast identification. *Systematic and Applied Microbiology*. INSTRUCTIVO POES BIOLOGÍA MOLECULAR, 2009 CNIB-M-003-11, 12, 16, 18, 19 Pp. 1-14

Kurtzman C., Fell J., Boekhout T., 2011. The Yeasts: a Taxonomic Study. Fifth Edition Elsevier. USA. Pp. 417-418, 425-426, 622-624, 697-698, 911-912.

López W., Ramírez M., Mambuscay L., Osorio E., 2010. Diversidad de Levaduras Asociadas a Chichas de Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología* Vol. XII No. 2 Diciembre Pág. 176-186.

Tornai-Lehoczki J., Dlauchy, D., 1996. An Opportunity to distinguish species of *Saccharomyces sensu stricto* by electrophoretic separation of the larger chromosomes. *Letters in Applied Microbiology* 23, pp. 227-230.

Vasdinyei R., Deák T., 2003. Characterization of yeast isolates originated from Hungarian dairy products using traditional and molecular identification techniques. 23rd. International Specialised Symposium on Yeasts, Budapest, Hungary. Abstr. Pp.: 215.

Walker G., 2009. Yeasts. En: M. Schaechter, ed. *Desk Encyclopedia of Microbiology*. 2nd. ed. London: Elsevier/Academic Press. pp. 1174-1187.

# PRODUCCIÓN DE ABONO ORGÁNICO A PARTIR DE RESIDUOS DE CAÑA DE AZÚCAR Y AZOLLA CON LA APLICACIÓN DE MICROORGANISMOS EFICIENTES (EM's)

## PRODUCTION OF ORGANIC FERTILIZER FROM SUGAR CANE WASTE AND AZOLLA WITH THE APPLICATION OF EFFECTIVE MICROORGANISMS (EM's)

Garcés María Fernanda, Pacheco María Teresa

Universidad Técnica de Ambato - Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos  
Campus Académico Huachi Av. Los Chasquis y Río Payamino  
gemeferg@hotmail.com

### RESUMEN

Se estudiaron 12 tratamientos con el fin de determinar la posibilidad de convertir residuos de caña de azúcar, azolla y la aplicación de microorganismos eficientes, en un abono orgánico de buena calidad. Para ello se evaluaron seis combinaciones de bagazo, azolla, suelo y dos tipos diferentes de microorganismos eficientes (b0: Marca Comercial-EM•1; b1: microorganismos atrapados de forma casera). Cada tratamiento fue evaluado en campo utilizando un diseño A\*B. Como variables de respuesta se estudió el contenido de materia orgánica, carbono, nitrógeno y relación carbono/nitrógeno. El mejor tratamiento fue a2b1 (60% de bagazo, 0% de azolla, 40% de suelo y microorganismos atrapados de forma casera), el cual con un nivel de confianza del 95% superó de forma significativa ( $P \leq 0,05$ ) a los testigos a0b0 (0% de bagazo, 0% de azolla, 40% de suelo y microorganismos comerciales EM•1) y a0b1 (0% de bagazo, 0% de azolla, 40% de suelo y microorganismos atrapados de forma casera), mostrando un pH de 7.23, una humedad de 57.87%, una relación carbono/nitrógeno de 18:1 y un 17.6 % de materia orgánica, siendo su costo de obtención: 0.52 USD/Kg.

Palabras clave: abono orgánico, caña de azúcar, azolla, EMs, relación carbono/nitrógeno.

### ABSTRACT

12 treatments were studied in order to determine the feasibility of converting sugar cane waste, azolla and the application of effective microorganisms in good quality organic fertilizer. For the preparation of fertilizers, six combinations of bagasse, azolla, soil and two different types of effective microorganisms (b0: Comercial brand-EM•1; b1: microorganisms trapped at home) were evaluated. Each treatment was evaluated in field using a design A\*B. As response variables, organic matter content, total carbon, nitrogen, and carbon/nitrogen ratio were studied. The best treatment was a2b1 (60% bagasse, 0% azolla, 40% of soil and microorganisms trapped at home) which with a confidence level of 95% exceeded significantly ( $P \leq 0.05$ ) to a0b0 controls (0% of bagasse, 0% of azolla, 40% soil and commercial microorganisms EM•1) and a0b1 (0% of bagasse, 0% of azolla, 40% soil and microorganisms trapped at home), because it showed a pH of 7.23, a moisture content of 57.87%, the carbon/nitrogen ratio was 18:1 and a total organic content of 17.6%; being its developing cost of 0.52 USD/Kg.

Keywords: organic fertilizer, sugar cane, azolla, EMs, organic matter, carbon/nitrogen ratio.

### INTRODUCCIÓN

Un abono orgánico de buenas características debe poseer un color oscuro indicativo de que existe de una buena cantidad de materia orgánica, gran diversidad de microorganismos y nutrientes disponibles para que las plantas puedan asimilarlos. Los abonos orgánicos además de proteger el suelo, garantizan una alimentación más sana por la disminución del uso de pesticidas y abonos químicos.

En procesos de obtención del azúcar de caña, se genera el bagazo que se obtiene en la molienda. Por lo general se recicla para la producción industrial de tableros y también como alimento para el ganado. También durante el proceso de recolección y procesado se generan residuos provenientes de las hojas y las puntas de las cañas que suponen el 20% de la caña (Moreno et al, 2008).

El compostaje es una alternativa para que los desechos agroindustriales sean transformados en materiales útiles que pueden ser reincorporados al suelo.

El bagazo de caña sufre una lenta degradación por lo que para acelerar el proceso en esta investigación se busca complementar con microorganismos eficientes.

Azolla-Anabaena es un recurso natural promisorio del Ecuador y que se ha probado como excelente fertilizante alternativo para el arroz. La Secretaría Nacional de Educación, Ciencia, Tecnología e Innovación (Senescyt) se encuentra promoviendo su utilización en otras aéreas y en otro tipo de cultivos (Montaño, 2009).

Los microorganismos eficientes son una mezcla de microorganismos benéficos que pueden aplicarse como inóculo para incrementar la diversidad microbiana de los suelos, aumentando la calidad y la salud de los mismos, así como el crecimiento y el rendimiento de los cultivos (Red de Agricultura Natural de la Región Asia / Pacífico (APNAN), 2004).

El principal objetivo de esta investigación fue: determinar la mejor formulación y proceso y para la obtención de un abono orgánico a partir de residuos de caña y estimar el costo beneficio.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Materiales

Residuos de caña de azúcar picados en trozos de  $4 \pm 2$  cm, recolectados en el cantón Baños de Agua Santa, azolla, microorganismos eficientes comerciales EM•1, rumen bovino y suelo empobrecido proveniente del Caserío San Vicente del Cantón Quero de la provincia de Tungurahua.

### Métodos

#### Aplicación de los tratamientos

Tabla N° 1 Dosificación en kg de los tratamientos aplicados en la obtención del abono orgánico.

Tratamientos	
a0b0	0 kg de bagazo, 0 kg de azolla, 6 kg de suelo + Marca Comercial (EM•1Microorganismos eficaces).
a0b1	0 kg de bagazo, 0 kg de azolla, 6 kg de suelo + Microorganismos atrapados del rumen.
a1b0	0 kg de bagazo, 3.6 kg de azolla, 2.4 kg de suelo + Marca Comercial (EM•1Microorganismos eficaces).
a1b1	0 kg de bagazo, 3.6 kg de azolla, 2.4 kg de suelo + Microorganismos atrapados del rumen.
a2b0	3.6 kg de bagazo, 0 kg de azolla, 2.4 kg de suelo + Marca Comercial (EM•1Microorganismos eficaces).
a2b1	3.6 kg de bagazo, 0 kg de azolla, 2.4 kg de suelo + Microorganismos atrapados del rumen.
a3b0	1.8 kg de bagazo, 1.8 kg de azolla, 2.4 kg de suelo + Marca Comercial (EM•1Microorganismos eficaces).
a3b1	1.8 kg de bagazo, 1.8 kg de azolla, 2.4 kg de suelo + Microorganismos atrapados del rumen.
a4b0	2.7 kg de bagazo, 0.9 kg de azolla, 2.4 kg de suelo + Marca Comercial (EM•1Microorganismos eficaces).
a4b1	2.7 kg de bagazo, 0.9 kg de azolla, 2.4 kg de suelo + Microorganismos atrapados del rumen.
a5b0	0.9 kg de bagazo, 2.7 kg de azolla, 2.4 kg de suelo + Marca Comercial (EM•1Microorganismos eficaces).
a5b1	0.9 kg de bagazo, 2.7 kg de azolla, 2.4 kg de suelo + Microorganismos atrapados del rumen.

Se pesó cada uno de los materiales según correspondían a las formulaciones de los tratamientos utilizando una balanza digital colgante, como se observa en la tabla N°1. Las muestras se removieron y colocaron en baldes limpios que se sellaron herméticamente para evitar la entrada de oxígeno disponiendo de una manguera de desfogue conectada a una botella con agua.

### Determinación del número de Ufc de los EM's.

Se prepararon diluciones con agua potable estéril en el caso de los microorganismos comerciales se realizó una dilución de  $1 \times 10^5$  y de los microorganismos del rumen bovino de  $1 \times 10^8$  y se sembraron  $0.5 \mu\text{l}$  en medio nutritivo estéril, se incubaron los microorganismos comerciales a  $28^\circ\text{C}$  y los del rumen a  $39^\circ\text{C}$ .

Después del período de incubación se contaron las placas y se determinó el número de ufc y se aplicó a los tratamientos correspondientes en la misma concentración.

### Temperatura

Se colocó una termocupla a unos 20 cm de profundidad en cada tratamiento y una vez estabilizada la lectura se tomó la temperatura, esta medición se realizó in situ.

### Medición de pH

Se pesaron 10 gr de muestra y se mezclaron con 50 ml de agua destilada (relación 1:5, p:v) manteniendo en agitación; una vez estabilizada la lectura se midió el pH usando un peachímetro marca HANNA HI 9126.

### Humedad

Se determinó por gravimetría mediante el método APHA, cuantificando la pérdida de peso de 10 gr de muestra después de secarla en estufa a  $105^\circ\text{C}$  durante 24 horas.

### Cenizas, sustancia orgánica

Luego de la determinación de humedad las muestras se llevaron a calcinación en la mufla de  $430$  a  $450^\circ\text{C}$  durante dos horas. Se dejaron enfriar las muestras en un desecador y se pesaron (Método APHA, 2000).

### Carbono orgánico total

Se realizó una determinación fotométrica (Método APHA, 2000), para lo cual se utilizó potasio dicromato (5%), ácido sulfúrico (concentrado), cloruro de bario (solución: 4 gr de  $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , aforando a 1000 ml con agua destilada), glucosa estándar, equivalente a 5 % de carbono orgánico (se pesó 12.5 gr de glucosa seca y aforó a 100 ml con agua destilada).

### Nitrógeno total

Las muestras fueron analizadas en el Laboratorio LAB-CESTTA según el método kjedahl.

### Relación carbono/nitrógeno

Se halló dividiendo el contenido de nitrógeno para el contenido de carbono de cada tratamiento.

### Macro y micro nutrientes del mejor tratamiento

Se determinó P, K, Ca, Mg, Fe, Zn, Mn y Cu en el Laboratorio LABCESTTA.

### Prueba de germinación

Como un ensayo adicional, una vez terminado el proceso de descomposición, se colocó el abono orgánico en bandejas plásticas y se sembró 20 semillas de lechuga en cada una. Luego de ocho días se determinó el porcentaje de germinación en cada bandeja.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Seguimiento de la Temperatura durante el proceso de descomposición.

Durante el proceso de descomposición pasó de temperatura ambiente (14 a 25°C) a temperaturas de hasta 65°C dependiendo de la composición de cada tratamiento, debido al uso de microorganismos eficientes y a la cantidad de residuos de caña de azúcar, que conjuntamente actúan favoreciendo la descomposición y el enriquecimiento del suelo. Los tratamientos que presentaron un menor incremento de la temperatura fueron el a0b0 (0% de bagazo, 0% de azolla, 40% de suelo y microorganismos comerciales EM•1) y a0b1 (0% de bagazo, 0% de azolla, 40% de suelo y microorganismos atrapados de forma casera), tomados como testigos ya que tenían solo suelo con muy poca cantidad de materia orgánica que pudieran descomponer los microorganismos. El tratamiento que alcanzó la temperatura más alta fue a2b1 (60% de bagazo, 0% de azolla, 40% de suelo y microorganismos atrapados de forma casera), ver figura N° 1.

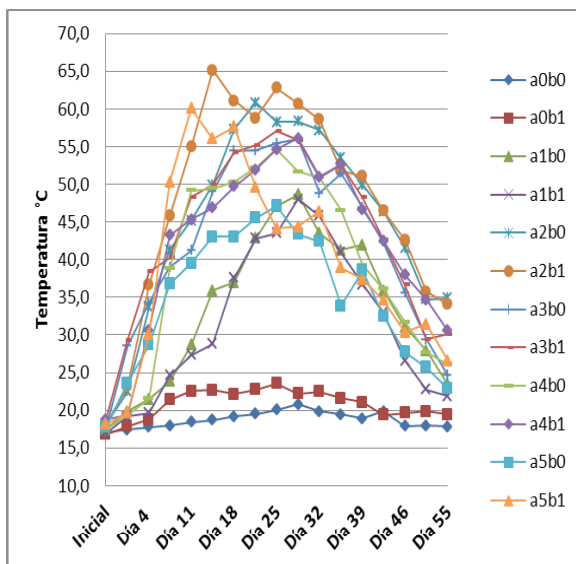


Figura N°1 Temperatura promedio de tres réplicas, medida durante el proceso de descomposición de la mezcla de cada tratamiento.

### Control del pH durante el proceso de descomposición

La figura N° 2 muestra los resultados promedios de pH desde el valor inicial que corresponde a los tratamientos sin incorporar todavía los microorganismos eficientes; y desde la semana 1, ya inoculados los microorganismos eficientes su evolución durante las ocho semanas

que se mantuvo en descomposición. Los pH de cada uno de los tratamientos atravesaron tres fases diferentes que fueron: la fase mesófila inicial con un pH ácido, la fase mesófila-termófila con pH básico y la fase termófila-mesófila donde retorna a neutro o ligeramente alcalino, debido a la formación de ácidos orgánicos que lo van modificando.

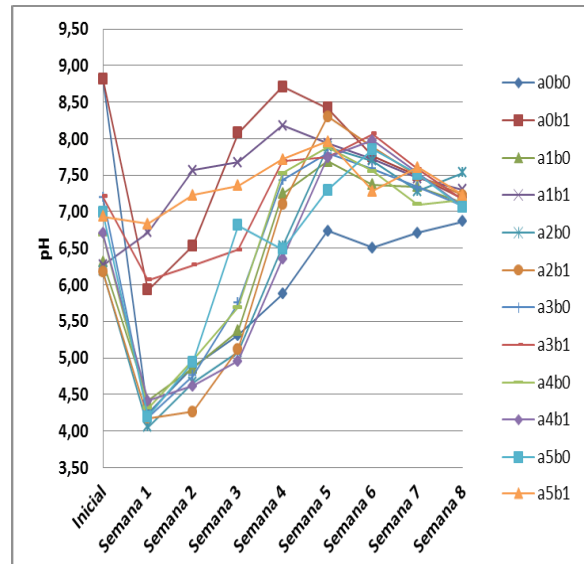


Figura N°2 pH promedio de tres réplicas, medida durante el proceso de descomposición de la mezcla de cada tratamiento.

### Control de la Humedad durante el proceso de descomposición

Como se muestra en la figura N°3 se trató de que la humedad de los tratamientos se mantenga entre el 50 y 70%, ya que si se presentaba un descenso en la cantidad de agua, la actividad de los microorganismos podía disminuir, y si había un exceso de humedad el agua podía obstaculizar el paso del aire por los poros del abono orgánico y la salida de gases (Gordillo et al., 2011).

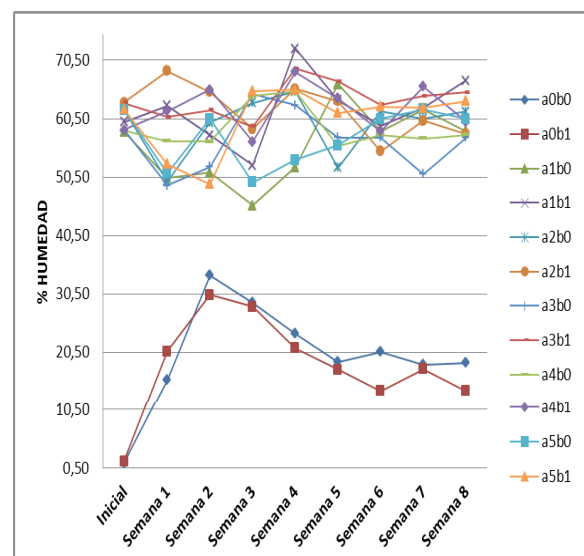


Figura N°3 Humedad promedio de tres réplicas, medida durante el proceso de descomposición de la mezcla de cada tratamiento.



Los tratamientos en los que la disminución de la humedad fue considerable son el a0b0 (0% de bagazo, 0% de azolla, 40% de suelo y microorganismos comerciales EM•1) y el a0b1 (0% de bagazo, 0% de azolla, 40% de suelo y microorganismos atrapados de forma casera), ya que era suelo que carecía de materia orgánica y con el aumento de la temperatura ambiental esta se evaporaba rápidamente.

### Contenido de Materia Orgánica

El porcentaje de materia orgánica durante el proceso de elaboración del abono fue disminuyendo conforme aumentaba el tiempo de descomposición figura N°4. Es importante señalar que el rendimiento de un sistema de compostaje se encuentra entre 30 y 50%, valores bajos, señalan un buen proceso de degradación (CORPOICA, 2007).

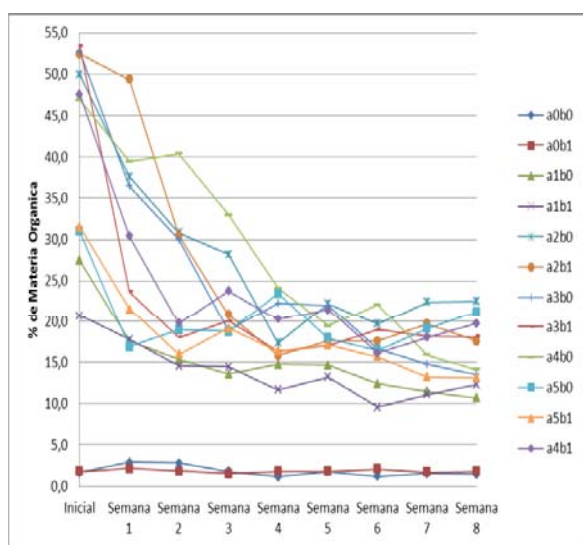


Figura N°4 Materia orgánica promedio, medida durante el proceso de descomposición.

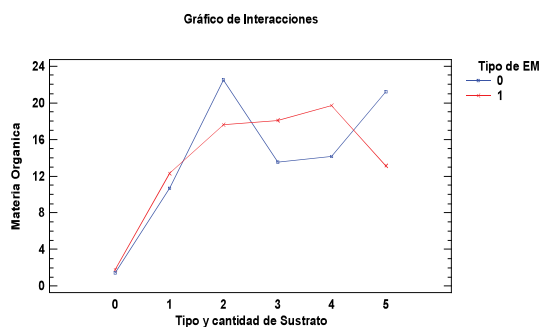


Figura N°5 Interacción e intervalos Tukey HSD al 95 % para el Tipo de microorganismos y el Tipo y cantidad de sustrato en base a Materia orgánica.

En la figura N° 5 se observa que el mejor tratamiento en cuanto a cantidad de materia orgánica se obtuvo con el nivel a2 que corresponde a 60% de residuos de caña, 0% de azolla y 40% de suelo que al final del proceso tuvo una media de 20.0375%. En base al tipo de microorganismo no se encuentra una diferencia significativa entre los del rumen bovino y los comerciales pero si se observa una interacción entre sus factores.

### Contenido de Carbono Orgánico Total

El carbono es una fuente de energía para los microorganismos. El abono orgánico que se elaboró tiene una gran cantidad de carbono por los residuos de caña de azúcar que lo componen pero al ser un biopolímero complejo su digestión es más lenta y difícil. Es por esto que se colocaron microorganismos celulíticos provenientes del rumen bovino, que son capaces de metabolizar este tipo de celulosa y utilizarla como fuente de energía. Tomando en cuenta que la naturaleza química de los residuos orgánicos determina la clase de organismos activos durante el proceso de descomposición de la materia orgánica (Pérez et al, 2011), se buscó acelerar el proceso de degradación de la celulosa con los microorganismos comerciales y compararlos con los del rumen. En la Figura N°6 se observan los porcentajes promedio de carbono entre réplicas los mismos que al inicio ascienden para luego contenerse.

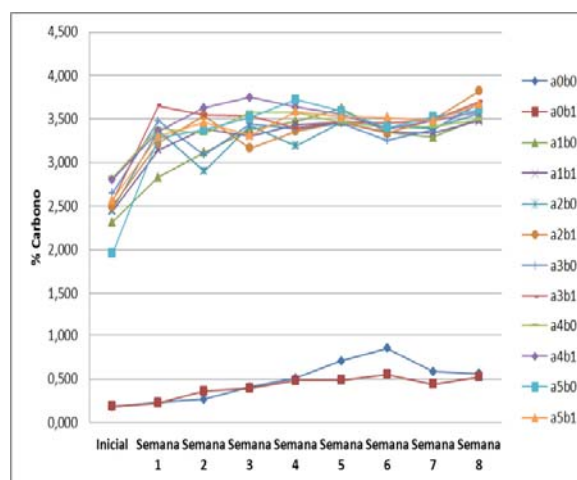


Figura N°6 Carbono promedio entre réplicas del abono orgánico.

En cuanto a contenido de carbono, el mejor nivel es el a2 (60% de residuos de caña, 0% de azolla y 40% de suelo) y el b1 que corresponde a los microorganismos atrapados del rumen, que mostró un 3.821% de carbono, como se observa en la figura N°7.

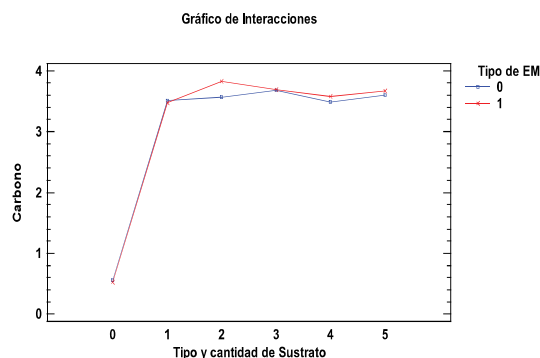


Figura N°7 Interacción e intervalos Tukey HSD al 95 % para el Tipo de microorganismos y el Tipo y cantidad de sustrato en base a Carbono.

### Contenido de Nitrógeno Total

Se determinó el contenido de nitrógeno total en cada tratamiento tomando en cuenta que es uno de los factores más importantes (Cifuentes et al., 2011) para la síntesis proteica. El nitrógeno en este proceso lo aportó la azolla donde el mejor tratamiento fue el a5b1 (15% bagazo, 45% azolla, 40% suelo y microorganismos atrapados del rumen) (figura N°8, Figura N°9) mismo que alcanzó 0.28% de nitrógeno.

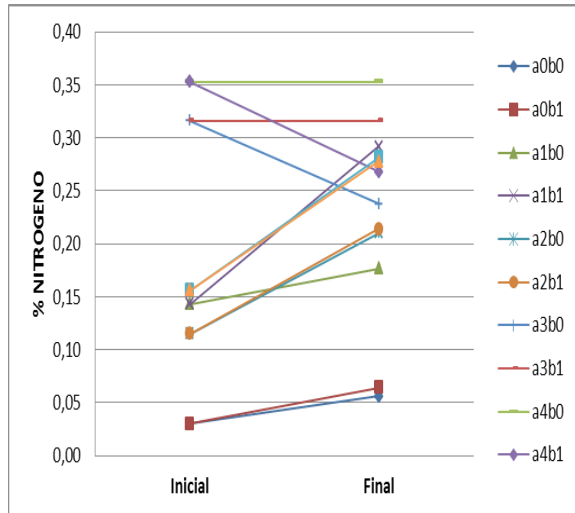


Figura N°8 Nitrógeno promedio entre réplicas del abono orgánico.

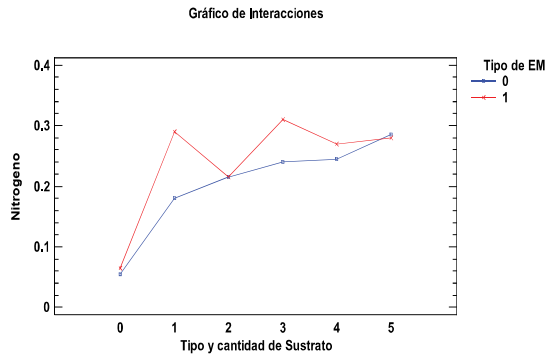


Figura N°9 Interacción e intervalos Tukey HSD al 95 % para el Tipo de microorganismos y el Tipo y cantidad de sustrato en base a Nitrógeno.

### Relación Carbono/Nitrógeno

En la prueba de Tukey para la relación carbono/nitrógeno, los mejores tratamientos para este parámetro son a2b1 (60% de residuos de caña, 0% de azolla y 40% de suelo y microorganismos atrapados del rumen) y a2b0 (60% de residuos de caña, 0% de azolla y 40% de suelo y microorganismos comerciales) existiendo interacción entre los factores y mostrando relaciones 18:1 al final del proceso como se muestra en las figuras N°10 y N°11.

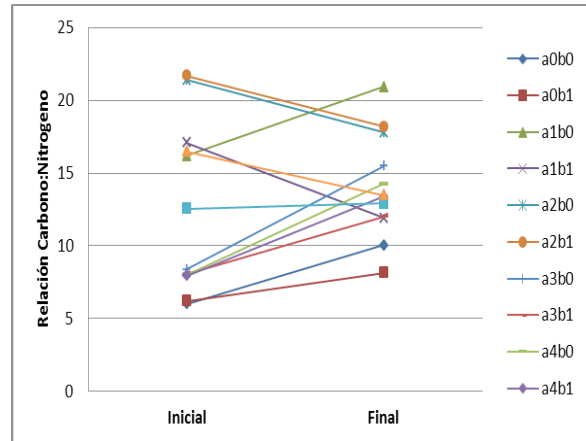


Figura N°10: Relación C/N promedio entre réplicas del abono orgánico.

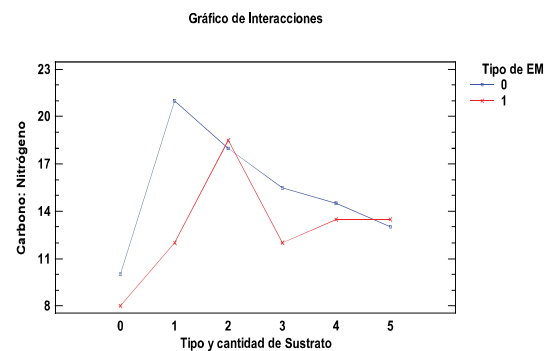


Figura N°11 Interacción e intervalos Tukey HSD al 95 % para el Tipo de microorganismos y el Tipo y cantidad de sustrato en base a la relación Carbono/Nitrógeno.

### Macro y Micro nutrientes del mejor tratamiento

Al analizar el contenido de macro y micronutrientes del tratamiento a2b1 se encuentran C,N,P que son fundamentales para el desarrollo microbiano. El carbono es necesario para la formación del protoplasma, se oxida para producir energía y anhídrido carbónico. El nitrógeno es esencial para la reproducción debido a la naturaleza proteica del protoplasma. El fósforo es fundamental en la formación de compuestos celulares. Los micronutrientes son muy importantes en la síntesis de las enzimas, en el metabolismo y en los mecanismos de transporte intra y extracelulares (Moreno, 2008).

Tabla N° 2 Análisis de macro y micro nutrientes del mejor tratamiento a2b1.

Parámetros	Unidad	Resultado
Hierro	mg/kg	10471,45
Cobre	mg/kg	8,31
Manganeso	mg/kg	131,36
Zinc	mg/kg	22,29
Fósforo	mg/kg	599,82
Potasio	mg/kg	1020,15
Calcio	mg/kg	3528,4
Magnesio	mg/kg	6510,6

Fuente: LABCESTTA, 2014.



La deficiencia de cobre produce manchas cloróticas, pero también puede ser tóxico en niveles elevados por lo que nivel máximo permitido es de 70 ppm. Al igual que la falta de zinc afecta a las hojas jóvenes de la planta y tiene un nivel máximo permitido es de 200 ppm (Soto et al, 2003). La siguiente tabla muestra el contenido de macro y micro nutrientes del tratamiento a2b1 (60% de residuos de caña, 0% de azolla y 40% de suelo y microorganismos atrapados del rumen).

### Prueba de Germinación

Si el porcentaje de germinación es mayor o igual al 80% significa que el compost presenta una baja o nula fitotoxicidad (Pérez et al., 2011). Durante la germinación se determinó que el mayor índice se encontró en los tratamientos a1b1 (0% bagazo, 60% azolla, 40% suelo y microorganismos atrapados del rumen), a2b1 (60% bagazo, 0% azolla, 40% suelo y microorganismos atrapados del rumen), a4b1 (45% bagazo, 15% azolla, 40% suelo y microorganismos atrapados del rumen) y a5b1 (15% bagazo, 45% azolla, 40% suelo y microorganismos atrapados del rumen) todos ellos obtenidos con el uso de rumen bovino.

Tabla N° 3 Porcentajes de germinación promedio de lechuga.

Tratamientos	% de Germinación
a0b0	0
a0b1	0
a1b0	55
a1b1	95
a2b0	10
a2b1	93
a3b0	88
a3b1	80
a4b0	60
a4b1	95
a5b0	68
a5b1	90

### CONCLUSIONES

Los residuos de caña de azúcar, la azolla fueron fácilmente descompuestos y convertidos en compost en un lapso de 8 semanas de iniciado el proceso con la ayuda de microorganismos eficientes, creando las mejores condiciones y cuidando el proceso.

Se elaboraron pilas de 6 kg para cada tratamiento y se colocaron para su descomposición en baldes sellados creando las condiciones adecuadas para los microorganismos eficientes; durante las ocho semanas que duró el proceso se controló temperatura, pH, humedad y se midió materia orgánica, carbono, nitrógeno y relación carbono/nitrógeno.

La mayoría de tratamientos donde se utilizaron diferentes dosificaciones de sustratos presentaron niveles aceptables con respecto a materia orgánica y relación carbono/nitrógeno así como en la prueba de germina-

ción, generando una nueva opción de abono orgánico para uso agrícola.

Para las respuestas experimentales cantidad de materia orgánica y carbono total el mejor tratamiento fue a2b1 (60% de bagazo, 0% azolla, 40% de suelo y microorganismos atrapados), para nitrógeno el mejor fue a5b1 (15% bagazo, 45% azolla, 40% suelo y microorganismos atrapados) y para la relación carbono/nitrógeno el factor a2 (60% de bagazo, 0% azolla, 40% de suelo) fue el mejor, pero no hubo diferencia significativa en los niveles del factor b (b0: microorganismos comerciales; b1: microorganismos atrapados).

El contenido de nutrientes del mejor tratamiento es: Materia orgánica 17.6%; C 3.82%; N 0.21%; C/N 18:1; Fe 10471,45 mg/kg; Cu 8,31 mg/kg; Mn 131,36 mg/kg; Zc 22,29 mg/kg; P 599,82 mg/kg; K 1020,15 mg/kg; Ca 3528,4 mg/kg; Mg 6510,6 mg/kg.

Los tratamientos en que se empleó microorganismos de rumen bovino presentaron porcentajes de germinación más altos que en los que se emplearon microorganismos comerciales, por el grado de madurez alcanzado y la disponibilidad de nutrientes en el abono.

El costo de elaborar el tratamiento a2b1 (60% de bagazo, 0% azolla, 40% de suelo y microorganismos atrapados) fue de 0.52 USD/Kg para lo cual se realizó un análisis de precios unitarios de todo el proceso.

### REFERENCIAS

- Cifuentes, R., León, R. y Porres, C. 2011. Producción de abono orgánico a partir de cachaza y tallos de caña de azúcar recuperados de las carreteras. Revista de la Universidad del Valle de Guatemala. N°23. P. 8-17.
- CORPOICA. 2007. Guía Tecnológica Para El Manejo Integral Del Sistema Productivo de la Caña Panelera. Editor Corpoica. Colombia. 116-117, 137p.
- Gordillo, F., Peralta, E., Chavez, E., Contreras, V., Campuzano, A. y Ruiz, O. 2011. Producción y evaluación del proceso de compostaje a partir de desechos agroindustriales de *Saccharum officinarum* (caña de azúcar). RIA. Vol. 37. N°2. p. 140-149
- Montaño, M. 2009. Desarrollo del recurso Azolla anabaena y aplicaciones en los sectores agrícolas, pecuarios y acuícola. ESPOL-ICQA.
- Moreno, J; Moral, R. 2008. Compostaje. Editorial Mundi-Prensa. Madrid-España. 24, 95, 102p.
- Pérez, M., Sanchez, R., Palma, D. y Salgado, S. 2011. Caracterización química del compostaje de residuos de caña de azúcar en el sureste de México. Inverciencia. vol. 36. N°1. P.45-52.
- Red de Agricultura Natural para la Región Asia/Pacífico. (APNAN). Enero 2004. Disponible en: <http://em.iespana.es/manuales/apnan/apnan.html>.
- Soto, G. y Meléndez, G. 2003. Taller abonos orgánicos. CATIE. Costa Rica. 2-9p.
- Vento, M; Guevara, A; Corrales, I; Chaveli, P; Casañola, A; Valenciano, M y Velasco, M. 2010. Compost a partir de residuos de cosechas y alternativas que mejoran su calidad. Centro Agrícola, Vol 37, no 2, p. 75-80.

# EVALUACIÓN DE SOPORTES SÓLIDOS Y LÍQUIDOS, PARA LA PRODUCCIÓN DE UN BIOFERTILIZANTE A BASE DE *Azospirillum spp.* APLICABLE AL CULTIVO DE MAÍZ (*Zea mays, L.*)

## EVALUATION OF MEDIA SOLIDS AND LIQUIDS, FOR THE PRODUCTION OF A BIOFERTILIZER BASED OF *Azospirillum spp.* APPLICABLE TO THE CULTIVATION OF MAIZE (*Zea mays, L.*)

Yolanda Pallo y Ramiro Velasteguí

Departamento de Maíz, Estación Experimental Santa Catalina, Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Panamericana Sur Km 1 Quito - Ecuador, E-mail: yoly.pallo.b@hotmail.com  
Carrera de Ingeniería Bioquímica, Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos Universidad Técnica de Ambato, Campus Huachi: Av. Los Chasquis y Río Payamino Ambato – Ecuador, E-mail: rvelasteguis@yahoo.com

### RESUMEN

Los biofertilizantes tienen como principio activo microorganismos con la capacidad de influenciar positivamente el crecimiento de las plantas, como es el caso del género *Azospirillum*. Para integrar la bacteria al cultivo, es necesario un medio que le brinde protección y los requerimientos necesarios que la mantengan viable desde el momento de la producción del biofertilizante hasta su aplicación en campo, por lo cual se realizó la evaluación de soportes sólidos y líquidos, para la producción de un biofertilizante a base de la cepa C2-Bolívar de *Azospirillum spp.* aplicable al cultivo de maíz.

Los soportes sólidos empleados fueron: Turba de Chimborazo, Mezcla (Turba de Chimborazo + 1% CaCO<sub>3</sub> + 3% raíz de maíz), Turba con vermiculita, Humus de lombriz, Zeolita y Perlas de alginato, mientras que los soportes líquidos estuvieron conformados por soluciones de: Carboximetilcelulosa, Medio ácido málico-rojo congo, Caldo nutritivo, Medio NFB, Melaza y solución aproximada a un biofertilizante comercial. Se evaluaron doce tratamientos, los cuales estuvieron constituidos por los seis soportes sólidos y seis líquidos, inoculados con la cepa C2-Bolívar de *Azospirillum spp.* se almacenaron a temperatura ambiente durante 180 días, en fundas de aluminio polietileno selladas, con 30 ml del producto cada una.

De acuerdo al análisis estadístico, a los 180 días de almacenamiento, el soporte sólido que mantiene mayor concentración bacteriana es t3: turba con vermiculita, con 5.52x10<sup>8</sup> UFC.g<sup>-1</sup>. Con respecto al soporte líquido, el tratamiento con mayor población bacteriana es t11: Solución de melaza al 2%, con una concentración de 3.86x10<sup>8</sup> UFC.ml<sup>-1</sup>. Un factor determinante, para la selección del mejor soporte, fue el costo de producción, es así que, se descartó la turba con vermiculita, a pesar de ser en la que se alcanzó una mayor concentración bacteriana, puesto que, el costo de producción de 30 ml de biofertilizante fue de 2.11 dólares, y se eligió como mejor soporte sólido a las perlas de alginato con un costo de producción de 1.63 dólares y alternativamente a la mezcla (T. Chimborazo + 1% CaCO<sub>3</sub> + 3% raíz de maíz) con un costo de producción de 1.65 dólares. Como soporte líquido se seleccionó a la solución de melaza al 2%, con un costo de producción de 1.10 dólares la funda de 30 ml de producto. En cuanto al pH y porcentaje de materia orgánica en los tratamientos seleccionados, no existe un cambio altamente significativo durante el almacenamiento.

Palabras clave: Biofertilizante, *Azospirillum spp.*, soportes sólidos y líquidos, almacenamiento, concentración bacteriana.

### SUMMARY

The biofertilizers have microorganisms as active ingredients with the capacity to influence the growth of plants positively, for instance the genus *Azospirillum*. To integrate the bacteria to the crop, it is necessary to use a media that offers it protection and the requirements that maintain it viable from the biofertilizer preparation until their application in the field. That is why two supports solids and liquids were assessed in order to prepare a biofertilizer based on *Azospirillum spp.* to apply to the corn crop.

The solid supports used were: Peat from Chimborazo, Mixture (peat from Chimborazo + 1% CaCO<sub>3</sub> + 3% corn roots), Peat with vermiculite, Worm humus, Zeolite and Alginate pearls, while the liquid supports were solutions of: Carboxymethylcellulose, Congo red-malic acid media, Nutrient broth, NFB media, molasses and a solution

similar to a commercial biofertilizer. Twelve treatments were evaluated, the six solid supports and the six liquid supports, inoculated with a strain C2-Bolívar of *Azospirillum* spp. and they were stored at air temperature during 180 days within aluminum polyethylene bags containing each 30 ml.

According to statistical analysis, at 180 days of storage, the solid support that maintains greater bacterial concentration was t3: peat with vermiculite, with  $5.52 \times 10^8$  UFC.g-1. In the liquid support, the treatment with more bacterial population is t11: solution of molasses 2%, with a concentration of  $3.86 \times 10^8$  UFC.ml-1. The cost of the treatments was a very important factor, because of this peat with vermiculite was discarded, although the bacterial concentration was high but the cost of 30 ml of biofertilizer was 2.11 dollars. The best solid support was alginate pearls with a production cost of 1.63 dollars and also the mixture peat from Chimborazo + 1% CaCO<sub>3</sub> + 3% corn roots) with a production cost of 1.65 dollars. Among liquid supports there were selected the solution of molasses 2%, with a production cost of 1.10 dollars. About the pH parameter as well as the percentage of organic matter there were no significant change during the storage.

Keywords: Biofertilizer, *Azospirillum* spp., solid and liquid support, storage, bacterial concentration.

## INTRODUCCIÓN

Uno de los retos más importantes para la agricultura es reducir el empleo de fertilizantes nitrogenados y el costo económico, sin que se afecte la productividad del cultivo. Los biofertilizantes representan una alternativa real para alcanzar estos objetivos (Saura G., 2000).

Una de las bacterias promotoras de crecimiento más empleadas a nivel mundial, para la producción de biofertilizantes es *Azospirillum* por su capacidad de producir auxinas, citocininas y giberelinas, el mecanismo analizado con mayor amplitud ha sido la producción de auxinas, especialmente la del ácido indolacético (AIA) que puede modificar el contenido de fitohormonas de las plantas conduciendo a la estimulación del crecimiento de las mismas (Thuler D. et al., 2003). Actualmente, existen en el mercado mundial, inoculantes de *Azospirillum* en soporte de vermiculita, que se venden en Italia y *Azospirillum lipoferum* microgranulado, registrado en Francia (Saura G., 2000). El principal obstáculo es que el suelo es heterogéneo y tiene un ambiente imprevisible. Los inoculantes bacterianos tienen que competir con la microflora nativa que está más adaptada a las diferentes condiciones del suelo (Bashan Y., 1998). La falta de tecnologías accesibles para los pequeños agricultores maiceros de la sierra ecuatoriana, ha acentuado la pobreza del sector rural, provocando que abandonen el campo poniendo en peligro la seguridad alimentaria de ésta región (Yáñez C. et al., 2003). Dicha problemática impulsó al Programa de Maíz del INIAP-EESC, a desarrollar la caracterización y selección de la bacteria diazotrófica *Azospirillum* spp., asociada con el maíz de altura, de donde se obtuvieron nueve cepas de *Azospirillum* spp. caracterizadas fenotípicamente (Espinoza L., 2004), cuya eficiencia fue evaluada en campo, utilizando como medio transportador la Turba de Chimborazo, en la cual, se evaluó la sobrevivencia de la bacteria por un mes de almacenamiento en condiciones de laboratorio (Yáñez C. et al., 2003), mientras que de acuerdo al SENASA (Servicio Nacional de Sanidad Agraria, Argentina) el tiempo promedio de almacenamiento es de seis meses para soportes de turba (Perticari A., 2006). En la actualidad, la distribución del biofertilizante a base de cepas nativas de *Azospirillum*, no es posible, puesto que, no se han evaluado

soportes a nivel nacional que garanticen al agricultor la efectividad de la bacteria al momento de ser inoculada en campo, además el mercado exige que los inoculantes sean tan baratos como sea posible, el costo de desarrollar un nuevo material inoculante rápidamente mueve el precio fuera del rango de su uso práctico en agricultura, especialmente en países en desarrollo (Díaz A. y Mayek N., 2008) por tal motivo es indispensable la evaluación de soportes sólidos y líquidos para la producción de un biofertilizante a base de *Azospirillum* spp. que se encuentre al alcance del productor de maíz de la sierra ecuatoriana.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Reactivación y purificación de cepas liofilizadas.

Para la reactivación se colocó 1 ml de peptona al 1%, en el tubo eppendorf que contenía a la cepa C2-Bolívar liofilizada, se agitó hasta homogenizar la mezcla y se inoculó 50 µl en cajas petri con medio Ácido Málico – Rojo Congo sólido, mediante la técnica de dispersión en placa, luego se incubó a 32°C por 7 días, tiempo en el cual se observaron colonias de *Azospirillum* spp. de color rojo escarlata intenso, dichas colonias se aislaron mediante estriado compuesto en cajas Petri con medio Ácido Málico – Rojo Congo sólido, para finalmente incubarlas por 7 días a 32°C y obtener colonias puras de la bacteria.

### Reactivación de la cepa a partir de raíces de maíz

Previamente se pregerminaron las semillas de maíz INIAP 101 desinfectadas, dentro de cajas Petri con papel toalla estéril y se incubaron a 25°C durante 3 días y se sembraron en sustrato estéril.

Se preparó inoculante líquido con la cepa C2-Bolívar, con una concentración aproximada de  $1 \times 10^7$  UFC.ml-1 (Primavesi A., 1982), de ésta suspensión se inocularon 5 ml en cada planta (Alcántar G. et al., 1998) y se las mantuvo bajo invernadero durante 6 semanas, el riego se realizó de forma periódica con agua común estéril.

Transcurrido este tiempo, se extrajeron las plantas y se lavaron las raíces con agua común estéril, se las dejó secar a temperatura ambiente durante 24 horas, se las cortó en trozos muy pequeños y partiendo con 1 g de

éstas, se prepararon diluciones seriadas hasta  $1 \times 10^{-10}$  para sembrar 0.3 ml en tubos con 6ml de medio específico semisólido libre de nitrógeno NFB (nitrogen fixation biological) luego de 14 días a  $30^{\circ}\text{C}$  en incubación se consideraron como tubos con crecimiento bacteriano positivo aquellos cuyo medio de cultivo se tornó azul y presentaron una leve película blanquecina a 2-3 mm por debajo de la superficie del medio de cultivo, de ellos se tomó alícuotas para estriarlas en medio ácido málico rojo congo, ya que las colonias de *Azospirillum* en este medio deben tornarse de color rojo oscuro o escarlata. Para ratificar que el nuevo cultivo corresponde a *Azospirillum* spp. se realizaron pruebas Bioquímicas.

### **Producción de suspensión bacteriana**

Con la ayuda de un asa de transferencia se retiraron colonias bacterianas aisladas de un estriado compuesto y se colocaron en una botella con 40 ml de caldo nutritivo.

La cepa se propagó en agitación rotatoria a 120 rpm a  $19^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas (Fallick et al., 1988). En un espectrofotómetro a 540 nm. se midió la densidad celular de una muestra y se obtuvo un valor de 1 en absorbancia, según lo descrito por Bashan, 1997, este valor equivale aproximadamente a  $1 \times 10^9$  UFC.ml-1, esta suspensión bacteriana se diluyó hasta  $1 \times 10^7$  UFC.ml-1 en solución salina al 0.85% estéril.

### **Preparación de inoculantes sólidos**

Los diferentes materiales se secaron a  $40^{\circ}\text{C}$  por dos días, se molieron y tamizaron, para posteriormente preparar los soportes que se emplearon para los tratamientos sólidos. El empacado se realizó en fundas de aluminio polietileno y en cada una de ellas se depositó 30ml del material procesado (se prepararon veinte y cinco fundas de cada tratamiento, de las cuales se utilizaron cinco para cada evaluación de datos). Las fundas selladas fueron esterilizadas en el Departamento de Ciencias Nucleares de la Escuela Politécnica Nacional, mediante aceleración de electrones. La impregnación del inoculante líquido en los soportes sólidos se realizó mediante la inyección de suspensión bacteriana con una concentración de  $1 \times 10^7$  UFC.ml-1 (Yáñez et al., 2004), el volumen de inóculo líquido que se inyectó, fue de acuerdo al soporte utilizado, (20 ml por cada 50 g de soporte sólido) las fundas fueron nuevamente selladas y los soportes inoculados se incubaron a  $30^{\circ}\text{C}$  por 8 días, período en el cual se realizaron movimientos con el fin de homogenizar el material, transcurrido este tiempo se refrigeró a  $4^{\circ}\text{C}$  por 8 días (Espinoza, 2004), finalmente fueron almacenados a temperatura ambiente.

Para la preparación del tratamiento de zeolita liofilizada se procedió de la misma manera que en los casos anteriores, hasta los 8 días en refrigeración, luego de éste tiempo se abrieron las fundas asépticamente, se cubrieron con papel filtro estéril y se colocaron en el

liofilizador durante 24 horas. Transcurrido éste periodo se sellaron las fundas y fueron almacenadas a temperatura ambiente.

Para la Inmovilización de células se preparó Alginato de Sodio al 2%, y se mezcló con la suspensión de células bacterianas. Con la ayuda de una jeringa se tomaron alícuotas de la mezcla alginato/células y se dejaron caer en cloruro de calcio a 0.2 Molar, las esferas obtenidas se mantuvieron en reposo por 30 minutos (Pérez A. et al., 2002) y se empacó la cantidad correspondiente a 30 ml en cada funda de aluminio polietileno estéril.

### **Preparación de inoculantes líquidos**

Se eligieron como soportes líquidos a las siguientes soluciones: Carboximetilcelulosa, medio de cultivo Acido málico-rojo congo, caldo nutritivo, NFB, melaza y solución aproximada a biofertilizante comercial. Para conocer la concentración a la cual se debían preparar éstas soluciones se realizaron curvas de crecimiento:

Concentración de la solución vs. UFC.ml-1 y así se determinó:

- Solución de Carboximetilcelulosa al 5%
- Solución del medio ácido málico-rojo congo al 35%
- Solución de Caldo nutritivo al 70%
- Solución del medio NFB al 70%
- Solución de melaza al 2%

Una vez preparados los soportes líquidos, se empacaron 27 ml de cada uno, en fundas de aluminio polietileno y se esterizaron a  $121^{\circ}\text{C}$  a 15 psi durante 15 minutos (se prepararon veinte y cinco fundas de cada tratamiento, de las cuales se utilizarán cinco para cada evaluación de datos).

Se preparó la suspensión bacteriana con una concentración de  $1 \times 10^9$  UFC.ml-1. Posteriormente en un tubo de ensayo estéril se colocó 1 ml de la propagación bacteriana y 9 ml del soporte líquido, obteniéndose una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC.ml-1, de ésta dilución se transfirieron 3 ml a cada funda de aluminio polietileno estéril con 27 ml de la solución líquida correspondiente (de tal manera que se obtiene una concentración inicial de  $1 \times 10^7$  UFC.ml-1), se sellaron e incubaron a  $30^{\circ}\text{C}$  por 8 días, una vez transcurrido este tiempo se refrigeraron a  $4^{\circ}\text{C}$  por 8 días y finalmente se almacenaron a temperatura ambiente.

La preparación de la solución en base al biofertilizante comercial partió del análisis de minerales totales, nitrógeno total y pH del producto comercial NoctinAzo y de acuerdo a los resultados obtenidos se preparó una solución semejante a esta.

## **MÉTODOS DE EVALUACIÓN**

### **Sobrevivencia**

Para la evaluación de la sobrevivencia de *Azospirillum*

spp.se realizaron diluciones a partir de cada soporte inoculado, desde 1x10<sup>-2</sup> hasta 1x10<sup>-7</sup>. De cada dilución se sembró 0.1 ml en una caja Petri con medio Ácido Máfico - Rojo Congo y transcurridos 7 días de incubación a 30°C se determinó la presencia de la bacteria *Azospirillum* spp. mediante conteo en placa (Rodríguez y Cáceres, 1982).

En el caso del tratamiento de perlas de alginato, se cuantificaron las células encapsuladas disolviendo 1 g de esferas en citrato de sodio a 0.1 Molar, a partir del cual se realizaron diluciones, desde 1x10<sup>-2</sup> hasta 1x10<sup>-7</sup> en tubos con 9 ml de solución salina al 0.85% (Pérez et al., 2002) y se procedió de igual manera que en los casos anteriores hasta el conteo en placa.

Para realizar las curvas de crecimiento, se transformaron las concentraciones bacterianas obtenidas a logaritmos naturales y se graficó: Ln UFC.g-1 o Ln UFC.ml-1 vs. Tiempo de almacenamiento. Además se calcularon datos de cinética bacteriana, de acuerdo a Pisabarro, 2009, utilizando las siguientes ecuaciones:

$$\text{Tasa de crecimiento: } \mu = \frac{\text{Ln}N - \text{Ln}N_0}{t}$$

$$\text{Tasa de Muerte: } k = \frac{\text{Ln}N - \text{Ln}N_0}{t}$$

$$\text{Número de generación: } g = \frac{\mu * t}{\text{Ln}(2)}$$

$$\text{Tiempo de generación: } T = \frac{t}{g}$$

Donde:

- $\mu$ : Tasa de crecimiento
- $N$ : Número final de unidades formadoras de colonias
- $N_0$ : Número inicial de unidades formadoras de colonias
- $t$ : tiempo
- $k$ : Tasa de muerte
- $g$ : Número de generaciones
- $T$ : Tiempo de generación

### pH

El pH se determinó pesando 10 ml de cada soporte sólido inoculado al cual se le agregó 25 ml de agua destilada. Se empleó un pH-metro previamente calibrado. En el caso de los inoculantes líquidos se midió directamente en la solución (ISO 10390, 2005).

### Porcentaje de materia orgánica en soportes sólidos

Para la determinación de materia orgánica, se empleó un crisol previamente esterilizado y pesado, donde se depositaron 3 g. de soporte (Peso 1), luego se introdujo en la mufla a 600°C durante 6 horas y se reportó un peso final (Peso 2) (Steugbing L. et al., 2001):

### Porcentaje de contaminación

Esta variable se evaluó contabilizando el número total

de colonias que se presentaron en las cajas empleadas para la prueba de sobrevivencia, el cual representó el 100% de la población, posteriormente se contó el número de colonias que no pertenecieron al género *Azospirillum*, que correspondió al porcentaje de contaminación.

### Análisis Post-Evaluación

#### Pruebas Bioquímicas

Se realizaron las siguientes pruebas Bioquímicas: Tinción de Gram y Forma celular, Presencia de la enzima catalasa, Motilidad, Fijación de nitrógeno y Presencia de Poli- $\beta$ -hidroxibutirato con la finalidad de confirmar que la población bacteriana obtenida al finalizar el tiempo de almacenamiento, corresponde a la cepa inicialmente inoculada.

#### Análisis de costos de producción

Se evaluó el costo de producción de los tratamientos que presentaron una población igual o superior a 1x10<sup>7</sup> UFC.ml-1. Aplicando la siguiente fórmula:

$$CP = MPD + MOD + CIF$$

Donde:

- CP: Costo de producción
- MPD: Materia prima directa
- MOD: Mano de obra directa
- CIF: Costos indirectos de fabricación

(Naranjo J. y Naranjo M., 2003)

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Evaluaciones de soportes sólidos y líquidos durante seis meses de almacenamiento

#### Sobrevivencia de *Azospirillum* spp.

Las diferentes concentraciones obtenidas en las pruebas de sobrevivencia en tratamientos sólidos y líquidos fueron transformadas a Ln UFC.g-1 (Tabla N.1) o Ln UFC.ml-1 (Tabla N.2), según corresponda y se realizaron curvas de crecimiento, Figura N.1 y Figura N.2.

### Evaluaciones de soportes sólidos y líquidos durante seis meses de almacenamiento.

Tabla N.1. Ln de la Concentración de *Azospirillum* spp. (Ln UFC.g-1) en soportes sólidos durante 180 días de almacenamiento

Soportes sólidos	0 días	45 días	90 días	135 días	180 días
*t1	23.455	24.253	20.143	16.118	13.775
*t2	20.723	20.277	20.277	19.707	17.281
*t3	19.902	22.993	21.277	20.454	20.129
*t4	21.607	24.310	16.811	16.455	16.118
*t5	20.703	19.856	16.907	16.231	16.176
*t6	19.519	21.512	18.534	18.315	17.910

\*t1: Turba de Chimborazo; \*t2: Mezcla; \*t3: Turba con vermiculita; \*t4: Humus de lombriz; \*t5: Zeolita liofilizada; \*t6: Perlas de alginato

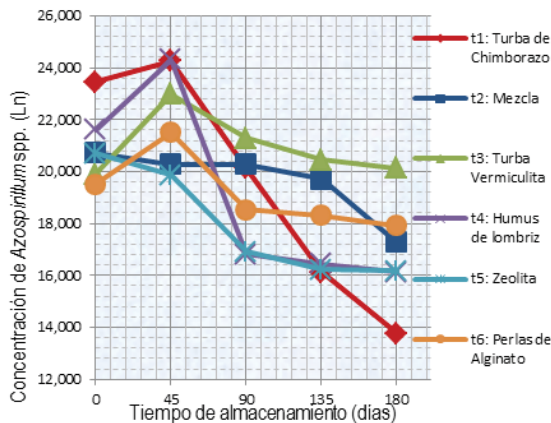


Figura N. 1. Gráfico de las curvas de crecimiento de cepa C2- Bolívar de Azospirillum spp. en soportes sólidos durante seis meses de almacenamiento.

Tabla N.2. Ln de la Concentración de Azospirillum spp. en soportes líquidos durante 180 días de almacenamiento.

Soportes	0 días	45 días	90 días	135 días	180 días
Líquidos					
*t7	24.296	19.450	18.440	18.421	18.005
*t8	24.536	19.702	18.005	17.974	16.994
*t9	22.100	17.687	17.644	17.600	17.217
*t10	19.209	21.168	19.376	19.361	18.891
*t11	19.519	21.599	19.989	19.766	19.771
*t12	22.004	21.987	18.035	18.035	17.644

\*t7: Solución de Carboximetilcelulosa 5%;  
 \*t8: Solución de Medio Ácido málico rojo congo 35%;  
 \*t9: Solución de Caldo Nutritivo 70%; \*t10: Solución de Medio NFB 70%;  
 \*t11: Solución de melaza 2%;  
 \*t12: Solución aproximada a biofertilizante comercial

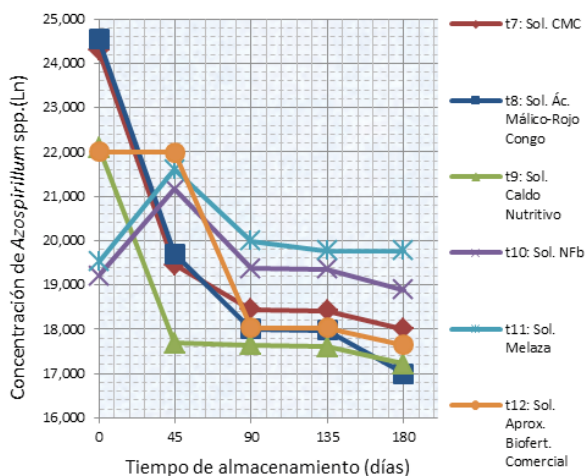


Figura N.2. Gráfico de las curvas de crecimiento de cepa C2-Bolívar de Azospirillum spp. en soportes líquidos durante seis meses de almacenamiento

Como se puede apreciar en la Figura N.1 y Figura N.2, en ninguno de los soportes la bacteria presenta fase de latencia, esto se debe a que la suspensión bacteriana se inoculó en fase de crecimiento exponencial, donde el microorganismo estuvo adaptado al medio inicial (Cal-

do Nutritivo) y al inocularlo en los diferentes soportes se enfrenta a un variante de nutrientes y condiciones medioambientales, que al ser favorables se traducen a un crecimiento exponencial al inicio del almacenamiento, por otra parte, en los soportes que cuentan con concentraciones de nutrientes y condiciones medioambientales contraproducentes, con respecto al caldo nutritivo inicial, la población bacteriana decrece desde el inicio del almacenamiento, dando lugar a una fase de declive o muerte.

De acuerdo a las curvas de crecimiento realizadas, la bacteria se encuentra mayor tiempo en fase de declive que en una fase de crecimiento exponencial, sin identificarse las fases de latencia y estacionaria este comportamiento no significa que la bacteria haya perdido su viabilidad para actuar en campo, ya que, según lo señalado por Willey J. et al., 2008, el hecho que el microorganismo se halle en fase de muerte, no quiere decir que las células hayan perdido irreversiblemente su capacidad para reproducirse, únicamente, en esta fase los microorganismos son temporalmente incapaces de crecer, en este caso, bajo las condiciones que le brinda el soporte dentro de la bolsa sellada, a temperatura ambiente, y una vez que la bacteria es expuesta a condiciones apropiadas, al momento de la inoculación, el microorganismo reanuda su crecimiento.

Tabla N.3. Resultados de la cinética del desarrollo bacteriano en soportes sólidos

Soportes sólidos	Tasa de crecimiento ( $\mu$ =día <sup>-1</sup> )	Número de generaciones (g)	Tiempo de generación (T=día)	Tasa de muerte (k=día <sup>-1</sup> )
*t1	0.0177	1.1514	39.0815	-0.0834
*t2	0	0	0	-0.0307
*t3	0.0687	4.4594	10.0910	-0.0251
*t4	0.0601	3.8997	11.5393	-0.0859
*t5	0	0	0	-0.0308
*t6	0.0443	2.8745	15.6551	-0.0366

\*t1: Turba de Chimborazo; \*t2: Mezcla;  
 \*t3: Turba con vermiculita; \*t4: Humus de lombriz;  
 \*t5: Zeolita liofilizada; \*t6: Perlas de alginato

En cuanto a la cinética del desarrollo bacteriano en soportes sólidos, de acuerdo a la Tabla N.3. en el tratamiento t3, la bacteria crece con mayor rapidez, con un tiempo por generación de 10.09 días, ocurriendo 4.46 generaciones durante los primeros 45 días de almacenamiento, que constituyen la fase de crecimiento exponencial, mientras que en los siguientes 135 días de almacenamiento, la tasa de muerte es de 0.0251 día<sup>-1</sup>, siendo la menor entre los seis tratamientos sólidos, constituyendo la mejor alternativa, para mantener la sobrevivencia de la bacteria durante el almacenamiento. En el caso de los tratamientos t2 y t5, no existe una fase exponencial, por lo tanto la tasa de crecimiento, número y tiempo de generación es cero, únicamente presenta fase de declive, con una tasa de muerte de 0.0307 en el tratamiento t2 y 0.0308 en el tratamiento t5. Con respecto al tratamiento t1, es el que presenta menor rapi-

dez de crecimiento bacteriano en la fase exponencial, requiriendo 39.08 días para producir una nueva generación, es así que a los 45 días de almacenamiento, se generan 1.15 generaciones, presentando a continuación una tasa de muerte de 0.0834 día<sup>-1</sup> que es la más alta junto a la del humus de lombriz. En el tratamiento t6, ocurren 2.87 generaciones bacterianas en los 45 días de la fase exponencial, con un tiempo por generación de 15.66 días. Pasando a la fase de declive con una tasa de muerte de 0.0366 día<sup>-1</sup>.

Tabla N.4. Resultados de la cinética del desarrollo bacteriano en soportes líquidos

Soportes líquidos	Tasa de crecimiento (μ=día <sup>-1</sup> )	Número de generaciones (g)	Tiempo de generación (T=día)	Tasa de muerte (k=día <sup>-1</sup> )
*t7	0	0	0	-0,0592
*t8	0	0	0	-0,0659
*t9	0	0	0	-0,0508
*t10	0,0435	2,8260	15,9237	-0,0187
*t11	0,0462	3	15	-0,0191
*t12	0	0	0	-0,0308

\*t7: Solución de Carboximetilcelulosa 5%;

\*t8: Solución de Medio Ácido málico rojo congo 35%;

\*t9: Solución de Caldo Nutritivo 70%;

\*t10: Solución de Medio NFB 70%;

\*t11: Solución de melaza 2%;

\*t12: Solución aproximada a biofertilizante comercial

De acuerdo a los resultados obtenidos en la cinética de la cepa C2-Bolívar en soportes líquidos, Tabla N.4, los tratamientos t7, t8, t9 y t12, no presentan fase exponencial, por lo tanto, es nula, la tasa de crecimiento, número y tiempo de generación, presentando únicamente fase de declive, durante los 180 días de almacenamiento, donde el tratamiento t8, muestra la mayor tasa de muerte, 0.0659 días<sup>-1</sup>, seguida del tratamiento t7, 0.0592 días<sup>-1</sup>, posteriormente el tratamiento t9, con una tasa de muerte de 0.0508 días<sup>-1</sup>, y finalmente el tratamiento t12 con 0.0308 días<sup>-1</sup>. Mientras que en el tratamiento t10, ocurren 2.826 generaciones en los 45 días de la fase exponencial, empleando 15.92 días para dar lugar a cada nueva generación, atravesando la fase de declive los siguientes 135 días de almacenamiento, con una tasa de muerte de 0.0187 días<sup>-1</sup>, siendo la menor entre los seis soportes líquidos evaluados. En el tratamiento t11, se desarrolla con mayor rapidez, con un tiempo por generación de 15 días, dando lugar a 3 generaciones en los primeros 45 días de almacenamiento que equivale a la fase de crecimiento exponencial, continuando con la fase de declive, con una tasa de muerte de 0.0191 días<sup>-1</sup> que es prácticamente igual a la del tratamiento t10. Consecuentemente los tratamientos más recomendables para la producción de un biofertilizante líquido, son la Solución de NFB al 70% y la de Melaza al 2%.

### pH

Los promedios de los pHs obtenidos durante los 180 días de almacenamiento en los soportes sólidos y líquidos se indican en la Tabla N.5, donde se aprecia en ge-

neral que el metabolismo bacteriano tiende a acidificar el medio. La mayor parte de las bacterias muestra una tasa de crecimiento óptimo en el rango de pH entre 6.5 y 7.5. Sin embargo, las bacterias son capaces de desarrollarse en forma correcta con un pH entre 4.0 y 10.0 (Rodríguez D. et al., 2004).

Tabla N.5. Promedio de pHs de cada tratamiento sólido y líquido durante 180 días de almacenamiento

Tratamientos	Tiempo de Almacenamiento				
	0 días	45 días	90 días	135 días	180 días
*t1	4,35	4,30	4,27	4,20	4,35
*t2	6,22	6,18	5,96	6,09	6,17
*t3	6,46	6,57	6,60	6,45	6,63
*t4	7,25	7,53	7,73	7,53	7,49
*t5	7,88	7,66	7,61	7,56	7,55
*t6	6,89	6,68	6,56	6,54	6,60
*t7	6,41	6,51	6,44	6,26	6,23
*t8	8,28	8,11	7,69	7,64	7,35
*t9	7,74	7,68	7,49	7,42	7,41
*t10	8,19	8,17	8,03	7,69	7,67
*t11	4,16	4,06	4,17	4,05	3,98
*t12	7,02	7,00	6,93	6,93	6,75

\*t1: Turba de Chimborazo; \*t2: Mezcla; \*t3: Turba con vermiculita;

\*t4: Humus de lombriz; \*t5: Zeolita liofilizada; \*t6: Perlas de alginato;

\*t7: Solución de Carboximetilcelulosa 5%;

\*t8: Solución de Medio Ácido málico rojo congo 35%;

\*t9: Solución de Caldo Nutritivo 70%;

\*t10: Solución de Medio NFB 70%;

\*t11: Solución de melaza 2%;

\*t12: Solución aproximada a biofertilizante comercial

De acuerdo al análisis de varianza, no se identificó una diferencia altamente significativa en los tratamientos t1, t2, t3, t4, t6, t7, t9, t10 y t11, mientras que en los tratamientos t5, t8 y t12, se puede apreciar una leve acidificación en cada soporte.

La conservación del rango de pH en los tratamientos: t1, t2, t3, t4 y t6, se debe a que cuentan con un alto porcentaje de materia orgánica, proporcionándole al soporte una mayor capacidad tampón, estabilizando de ésta manera el pH, ante los productos del metabolismo microbiano (Binato A., 2001 Citado por Estrada G., 2008).

### Porcentaje de materia orgánica en soportes sólidos

En la Tabla N.6. se aprecian los promedios de los porcentajes de materia orgánica en cada tratamiento durante 180 días de almacenamiento, donde se observa que el tratamiento t3: Turba con vermiculita, presenta el más alto porcentaje de materia orgánica, seguido del t4: Humus de lombriz, luego el tratamiento t1: Turba de Chimborazo y con menor porcentaje de materia orgánica el t2: Mezcla, estos resultados tienen una relación directamente proporcional con las tasas de crecimiento, es decir, a mayor porcentaje de materia orgánica, el microorganismo presenta una mayor tasa de crecimiento. Al relacionar el pH con el porcentaje de materia orgánica

nica, se afirma que los niveles altos de materia orgánica contribuyen al mantenimiento constante del pH, lo que se aprecia en los tratamientos t1-t4, que al ser materiales provenientes de la descomposición de desechos orgánicos, su nivel de materia orgánica es elevado, mientras que en el t5, al ser un material netamente mineral, su porcentaje de materia orgánica, es nulo, y prácticamente, los resultados obtenidos en este soporte, corresponden a la masa bacteriana existente.

Tabla N.6. Promedio de porcentaje de materia orgánica de cada tratamiento sólido durante 180 días de almacenamiento

Tratamientos	Tiempo de almacenamiento				
	0 días	45 días	90 días	135 días	180 días
*t1	49,33	48,95	48,84	47,38	47,69
*t2	48,46	47,76	47,76	47,69	47,67
*t3	84,81	84,48	84,49	84,50	84,44
*t4	54,57	54,01	53,80	53,59	53,58
*t5	9,54	9,36	9,30	9,41	9,39

\*t1: Turba de Chimborazo; \*t2: Mezcla; \*t3: Turba con vermiculita; \*t4: Humus de lombriz; \*t5: Zeolita liofilizada

Al realizar el análisis de varianza, para el porcentaje de materia orgánica, en cada uno de los tratamientos sólidos inoculados (t1-t5), durante los 180 días de almacenamiento, no se evidencia una diferencia altamente significativa, lo que quiere decir que el porcentaje de materia orgánica se mantiene prácticamente constante durante el almacenamiento.

### Porcentaje de contaminación

En el transcurso de los seis meses de almacenamiento, no se apreció contaminación, únicamente irregularidad en el borde, elevación y consistencia de ciertas colonias, las cuales se confirmaron como *Azospirillum* spp. mediante pruebas Bioquímicas realizadas al finalizar la investigación.

### Análisis Post-Evaluación

#### Pruebas Bioquímicas

A los posibles *Azospirillum* o contaminaciones se las identificó como PA1, PA2, PA3, PA4 y PA5, se las aisló en medio ácido málico-rojo congo, luego en medio agar nutriente, para finalmente realizar pruebas bioquímicas, con la finalidad de descartar una posible contaminación. Los resultados se indican en la Tabla N.7.

Tabla N.7. Pruebas Bioquímicas realizadas a posibles *Azospirillum* spp

Pruebas Bioquímicas	Posibles <i>Azospirillum</i> spp. (PA)				
	PA1	PA2	PA3	PA4	PA5
Tinción de gram	-	-	-	-	-
Forma celular	Bacilar	Bacilar	Bacilar	Bacilar	Bacilar
Motilidad	+	+	+	+	+
Fijación de Nitrógeno	+	+	+	+	+
Presencia de Poli-β-hidroxibutirato	+	+	+	+	+

Fuente: Yolanda Pallo. Laboratorio de microbiología de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato.

De acuerdo a las pruebas bioquímicas realizadas, se descarta totalmente que se trate de contaminación, estas variaciones se atribuyen al estrés que se enfrentan las células al ser sometidas a condiciones limitadas de nutrientes. Es así que la presencia de Poli-β-hidroxibutirato, es muy notable, este polímero es generado por la célula como medio de protección ante la falta de humedad del medio, sirviendo como almacén de Carbono y energía (Okon Y. e Itsigsohn R., 1992). Análisis de costos de producción de los mejores tratamientos.

Se han considerado como mejores tratamientos aquellos que han alcanzado una concentración igual o superior a  $1 \times 10^7$  UFC.ml<sup>-1</sup> a los seis meses (180 días) de almacenamiento, puesto que, a esta concentración es factible su inoculación en campo, de acuerdo a Okon y Gonzales, 1994.

Tabla N. 8. Resumen de costos de producción de tratamientos sólidos que han alcanzado una población bacteriana igual o mayor a  $1 \times 10^7$ UFC.g<sup>-1</sup> a los 180 días de almacenamiento.

Tratamientos	Materia prima directa	Mano de obra directa	Costos indirectos de fabricación					Costo total de 25 fundas de 30ml c/u	Costo / 30ml biofertilizante	
			Reactivos	Insumos	Material/laboratorio	Equipos	Servicios básicos			Esterilización/ soportes
*t2	0.23	22.00	2.98	10.44	0.09	3.65	1.44	0.31	41.13	1.65
*t3	2.00	31.90	2.98	10.44	0.09	3.69	1.44	0.135	52.67	2.11
*t4	0.55	22.00	2.98	10.44	0.09	3.66	1.44	0.31	41.49	1.66
*t5	1.20	17.60	2.98	13.57	0.09	4.22	1.71	0.31	41.68	1.67
*t6	3.24	18.70	2.98	10.44	0.11	3.74	1.51		40.71	1.63

\*t2: Mezcla; \*t3: Turba con vermiculita; \*t4: Humus de lombriz; \*t5: Zeolita liofilizada; \*t6: Perlas de alginato

Tabla N. 9. Resumen de costos de producción de tratamientos líquidos que han alcanzado una población bacteriana igual o mayor a  $1 \times 10^7$ UFC.ml<sup>-1</sup> a los 180 días de almacenamiento.

Tratamientos	Materia prima directa	Mano de obra directa	Costos indirectos de fabricación					Costo total de 25 fundas de 30ml c/u	Costo / 30ml biofertilizante
			Reactivos	Insumos	Material/laboratorio	Equipos	Servicios básicos		
*t7	12.00	8.80	2.98	10.44	0.11	3.60	1.44	39.37	1.57
*t8	0.81	8.80	2.98	10.44	0.11	3.60	1.44	28.17	1.13
*t9	1.26	8.80	2.98	10.44	0.11	3.60	1.44	28.63	1.15
*t10	2.25	8.80	2.98	10.44	0.11	3.60	1.44	29.62	1.18
*t11	0.03	8.80	2.98	10.44	0.11	3.60	1.44	27.40	1.10
*t12	0.96	8.80	2.98	10.44	0.11	3.60	1.44	28.33	1.13

\*t7: Solución de Carboximetilcelulosa 5%; \*t8: Solución de Medio Ácido málico rojo congo 35%; \*t9: Solución de Caldo Nutritivo 70%; \*t10: Solución de Medio NFB 70%; \*t11: Solución de melaza 2%; \*t12: Solución aproximada a biofertilizante comercial

De acuerdo al análisis de costos de producción, cuyos resultados se indican en la Tabla N.8 y N.9, el tratamiento sólido que presenta menor costo de producción



es el t6, con un valor de 1.63 dólares, seguido por el tratamiento t2, con un costo de 1.65 dólares, mientras que el más costoso, es el t3, con un costo que asciende a los 2.11 dólares. Entre los tratamientos líquidos el biofertilizante a base de *Azospirillum* spp. soportado en solución de melaza al 2%, es el tratamiento más conveniente, con un costo de 1.10 dólares.

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

De los doce soportes evaluados, únicamente en t1: Turba de Chimborazo no se obtiene una concentración igual o superior a  $1 \times 10^7$  UFC.g-1 o UFC.ml-1, a los seis meses de almacenamiento (concentración adecuada para la aplicación en campo), por otra parte al tomar en cuenta los costos de producción, se descarta la Turba con vermiculita, a pesar de ser en la que se alcanza una mayor concentración bacteriana, puesto que, el costo de producción de 30 ml de biofertilizante es de 2.11 dólares, y se elige como mejor soporte sólido a las perlas de alginato con un costo de producción de 1.63 dólares y alternativamente a la mezcla (Turba de Chimborazo + 1% CaCO<sub>3</sub> + 3% raíz maíz) con un costo de producción de 1,65 dólares. Como soporte líquido se selecciona a la solución de melaza al 2%, con un costo de producción de 1.10 dólares la funda de 30 ml de producto.

### REFERENCIAS

ALCÁNTAR, G., ALMARAZ, J., DÍAZ, P. y FERRERA, R. 1998. Inoculación de bacterias promotoras de crecimiento en lechuga. *Terra*. 19: 333-335.

BASHAN, Y. 1997. Aplicaciones Biotecnológicas en Ecología Microbiana. Cundinamarca, CO. Pontificia Universidad Javeriana – Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste. Pp. 1 - 3

BASHAN, Y. 1998. Inoculants of growth-Promoting Bacteria for use in Agriculture. Department of Microbiology, Division of Experimental Biology. The Center for Biological Research of the Northwest. México. Pp. 1 – 3

DÍAZ A. y MAYEK N., 2008. La biofertilización como tecnología sostenible. Editorial Plaza Valdés. Tamaulipas-México, P. 180

ESPINOZA, L. 2004. Caracterización y selección de la bacteria diazotrófica *Azospirillum* spp., asociado con el maíz de altura (*Zea mays* L). INIAP. Tesis Ingeniero. Agrónomo. Pp. 47- 90.

ESTRADA, G., 2008. Calidad de inoculantes almacenados a diferentes temperaturas: efecto sobre la población, humedad y pH del producto. Tesis Microbiólogo Industrial. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Carrera de Microbiología industrial. P. 44

FALLICK, E., OKON, Y. y FISCHER, M. 1988. Growth response of maize roots to *Azospirillum* inoculation. Effect of soil organic matter content, number of rhizosphere bacteria and tuning of inoculation. *Soil BiolBiochem*. Pp.25-49.

ISO 10390. 2005. Soil quality-Determination of pH

NARANJO, M. y NARANJO, J. 2003. Contabilidad de Costos. 2da. Edición. Quito – Ecuador. Pp. 13 – 14

OKON, Y. y GONZALES, L. 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: An evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biol. Biochem*. 26: 1592

PÉREZ, A.; VELÁZQUEZ J. y HERNÁNDEZ H. 2002. Inmovilización de *Lactococcuslactis* en Capsulas de Alginato; Universidad Juárez Autónoma de Tabasco – División Académica de Ciencias Agropecuarias; Tabasco - México D.F. pp. 316 – 317.

PISABARRO, A., 2009. Microbiología general. Pp. 20-23 Consultado el 18 de Diciembre del 2010. Disponible en: [http://www.unavarra.es/genmic/microgral/02\\_cultivo%20microorganismos%20MG%2008-09.pdf](http://www.unavarra.es/genmic/microgral/02_cultivo%20microorganismos%20MG%2008-09.pdf)

PERTICARI, A. 2006. Especial inoculación; Convenio de Asistencia Técnica INTA-25. Buenos Aires – Argentina; Consultado el 12 de febrero del 2010. Disponible en <http://www.lanacion.com.ar/nota>.

PRIMAVESI, A. 1982. Manejo ecológico del suelo. snt. P. 499

RODRÍGUEZ, D. MUÑOZ, R. CORNEJO, J. y ESPINOZA, C. 2004. Microbiología ambiental. P. 4. Consultado el 3 de Marzo del 2010. Disponible en [https://www.ucursos.cl/ingenieria/2009/1/C141B/1/material\\_docente/bajar?id\\_material=223016](https://www.ucursos.cl/ingenieria/2009/1/C141B/1/material_docente/bajar?id_material=223016).

RODRÍGUEZ, E. y CÁCERES A. 1982. Improved médium for isolation of *Azospirillum* spp., *Applieta Microbiology and Environmental*. 44(2): 940-991.

SAURA, G.; 2000. Uso de *Azospirillum* sp. en caña de azúcar; FIAGRO; Buenos Aires – Argentina.

STEUGBING, L., GODOY, R. y ALBERDI M. 2001. Métodos de Ecología Vegetal. Editorial Universitaria. Santiago de Chile. P. 121.

THULER, D., NADRO, W., BARBOSA, H. 2003. Plant growth regulator and amino acids released *Azospirillum* spp. in chemicals defined media *Microbiology*. P. 174

WILLEY, J., SHERWOOD, L., WOOLVERTON C., 2008. Microbiología de Prescott, Harley y Klein. Séptima Edición. GrawHill. Nueva York-EEUU. Pp. 123-126.

YÁNEZ, C.; ZAMBRANO, J.; CAICEDO, M.; SÁNCHEZ, H.; HEREDIA, J. 2003. Catálogo de Recursos Genéticos de Maíces de Altura Ecuatorianos (Programa de Maíz. EESC-INIAP, Quito, Ecuador.) P. 2

YÁNEZ, C., ZAMBRANO, J., CAICEDO, M., SÁNCHEZ, H. y HEREDIA, J. 2004. Informe Técnico Final del Proyecto IQ-CV\_102, Programa de Maíz. Estación Experimental Santa Catalina; INIAP, Quito-Ecuador. Pp. 41-49

# **DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LAS CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO SOBRE LA VIABILIDAD DE ESPORAS Y MICELIO DE ACTINOMICETES AISLADOS DE LA RIZÓSFERA DE LEGUMINOSAS**

## **DETERMINATION OF THE EFFECT OF CONDITIONS OF STORAGE ON THE VIABILITY OF SPORES AND MYCELIUM OF ACTINOMICETES ISOLATED FROM THE RHIZOSPHERE OF LEGUMES**

Diana Andrade y Carlos Rodríguez

Universidad Técnica de Ambato - Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos  
Campus Académico Huachi Av. Los Chasquis y Río Payamino  
crodriguez@hotmai.com; dixnitx\_11@hotmail.com

### **RESUMEN**

Durante la determinación del efecto de las condiciones de almacenamiento sobre la viabilidad de esporas y micelio de actinomicetes aislados de la rizósfera de leguminosas, se logró purificar, conservar y almacenar en cultivo puro, ochenta y seis cepas de actinomicetes, teniendo en cuenta el porcentaje de recuperación y pérdida de las mismas. De las doscientas setenta y siete cepas aisladas originalmente del proyecto “Búsqueda de Actinomicetes Productores de Antibióticos” en el año 2009, las cuales se entregaron conservadas en glicerol al 20% (w/v) y almacenadas en refrigeración a un 1°C, únicamente se lograron purificar ochenta y seis cepas, 21 se purificaron a partir de la rizósfera de fréjol, 20 de alfalfa, 19 de haba, 18 de arveja y 8 de chocho. La purificación de cepas no fue como se esperaba, ya que se reportó únicamente un 31.0% de cepas purificadas, mientras que un 69.0% de cepas perdidas entre no crecidas y contaminadas que dan un total de 191 cepas. Los datos obtenidos en la presente investigación demuestran que las condiciones de almacenamiento deficientes, influyen sobre la viabilidad de esporas y micelio de actinomicetes. Cabe recalcar que las técnicas de aislamiento y conservación inicial son la clave fundamental para poder establecer colecciones de cultivos por largos períodos de tiempos, los mismos que pueden ser utilizados en investigaciones futuras, permitiendo el descubrimiento de posibles nuevos compuestos bioactivos útiles en biotecnología.

Palabras claves: almacenamiento, esporas, micelio, rizósfera, refrigeración.

### **SUMMARY**

During the determination of the effect of storage conditions on the viability of spores and mycelia of actinomycetes isolated from the rhizosphere of leguminose, purification, preserving and storing, was achieved, in pure culture, eighty-six strains of actinomycetes, considering the percentage of recovery and loss thereof. Of the two hundred seventy-seven originally isolated strains of the “Search Actinomycetes Antibiotics Producers” project in 2009, which were delivered preserved in 20% glycerol (w / v) and stored refrigerated at 1°C, only eighty six strains were purified, 21 were purified from the bean rhizosphere, 20 from alfalfa, 19 from lima bean, 18 from pea and 8 from pearl lupine. Strains purification was not as expected, since only 31.0% was reported as purified strains, whereas 69.0% of the strains lost between no growth and contamination gave a total of 191 strains. The data obtained in the present investigation shows that poor storage conditions, affect the viability of spores and mycelium of actinomycetes. It should be noted that the isolation techniques and initial conservation are the fundamental key to establish culture collections for long periods of time, the ones that can be used in future research, allowing the discovery of potential new bioactive compounds useful in biotechnology.

Keywords: storage, spores, mycelia, rhizosphere, refrigerated.

## INTRODUCCIÓN

El uso de los microorganismos en el enfrentamiento y la solución de los grandes problemas actuales de la humanidad, como son los relacionados con la salud humana y animal, la agricultura y la alimentación, la obtención de formas no convencionales de energía, el saneamiento y conservación del medio ambiente, entre otros, ha alcanzado un incremento considerable en el mundo entero, principalmente en los países desarrollados (Fernández et al., 2005). Su explotación y conservación con fines investigativos es del interés de todo centro investigativo, pues permite disponer de cepas confiables cuando estas sean solicitadas adversos (Zamora, 2003), por lo que resulta de mucha importancia el empleo de técnicas que permitan el mantenimiento y preservación de los microorganismos por largos períodos de tiempo (Pérez et al., 2005). El método de conservación que se elija debe garantizar la supervivencia de al menos el 70% de las células por un período considerable de tiempo, de forma tal que la población sobreviviente se asemeje a la original como sea posible, debe permitir mantener las características del microorganismo por las cuales fue seleccionado (Stanbury et al., 1995), conservar las propiedades de importancia de los cultivos y minimice la ocurrencia de los eventos genéticos (García, 2004). De igual manera debe reducir al mínimo el riesgo de contaminación y permitir que la pureza del cultivo permanezca inalterable (Weng et al., 2005).

Existen diferentes métodos para la preservación de los microorganismos y todos tienen ventajas y desventajas, por lo tanto el método escogido debe ser el que mejor se adecue a las necesidades de la colección, teniendo en cuenta la competencia técnica, los recursos financieros y las facilidades disponibles y recordando siempre que no existe un método universal para la preservación adecuada de todos los microorganismos (Pérez et al., 2005). Para la correcta conservación de las cepas se deben cumplir tres objetivos fundamentales: en primer lugar que el cultivo a conservar esté puro, en segundo lugar que se logre una supervivencia de al menos el 70 - 80% de las células, o sea que sean viables y en tercero que sean genéticamente estables (Pérez et al., 2005).

Estos métodos pueden ser agrupados en métodos de conservación a largo plazo, son los mejores, ya que garantizan al máximo la estabilidad genética, a él pertenecen los métodos de congelación y de liofilización (Arencibia, 2003). Métodos alternativos de conservación, ellos incluyen la transferencia periódica, refrigeración y la conservación por suspensión en agua destilada estéril; y métodos restringidos de conservación, se utilizan para grupos de microorganismos muy específicos que no resisten los métodos mencionados anteriormente, a él pertenecen la desecación en papel filtro, cultivo en tierra (González, 2002).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Crecimiento y determinación de pureza en actinomicetes.

Doscientas setenta y siete cepas de actinomicetes aislados de la rizósfera de leguminosas se recibieron como suspensiones de células en glicerol al 20% (w/v). La biomasa contenida en los tubos no fue suficiente, puesto a que algunos presentaron transparencia total. Posteriormente, 20µL de cada una fueron inoculadas en cajas tetrapetri que contenían agar glucosa extracto de malta extracto de levadura (agar GYM), y cultivados mediante estría simple. Los platos sembrados fueron incubados a 28°C por 5 días. Una vez comprobado el crecimiento de cada actinomicete se realizó un repique en cajas petri que contenía agar GYM mediante estría compuesta.

Los platos sembrados fueron incubados a 28°C por 5 días. Aquellos que se encontraron contaminados, fueron repicados las veces necesarias hasta obtener finalmente un cultivo puro. Aquellos que luego del período de incubación presentaron características de cultivo puro, fueron etiquetados y posteriormente almacenados en tubos plásticos que contenían 1ml de glicerol al 20% (w/v) y almacenados a -10°C en un congelador, para su preservación a largo plazo. Al mismo tiempo se preparó un stock de células en tubos plásticos con 700µL de agua de llave estéril, los cuales fueron almacenados a 4°C en un refrigerador, para la realización de las pruebas fisiológicas y metabólicas posteriores.

### Determinación de la eficiencia de almacenamiento de cultivos puros de actinomicetes.

Se reportó el número de actinomicetes recuperados por especie de leguminosa. Luego del periodo de inoculación e incubación, se procedió a contar cuantos han crecido y se encuentran en cultivo puro. Se calculó el porcentaje de pérdida de actinomicetes, para lo cual se dividió el número de cultivos no crecidos, sobre el total de cultivos recibidos y multiplicado por 100. Se obtuvo un porcentaje global y por leguminosa.

#### Porcentaje Global:

#### Porcentaje de Pérdida de Actinomicetes:

$$\% \text{ de Pérdida de Actinomicetes} = \frac{\# \text{ de cultivos no crecidos}}{\# \text{ de cultivos recibidos}} \times 100$$

#### Porcentaje de Cultivos Contaminados:

$$\% \text{ de Cultivos Contaminados} = \frac{\# \text{ de cultivos contaminados} \times 100}{\# \text{ de cultivos recibidos}}$$

#### Porcentaje por Leguminosa:

#### Porcentaje de Pérdida de Actinomicetes por Leguminosa:

$$\% \text{ de Pérdida de Actinomicetes por Leguminosa} = \frac{\# \text{ de cultivos no crecidos por Leguminosa}}{\# \text{ de cultivos recibidos por Leguminosa}} \times 100$$

## Porcentaje de Cultivos Contaminados por Leguminosa:

$$\% \text{ de Cultivos Contaminados por Leguminosa} = \frac{\# \text{ de cultivos contaminados} \times 100}{\# \text{ de cultivos recibidos}}$$

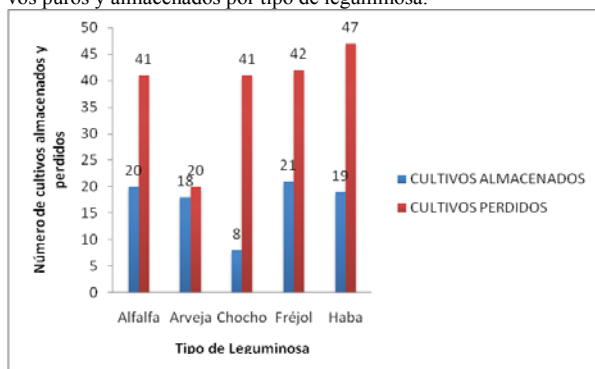
### RESULTADOS

En la Tabla 1, se detallan los tipos de leguminosas de las cuales se aislaron las cepas de actinomicetes para el trabajo inicial. Se recibieron 277 cepas para la realización del presente trabajo de investigación, las cuales fueron distribuidas en 66 cepas aisladas de la rizósfera de haba, 63 cepas de fréjol, 61 cepas de alfalfa, 49 cepas de chocho y 38 cepas de arveja. El número de cultivos que se lograron purificar y almacenar, luego de realizada la recuperación de cada uno de los stocks, 21 cultivos crecieron para fréjol, seguido por 20 de alfalfa, 19 de haba, 18 de arveja y 8 de chocho, generando un total de 86 cepas recuperadas. Cultivos perdidos arrojaron los siguientes resultados, 47 pertenecieron a haba, 42 a fréjol, 41 para alfalfa y chocho respectivamente y 20 a arveja dando un total de 191 cepas no recuperadas (Figura 1).

Tabla 1. Número de cultivos de actinomicetes recuperados en cultivos puros y almacenados por tipo de leguminosa.

TIPO DE LEGUMINOSA	CULTIVOS ALMACENADOS	CULTIVOS PERDIDOS	TOTAL
Alfalfa	20	41	61
Arveja	18	20	38
Chocho	8	41	49
Fréjol	21	42	63
Haba	19	47	66
<b>TOTAL</b>	<b>86</b>	<b>191</b>	<b>277</b>

Figura 1. Número de cultivos de actinomicetes recuperados en cultivos puros y almacenados por tipo de leguminosa.

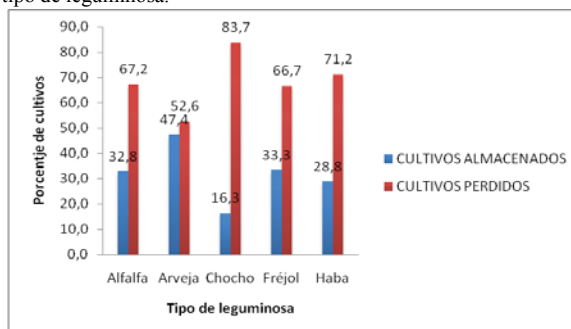


La Tabla 2 muestra claramente los porcentajes de los cultivos almacenados y cultivos perdidos para cada tipo de leguminosa, registrándose el mayor porcentaje de recuperación de cepas para el caso de la arveja con un 47.4%, seguido por un 33.3% para el fréjol, el porcentaje mayor de cultivos perdidos fue del 83.7% que corresponde a chocho, seguido por un 71.2% en fréjol como se muestra en la Figura 2.

Tabla 2. Porcentaje de cultivos almacenados y de pérdida para cada tipo de leguminosa.

TIPO DE LEGUMINOSA	PORCENTAJE DE CULTIVOS ALMACENADOS	PORCENTAJE DE PÉRDIDA
Alfalfa	32.8	67.2
Arveja	47.4	52.6
Chocho	16.3	83.7
Fréjol	33.3	66.7
Haba	28.8	71.2

Figura 2. Porcentaje de cultivos almacenados y de pérdida para cada tipo de leguminosa.



Cultivos puros se almacenaron en un total de 86, mientras que 191 fueron desechados de un total de 277 stocks iniciales (Figura 3) como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Número de cultivos de actinomicetes recuperados en cultivos puros y almacenados.

TIPO DE CULTIVO	NUMERO DE CULTIVOS
<b>Purificados</b>	<b>86</b>
<b>Perdidos</b>	<b>191</b>
<b>Total</b>	<b>277</b>

Figura 3. Número de cultivos de actinomicetes recuperados en cultivos puros y almacenados.

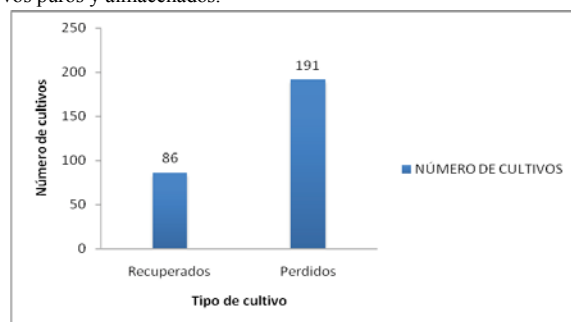


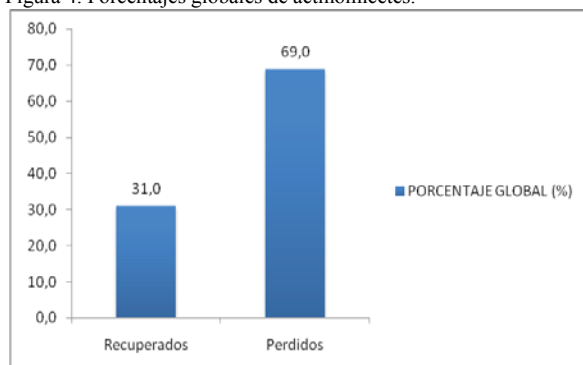
Tabla 4. Cálculo de los porcentajes globales de actinomicetes.

CULTIVOS	PORCENTAJE GLOBAL (%)
<b>Recuperados</b>	<b>31.0</b>
<b>Perdidos</b>	<b>69.0</b>

Se obtuvieron porcentajes de manera global para determinar la purificación y pérdida de cultivos, se registraron los siguientes resultados, 31.0% que corresponde a

cultivos puros y almacenados y 69.0% a cultivos perdidos entre no crecidos y contaminados (Figura 4), estos datos se muestran en la Tabla 4.

Figura 4. Porcentajes globales de actinomicetes.



## DISCUSIÓN

El presente estudio se enfocó en la determinación de las condiciones de almacenamiento sobre la viabilidad de esporas y micelio de actinomicetes aislados de la rizósfera de leguminosas. Para este fin se logró determinar una metodología adecuada para la recuperación de cepas aisladas inicialmente pertenecientes al proyecto “Búsqueda de Actinomicetes Productores de Antibióticos” y depositados en la colección de cultivos de microorganismos útiles para biotecnología.

Las cepas aisladas y almacenadas en cultivos puros se mantuvieron en suspensiones de glicerol al 20% (w/v) y en refrigeración entre 1 y 3°C, por alrededor de tres años aproximadamente. Transcurrido este tiempo se trató de recuperar las cepas en su mayor número, pero de un total de 277 cepas aisladas y almacenadas inicialmente, únicamente se lograron recuperar 86 cepas que corresponden a un 31.0%, mientras tanto que 191 cepas se perdieron, lo que corresponde a un 69.0%.

La recuperación de las cepas aisladas y almacenadas en cultivos puros no fue como se esperaba, existen varias causas que generaron la pérdida inevitable de cultivos, entre las principales se ha podido citar, la aplicación deficiente de las técnicas de aislamiento inicial de cultivos, es decir, los stocks no fueron preparados adecuadamente para su almacenamiento y conservación en cultivo puro ya que estos deben contener suficiente material microbiológico (biomasa) para su posterior recuperación (turbiedad del medio), para la conservación en cultivo puro se utilizó glicerol al 20% (w/v).

El mal estado de los equipos en los cuales se conservaron las cepas también es otra de las causas principales para la pérdida de cultivos, ya que estos no siempre están a la temperatura adecuada (entre 1 y 3°C), ya sea por la falta de energía eléctrica o por descuido del personal a cargo.

La técnica de refrigeración, una de las más utilizadas para la conservación de cultivos, no es muy recomendada si se trata de almacenar cepas por largos períodos de tiempo, debido a que las actividades metabólicas de los microorganismos son muy lentas pero no se detienen. Así, su crecimiento continúa lentamente, los nutrientes son utilizados y los productos de desecho liberados en el medio. Esto da como resultado, finalmente, la muerte de los microorganismos después de algún tiempo (Zamora, 2003). Cepas aisladas inicialmente en el año 2009, de gran interés, que presentaron coloraciones verdes y azules (micelio aéreo), las mismas que formaban pigmentos difusibles verdes y azules, se llegaron a perder, posiblemente estas cepas podían llegar a metabolizar compuestos bioactivos de interés industrial.

## CONCLUSIONES

En la presente investigación se lograron recuperar únicamente 86 cultivos de actinomicetes de un total de 277, esto corresponde a un 31.0%, es evidente la pérdida de cultivos, lo cual corresponde a un 69.0%, esto se debe a la aplicación deficiente de las técnicas de aislamiento y conservación de cepas, equipos deficientes para su conservación y mala manipulación, lo cual incluye transporte de tubos crioviales con material microbiológico (biomasa).

El método de conservación inicial de cepas utilizada fue refrigeración entre 1°C y 3°C, la misma que no es la adecuada si se quiere conservar cepas por un largo período de tiempo, estas debieron ser congeladas para evitar grandes pérdidas de cultivos de actinomicetes.

## REFERENCIAS

- ARENCIBIA, D.; ROSARIO, L., 2003. Métodos de conservación de cepas de *Salmonella typhimurium* utilizadas en el ensayo de Ames. *Revista de Toxicología en Línea*, Pp. 1-19
- FERNÁNDEZ, C.; MARTÍNEZ, G.; PERURENA, M.; ILLNAIT, M.; VALDÉS, I., 2005. La colección de cultivos de hongos del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”: Funciones y retos. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 57(3), 1-7.
- GARCÍA, M.; URUBURU, F., 2004. La conservación de cepas microbianas. *Colección Española de Cultivos Tipo (CECT)* 30, 12-15.
- GONZÁLES, R.; MONTES DE OCA, N.; RIVERÓN, Y.; NÚÑEZ, A., 2002. Aseguramiento de la calidad en las colecciones de cultivos microbianos. *Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, CENSA*, Pp. 1-30.
- PÉREZ, J.; CASAS, M.; BELTRÁN, C., 2005. Conservación de bacterias por el método de suspensión en agua destilada estéril. *Instituto Nacional de Investigaciones de la caña de azúcar, INICA*, Pp. 1-1.
- STANBURY, P.; WHITAKER, A. & HALL, S., 1995. *Principles of fermentation technology*. Pp. 357.
- WENG, Z.; DÍAZ, E.; ÁLVAREZ, I., 2005. Conservación de microorganismos: ¿Qué debemos conocer? *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología* 43, 1-4.
- ZAMORA, L., 2003. Aislamiento, identificación y conservación de cultivos de bacterias lácticas antagonistas de microbiota contaminante de sangre de matadero. *Universidad de Georgia. Instituto de Tecnología Agroalimentaria*.

# **ELABORACIÓN DE GALLETAS DE SAL UTILIZANDO HARINA DE TRIGO (*Triticum aestivum*) NACIONAL DE LA VARIEDAD INIAP – COJITAMBO CON SUPLEMENTOS PARCIALES DE HARINA DE TRIGO IMPORTADO**

## **PRODUCTION OF SALT BISCUITS USING DOMESTIC WHEAT FLOUR (*Triticum aestivum*) VARIETY INIAP-COJITAMBO PARTIALLY SUPPLEMENTED BY IMPORTED WHEAT FLOUR.**

Aquino Elena, Fernando Álvarez, Mario Álvarez

Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.  
Unidad Operativa de Investigación en Tecnología de Alimentos.  
elenaliceth@gmail.com

### RESUMEN

Durante la experimentación se analizó el efecto de mezclar las harinas de trigo importado (HTI) por harina de trigo nacional (HTN) de la variedad Iniap – Cojitambo en formulaciones para galletas de sal. Con la finalidad de obtener el mejor tratamiento se utilizó un diseño de un factor completamente aleatorizado para los análisis físico-químicos y un diseño de bloques incompletos para el análisis sensorial (color, crujencia, olor, sabor y aceptabilidad), hasta encontrar estadísticamente el mejor tratamiento, los tratamientos que existía diferencia significativa, se empleo la prueba de TUKEY a un nivel de significancia del 5%. La mejor mezcla de harinas fue 45% de HTI y 55% de HTN; las galletas elaboradas con esta mezcla presentaron un promedio de dureza 11,25 N, humedad 3,62% y sensorialmente fueron muy crujientes (7,94), de un color dorado agradable a la vista (2,83), de un olor característico a galleta (4,07), sabor muy agradable (7,79) y que el consumidor acepta enormemente (8,80). Se analizó las características reológicas de su masa, presentando parámetros altos en Desarrollo de la masa 1,13Nm, Debilitamiento de la proteína 0,51 Nm, Gelatinización del almidón 1,67Nm, Actividad amilásica 1,51Nm y Gelificación del almidón 2,12Nm. Finalmente las galletas de sal elaboradas con 45% de HTI y 55% de HTN, cumplen con los requerimientos bromatológicos y microbiológicos de la norma INEN 2085, pues aporta un valor energético de 485,76 Kcal /100g; su tiempo de vida útil fue de 2,7 meses a condiciones aceleradas (70%HR y 30°C), su rendimiento del 97,03% y el costo fue de 0,09 centavos las 10 unidades (30g).

Palabras claves: Harina de trigo, Mixolab, Texturómetro Brookfield CT3, Escala de línea continua, Galletas de sal.

### SUMMARY

During the experimentation we explored the effect of mixing (HTI) imported wheat flours for wheat flour national (HTN) variety Iniap - Cojitambo in formulations for salted cookies. In order to obtain the best treatment design was used an a factor fully randomized for physicochemical analyses and an incomplete block design for sensory analysis (color, crunchiness, smell, taste and acceptability), up to find statistically the best treatment, treatments that there was significant difference, employment the TUKEY test to a significance level of 5%. The best mix of flours was 45% of HTI and 55% of HTN; Cookies made with this mixture showed an average of 11.25 N, 3.62% hardness and sensually were very crunchy (7.94), a nice golden color (2.83), in view of a characteristic smell of biscuit (4.07), very nice flavor (7.79) and that the consumer accepts greatly (8.80). Analyzed the rheological properties of its mass, presenting high parameters in development of the mass 1, 13Nm, weakening of the protein 0.51 Nm, 1, 67Nm, activity starch gelatinization amylase 1, 51Nm and Gelation of starch 2, 12Nm. Finalmente salt crackers made with 45% of HTI and 55% of HTN, comply with the requirements bromatological and microbiological standard INEN 2085, because it brings an energy value of 485.76 100g Kcal; his life time was 2.7 months accelerated conditions (70% RH to 30° C), its yield of 97,03% and the cost was 0.09 cents 10 units (30g).

Key words: wheat flour, Mixolab, Brookfield CT3 texture, scale of continuous line, salted biscuits.

## INTRODUCCIÓN.

*Triticum aestivum* o Trigo “harino-panadero” es tipo de trigo destinado en su totalidad al consumo humano, ha sido y sigue siendo objeto de innumerables investigaciones en el mundo entero para mejorar tanto sus rendimientos en zonas áridas o fértiles, como su calidad panadera.

El trigo se encuentra dentro de la principal fuente de alimento a nivel mundial, después del maíz; esto se debe a sus propiedades alimenticias y sensoriales.

La variedad de trigo Iniap – Cojitambo producido en Ecuador, es un trigo blando, posee una capacidad de germinación de 90 a 94%, con un rendimiento harinero de 63 al 66%.

Uno de los trigos importados por el país es el CWRS de Canadá Western Red Spring o Trigo rojo de primavera del oeste de Canadá, es conocido por sus excelentes características de molienda y panificación. produce una harina fuerte, admite una proporción de harina floja; pues trabajando con mezclas de trigos duros y blandos encontraron que reduciendo el tamaño medio de la partícula de harina se incrementaba la cantidad de agua requerida para hacer la masa.

Las harinas flojas son indispensables para la elaboración de galletas, estas harinas se obtienen normalmente a partir de los trigos blandos, su contenido proteico es normalmente inferior al 10%.

Actualmente la galleta es uno de los alimentos preferidos, por su agradable, rápido de adquirir y de consumir, se adapta totalmente a las nuevas tendencias de consumo.

Según la norma INEN 2085, galletas se definen como los productos obtenidos mediante el horneado apropiado de las figuras formadas por el amasado de derivados del trigo u otras farináceas con otros ingredientes aptos para el consumo humano.

Por lo detallado anteriormente el objetivo de la investigación fue elaborar galletas de sal utilizando harina de trigo (*Triticum aestivum*) nacional de la variedad Iniap – Cojitambo con suplementos parciales de harina de trigo importado. Se realizó análisis físico-químicos en harina y sensoriales galletas con la finalidad de encontrar la mejor combinación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Materia Prima.

En la presente investigación se utilizó las siguientes harinas: de trigo nacional de la variedad Iniap - Cojitambo (HTN) y de trigo importado de la variedad CWRS, trigo Canadá Western Red Spring o trigo rojo de primavera del oeste de Canadá (HTI).

## Elaboración de las galletas.

La tecnología que se utilizó en esta experimentación fue la tecnología laminada proceso que significó dosificar todos los ingredientes, disolver los aditivos solubles cremar e hidratar la harina durante 12min que tarda el proceso de amasado, hasta formar una lámina para un posterior troquelado y horneado de 12min a 180°C, proceso que se observa en la Figura 1.

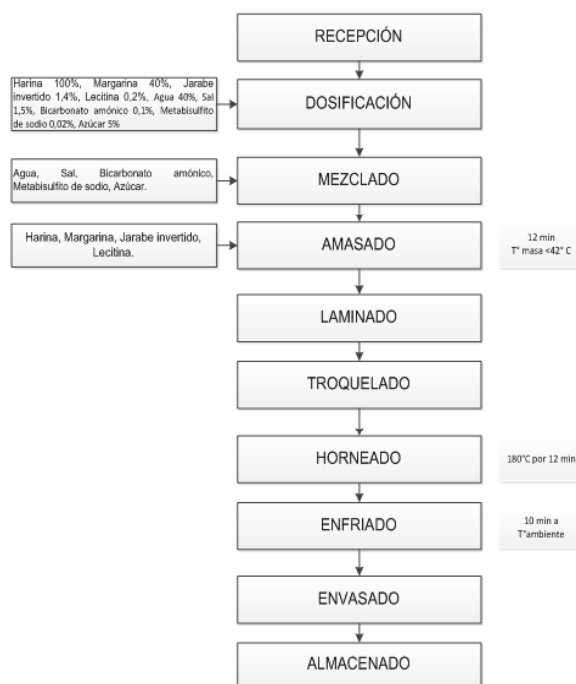


Figura 1. Diagrama de flujo para la elaboración de galletas de sal utilizando harina de trigo nacional con suplementos parciales de harina de trigo importado.

### Análisis de las galletas:

**Medición de dureza:** Las mediciones de Dureza se realizaron para galletas de sal en el Texturómetro Brookfield CT3, con la sonda TA7 y elemento TA-BT-KIT para un ciclo, utilizando la técnica instrumental quiebre de tres puntos; que consiste en colocar la muestra sobre un soporte de 6cm de largo y 5cm de alto y aplicar una fuerza paralela de 5N a una velocidad de 2 mm/s, usando el elemento TA-BT-KIT, hasta producir el quiebre total de la estructura de la galleta. Esta medición se aplicó para todos los tratamientos.

**Medición de humedad:** Las mediciones de Humedad se realizaron en una balanza infrarroja de humedad KERN MLS 50.

**Medición de atributos sensoriales:** Para el Análisis Sensorial se aplicó el diseño de bloques incompletos, bajo las condiciones del diseño propuesto por Cochran, W (10): 11t (tratamientos), 5k (número de tratamiento que degusta un catador), 5r (veces que un tratamiento es degustado), 11b (catadores), 2λ (número de veces que parejas de tratamientos aparecen en un bloque), 0,88E



(error). Se utilizó una escala hedónica no estructurada o de línea continua de 15cm y catadores semi-entrenados. Análisis estadístico de las harinas: Se aplicó el Diseño de un factor completamente aleatorizado con 6 observaciones y 11 tratamientos, siendo el factor de estudio: El porcentaje de harina de trigo importado (HTI), los datos experimentales, se sometieron a ANOVA, con un nivel de significancia del 5% y se utilizó la prueba paramétrica de TUKEY para comparar los tratamientos que presentaron diferencias significativas. Los datos se analizaron en el programa estadístico Statgraphics plus 4.0 Mejor tratamiento.

Se analizó el comportamiento reológico a través del uso del MIXOLAB, la calidad del proceso mediante análisis microbiológicos, calidad nutricional mediante un análisis proximal y la vida útil mediante ASLT.

Finalizados los análisis físicos, químicos y sensoriales se eligió el mejor tratamiento, usando los valores promedio más altos de la prueba de Tukey a un nivel de significancia del 5%.

### Vida útil de la galleta elaborada con la mejor mezcla de harinas

Se utilizó el método Accelerated Shelf Life Testing, (ASLT), controlando el factor extrínseco ganancia de humedad. Las galletas elaboradas con la mezcla de harinas provenientes del mejor tratamiento, fueron envasadas en fundas de celofán con aproximadamente 30gr, se almacenaron por un mes, en una cámara acondicionada a condiciones atmosféricas de 70% de humedad relativa y 30°C de temperatura. Cada 72 horas se analizaba la humedad en las galletas.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

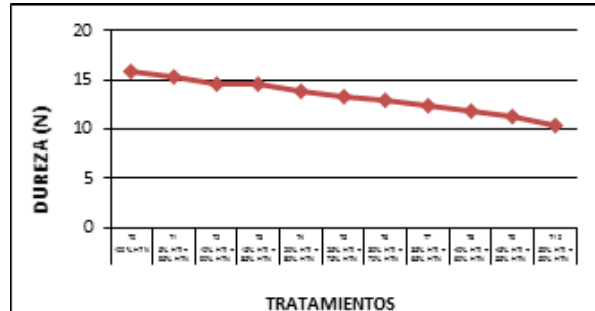


Gráfico 1. Datos de dureza en galletas de sal de los diferentes tratamientos. Fuente: Elena Liceth Aquino Ruiz.

En el gráfico 1 se observa la variación de la dureza expresada en Newtons de los diferentes tratamientos estudiados, el gráfico muestra una tendencia inversamente proporcional, ya que a manera que aumentó el porcentaje de sustitución de harina de trigo importado, el valor de dureza disminuyó, experimentalmente T9 (45% HTI y 55% de HTN) y T10 (50% HTI Y 50% HTN) presentaron los valores más bajos de dureza 11,25 N y 10,43N respectivamente, considerándolos como los mejores tratamientos; T0 (100% HTN) encambio pre-

sentó el valor más alto de dureza 15,45N.

Este efecto se debe a la calidad del almidón de la HTN principalmente, ya que dicha harina posee un alto contenido de almidón dañado, el almidón dañado afecta la textura del producto, ya que la retrogradación causa nuevamente la formación de cristales y produce un endurecimiento en el producto, que afecta en su textura. [11]

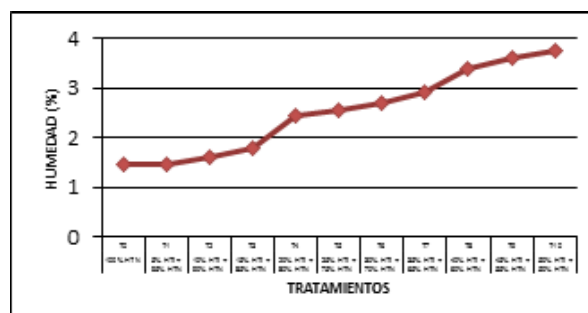


Gráfico 2. Datos de humedad en galletas de sal usando la balanza de humedad KERN MLS 50, para todos los tratamientos.

Fuente: Elena Liceth Aquino Ruiz.

En el gráfico 2 se observan los cambios de humedad en las galletas elaboradas en los diferentes tratamientos, existe una relación directamente proporcional al aumento del porcentaje de sustitución de la harina de trigo importado, pues a manera que aumentó el porcentaje de sustitución de harina de trigo importado en cada tratamiento, el porcentaje de humedad también aumentó. Experimentalmente T9 (45% HTI y 55% de HTN) y T10 (50% HTI Y 50% HTN) fueron los mejores tratamientos ya que presentaron el porcentaje de humedad promedio más alto 3,62% y 3,76% respectivamente, por otro lado T0 (100% HTN) presentó el valor promedio de humedad más bajo 1,45%, considerándolo como el peor tratamiento ya que Othón, S (1996) recomienda una humedad superior a 1,5% para galletas de sal.

Este efecto se debe a la cantidad de almidón dañado que se encuentran en mayor proporción en la harina nacional [12] y a la capacidad de atrapar agua de las proteínas, puesto que esta característica juega un papel importante en la textura deseable de diversos productos de panadería. [13]

Para obtener el mejor tratamiento, se ordeno las respuestas experimentales, como se indica en la Tabla 1, donde se observan las medias de cada análisis para todos los tratamientos. En la zona pintada se encuentran los valores promedio más altos y en los tratamientos no tienen diferencia significativa al 0,05% entre sí, por otro lado la zona sin color simboliza los valores promedio más bajos que no cumplen con características necesarias para unas galletas de calidad.



Tabla 1. Promedio de los parámetros analizados en las galletas provenientes de los diferentes tratamientos, utilizando las medias estadísticas de la prueba paramétrica y Tukey a un nivel de significancia del 0,05%

ANÁLISIS	TRATAMIENTOS										***P- Value	
	T0 0% HTI	T1 5% HTI	T2 10% HTI	T3 15% HTI	T4 20% HTI	T5 25% HTI	T6 30% HTI	T7 35% HTI	T8 40% HTI	*T9 45% HTI		T10 50% HTI
Dureza (N)	15,85h	15,25gh	14,55fg	14,48fg	13,76ef	13,29e	12,88de	12,29cd	11,89bc	11,25ab	10,43a	0,000
Humedad (%)	1,45g	1,46g	1,60gf	1,79f	2,45e	2,55ed	2,70cd	2,92c	3,38b	3,62a	3,76a	0,000
Color	9,35e	8,97ef	8,04e	7,90e	**6,01d	**4,99cd	**4,02bc	**4,22c	**3,8bc	**2,83ab	1,97a	0,000
Textura: "Crujencia"	1,56c	3,57cb	5,24ba	4,76cba	5,24cba	5,4ba	5,65ba	5,39ba	6,9ba	7,94a	6,7ba	0,001
Sabor	7,81 a	6,75a	6,24a	7,61a	6,24a	6,47a	6,40a	6,36a	7,13a	7,79a	5,31a	0,280
Olor	3,80a	3,71a	5,40a	5,33a	5,63a	6,52a	5,88a	4,75a	5,77a	4,07a	3,51a	0,658
Aceptabilidad	2,59d	2,89dc	2,87dc	4,23dcb	5,96cba	6,95ba	6,68ba	6,62ba	7,30ba	8,80a	2,9dc	0,000

\*\*Valor promedio de color correspondiente a una tonalidad de Dorado aceptable. \*\*\*Probabilidad obtenida del programa estadístico Statgraphics Plus 4.0 para la aceptación o rechazo de la hipótesis

Fuente: Elena Liceth Aquino Ruiz.

El mejor tratamiento fue T9 que contenía en su formulación 45% HTI y 55% de HTN, la dureza promedio fue de 11,25 N medida bajo la prueba de quiebre de tres puntos, valor cercano con los encontrados bibliográficamente pues los parámetros texturales característicos de una galleta no fermentada aplicando una prueba de quiebre de tres puntos es  $10,1 \pm 0,7N$  [14].

La humedad promedio fue de 3,62% comparada con distintas referencias donde indican que la humedad promedio en galletas no fermentadas es de 3,26%, 5% para galletas de sal se puede considerar que la humedad se encuentra dentro del límite permisible.

Los catadores al momento de decidir cuál fue la muestra más aceptable se vieron afectados en gran medida por el color mostrando mayor aceptación por la tonalidad de dorado intermedio y el atributo de textura haciendo referencia a la crujencia, puesto que este parámetro sensorial es importante en alimentos farináceos. La textura adquiere mayor importancia en algunos alimentos: la dureza de una ternera, la fibrosidad de los espárragos y las judías verdes, el carácter crujiente de los cereales.

Las galletas elaboradas con T9 (45% HTI y 55% de HTN) fueron muy crujientes (7,94), de un color dorado agradable a la vista (2,83), de un olor característico a galleta (4,07), sabor muy agradable (7,79) y que el consumidor acepta enormemente (8,80).

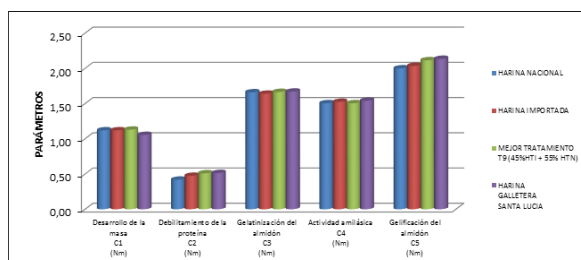


Gráfico 3. Parámetros reológicos de las masas de HTN, HTI, Mejor tratamiento y una harina galletera comercial. Fuente: MIXOLAB Chopin

En el Gráfico 3 se observa un resumen de los 5 parámetros reológicos analizados en el MIXOLAB del mejor tratamiento y una harina galletera "Santa Lucía", expresados en una medida de fuerza Par (Newton/metro) que significa la unidad en la que se mide el momento de dos fuerzas (torque) de igual magnitud, direcciones paralelas y sentidos contrarios, provocando un movimiento de rotación.

Desarrollo de la masa (C1) permite determinar el poder de absorción de agua de las harinas y medir las características de las masas durante la amasadura (estabilidad, elasticidad, potencia absorbida). Es decir que se necesitó entre 1,13 a 1,12 Nm de fuerza para que la harina pueda interactuar con el agua hasta formar una masa viscoelástica.

Debilitamiento de las proteínas (C2) cuando la temperatura de la masa aumenta la consistencia disminuye; la intensidad de este debilitamiento depende de la calidad de las proteínas.

En la experimentación la masa correspondiente a la HTN presentó el C2 más bajo (0,42 Nm) por tratarse de una harina floja, que por naturaleza no presenta buena calidad proteínica, seguido el parámetro de la HTI 0,48 Nm por tratarse de una harina fuerte perteneciente a la variedad de trigo CWRS#1, al sustituir con 45% HTI a la HTN, ésta ayuda a mejorar la calidad de las proteínas de la HTN ya que el parámetro en esta masa fue el más alto con 0,51 Nm; es decir que los fraseadores necesitaron mayor fuerza para romper los enlaces de las proteínas en la masa del mejor tratamiento. Este parámetro concuerda con el parámetro obtenido para una muestra de harina comercial, pues la harina "Santa Lucía" presentó un valor de 0,52 Nm ya que a mayor valor de torque (C2), la proteína de la muestra será más tenaz, lo contrario indicará una proteína más débil.

Gelatinización del almidón (C3) la gelatinización es la ruptura brusca de la ordenación de las moléculas en

los gránulos. [13]. En la experimentación la fuerza que necesitaron los fraseadores para lograr que el almidón gelatinizara fue de 1,66Nm para HTN, 1,64Nm para HTI y para el mejor tratamiento T9 (45% HTI y 55% HTN) 1,67Nm, pues se pudo observar que C3 presento similitud en los parámetros.

Actividad amilásica (C4), la actividad amilásica determina la consistencia al final del período de calentamiento. Experimentalmente no existe diferencia en los parámetros C4, la HTI obtuvo 1,53 Nm, aparentemente presentó baja actividad amilásica en comparación con las demás, el mejor tratamiento T9 (45% HTI y 55%HTN) y la HTN por ejemplo, obtuvieron 1,51 Nm, es decir la actividad amilásica fue alta, puesto que los fraseadores necesitaron menor fuerza. Las harinas que contienen mayor concentración de alfa-amilasas necesitan menor fuerza de los fraseadores sobre la masa, la actividad amilásica es alta en estos tratamientos [20] La actividad amilásica alta en HTN y el mejor tratamiento T9 (45% HTI y 55%HTN), es coherente con los resultados que se observaron durante la experimentación, ya que mientras más alto el porcentaje de HTN en la formulación de galletas de sal, el color dorado se intensificaba y este disminuía conforme aumentaba el porcentaje de suplementación con HTI, atribuyendo este efecto a la presencia de alfa- amilasas, pues este tipo de enzima actúa hidrolizando el almidón [21], rompen los enlaces alfa 1-4 dando lugar a la formación de dextrinas [19] y ayudan a regular la velocidad de fermentación, facilitan color en productos de panadería.

Gelificación del almidón (C5) la gelificación o retrogradación del almidón es la última etapa de medida y evalúa la vida útil, garantizando que el producto acabado sea más fresco y suave. [17]. Los valores obtenidos para este parámetro fueron muy similares, 2,00Nm para HTN, 2,04Nm para HTI y de 2,12Nm el mejor tratamiento T9 (45% HTI y 55%HTN); se concluye que las masas presentan baja retrogradación de los almidones, lo que significó que la vida útil de las galletas será larga.

Finalmente los parámetros reológicos del mejor tratamiento (45% HTI y 55% HTN) fueron altos: Desarrollo de la masa 1,13Nm, Debilitamiento de la proteína 0,51 Nm, Gelatinización del almidón 1,67Nm, Actividad amilásica 1,51Nm y Gelificación del almidón 2,12Nm en comparación con la HTN, HTI y una harina galletera "Santa Lucia", por lo que se puede decir que al reemplazar el 45% de HTN por HTI la harina se acondiciona a las características de las harinas galleteras que están en el mercado.

#### **Análisis microbiológico**

El análisis microbiológico se realizó al mejor tratamiento T9 (45%HTI y 55% HTN) para verificar la inocuidad del proceso de producción, se utilizó placas 3M Petrifilm y los resultados fueron: Ausencia para Mohos y

levaduras, Ausencia para Escherichia coli y un promedio de 200 ufc/g para Aerobios Totales, los resultados cumplen con los parámetros establecidos por la Norma Técnica Ecuatoriana (NTE) INEN 2085:96.

Análisis bromatológico

Los resultados del análisis proximal para galletas de sal elaboradas con 45% HTI y 55% HTN, están dentro de los parámetros que debe cumplir una galleta, según la Norma Técnica Ecuatoriana 2085. Las galletas presentó una humedad de 3,74%, proteína 7,82%, superando el límite de la norma que es de 3%, carbohidratos totales 62,94%, lípidos 22,12%.y cenizas totales 2,47%, constituyendo un complemento apetitoso de ración alimenticia diaria, que aportan un valor energético de 485,76 Kcal /100g.

#### **Vida útil**

Se aplicó el método de ASLT Accelerated Shelf Life Testing(Prueba Acelerada de Vida de Anaquel), controlando el parámetro Humedad por tratarse de un alimento con baja actividad de agua. Se obtuvo una reacción de primer orden cuyo tiempo de vida útil fue de 2,7 meses a condiciones aceleradas (70%HR y 30°C), por consiguiente si el producto se almacena a condiciones ambientales normales el producto duraría 6 meses.

El precio de venta al público de la galletas se estima de 0,09 centavos de dólar la presentación de 30g (10 unidades) y el rendimiento de producción es del 97,032%.

#### **CONCLUSIONES**

La harina de trigo nacional de la variedad INIAP- Cojitambo debe mezclarse con un 45% de harina de trigo importado CWRS, ya que ésta mezcla presentó buenas aptitudes galleteras, tanto en masa, por tener parámetros reológicos adecuados, como en producto final por presentar parámetros físicos dentro de los rangos permisibles y aceptación por parte del consumidor.

#### **BIBLIOGRAFÍA.**

- FARREA, F (2009). Análisis reológico de las diferentes fracciones de harina obtenidas en la molienda del grano de trigo. TESIS previo a la obtención del título de Ingeniería Técnica Agrícola. Especialidad Industrias Agrarias y Alimentarias. Escuela Politécnica Superior de Zamora.
- BENÍTEZ, A. (2005). Avances Recientes en Biotecnología Vegetal e Ingeniería Genética de Plantas. Reverté S.A. España.
- HERNÁNDEZ, L. CASTELLANOS, M. (2010). Utilización de la harina compuesta trigo maíz en la elaboración de galletas panaderas. Cuba Farmacia Alimentos 2004, VII Encuentro Ibero Americano sobre las Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias. Cuba: Editorial Universitaria. p 4. Disponible en: <http://site.ebrary.com/lib/utasp/Doc?id=10365553&ppg=4>
- DUNCAN, J.R. (1989). Tecnología de la Industria Galletera: galletas, crackers y otros horneados. Ed: Acribia, S.A. Zaragoza
- CORONEL, J. RIVADENERIA, M. URBANO, J. DÍAZ, Y. ABAD, S. (1993). INIAP – COJITAMBO 92 Variedad de Tri-

- go para el Austro Ecuador: Plegable 130- INIAP INDUSTRIA MOLINERA (2011). Trigo Canadá 05. Fecha de acceso 25/11/2011. Disponible en: [http://www.authortstream.com/Presentation/aSGuest37039-315074-EL-TRIGO-05-CANADA-can-Entertainment-ppt-powerpoint/WAINWRIGHT, A. COWLEY, K. WADE, P. \(1985\). Biscuit making properties of flours from hard and soft milling single variety wheats. J Sci. Food Agric. Pág 661-668.](http://www.authortstream.com/Presentation/aSGuest37039-315074-EL-TRIGO-05-CANADA-can-Entertainment-ppt-powerpoint/WAINWRIGHT,A.COWLEY,K.WADE,P.(1985).Biscuit%20making%20properties%20of%20flours%20from%20hard%20and%20soft%20milling%20single%20variety%20wheats)
- LA ALIMENTACIÓN EN ESPAÑA. (2005). Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Fecha de acceso 25/10/2011. Disponible en: [www.betelgeux.es/documentos/consumo%20alimentario.pdf](http://www.betelgeux.es/documentos/consumo%20alimentario.pdf)
- INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN, Norma Ecuatoriana Obligatoria NTE INEN 2085:96 “Galletas, Requisitos” Primera Edición. (Pág. 1-2)
- COCHRAN, W (1973). Diseños experimentales. Trillas editorial. México D.F. Pág 521.
- CAUVAIN, S. YOUNG, L. (1998). Fabricación del Pan. Editorial Acribia. Zaragoza-España. Pág. 60-69
- LASCANO, A. (2010). Estudio reológico de mezclas de harinas de cereales: Cebada ( *Hordeum vulgare*), Maíz (*Zea mays*), Quinoa (*Chenopodium quinoa*), Trigo (*Triticum vulgare*) y Tubérculo: Papa (*Solanumtuberosum*) nacionales con Trigo (*Triticum vulgare*) importado para orientar su uso en la elaboración de pan y pastas alimenticias. TESIS previo a la obtención del título de Ingeniera en Alimentos. Universidad Técnica de Ambato a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en alimentos. Ambato – Ecuador
- OWEN, R. (2000). Química de los Alimentos. Segunda edición. Editorial Acribia. Zaragoza – España. Pág 233, 188, 228, 233, 436, 440.
- CASTRO, E. VERDUGO, M. MIRANDA, M. RODRÍGUEZ, A. (2010). Determinación de parámetros texturales de galletas. Departamento de Ciencia de los Alimentos y Tecnología Química. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile. N°11. Fecha de acceso 01-07-2012. Disponible en: [http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/ap/ciencias\\_quimicas\\_y\\_farmaceuticas/c20028221225determinacionparametros1.pdf](http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/ap/ciencias_quimicas_y_farmaceuticas/c20028221225determinacionparametros1.pdf)
- ALCALDE G. (1997). Desarrollo y Aseguramiento de Calidad. Fábrica Maipú Nestlé S.A. Santiago de Chile.
- SCAVUZZO, V. (2009). Galletitas de agua con fitoesteroles. TESINA previo a la obtención del título de Licenciada en Nutrición. Universidad Nacional De Entre Ríos. Facultad de Bromatología.
- CHOPIN TECHNOLOGIES (2008). Manual de Empleo del Mixolab. Villeneuve la Gárrenme-Francia, pp. 9-10.
- PANERA REVISTA. (2009). La papa en la industria panificadora. La papa y los productos panificables (Parte II)”.N° 15. Panera Ediciones S.A.C. Lima- Perú. Pág. 18-20. Fecha de acceso 12-12-2012 : Disponible en: <http://peru.grupopanera.com/pages/visorrevistas.php?page=Rev-15>
- RUIZ, D. (2008). Diseño de fórmula para harina panadera mediante la utilización de enzimas y análisis de costo-beneficio, en la empresa sucesores de Jacobo Paredes M. S.A., Quito, 2007. TESIS previa a la obtención del título de Ingeniera en Industrialización de Alimentos. Universidad Tecnológica Equinoccial. Facultad de Ciencias de la Ingeniería.
- PULLUQUINGA, M. (2011). Estudio del efecto de glucoxidasas y alfa-amilasas en la elaboración de pan con sustitución parcial de harina de papa (*Solanumtuberosum*) nacional. TESIS previo a la obtención del título de Ingeniera en Alimentos. Universidad Técnica de Ambato a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en alimentos. Ambato – Ecuador
- TEJERO, F (2010). Conservantes. La lucha contra los mohos. Fecha de consulta 20/01/2013. Disponible en: [http://www.franciscotejero.com/tecnica/sistemas%20de%20conservacion/lucha\\_mohos.htm](http://www.franciscotejero.com/tecnica/sistemas%20de%20conservacion/lucha_mohos.htm)
- LALLEMAND. (1996). Enzimas en harina. Revista BakingUpdate. Vol 1. N°15. México D.F. Disponible en: <http://www.lallemandmexico.com/pdf/LBU-01-15.pdf>.

# UTILIZACIÓN DE GOMA XANTANA Y MONOGLICÉRIDO DESTILADO PARA EL MEJORAMIENTO DE LA TEXTURA DEL PAN ELABORADO A PARTIR DE ALMIDÓN DE YUCA (*Manihot esculenta*)

## USE OF XANTHAN AND MONOGLYCERIDE DISTILLATE FOR THE IMPROVEMENT OF THE TEXTURE OF THE BREAD MADE OF CASSAVA STARCH (*Manihot esculenta*)

Ximena Wong y Alexandra Lascano

Universidad Técnica de Ambato - Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos  
Campus Académico Huachi Av. Los Chasquis y Río Payamino  
ximeisa22@hotmail.com, alexlasca4@hotmail.com

### RESUMEN

El presente trabajo de investigación evalúa el efecto de la incorporación de aditivos en la elaboración del pan de almidón de yuca, con el objetivo de mejorar y conservar la textura suave del pan por mayor tiempo, puesto que a medida que transcurre el tiempo y con el enfriamiento, la textura del pan de almidón de yuca se vuelve muy rígida debido a la retrogradación del almidón y a la pérdida de humedad. Se trabajó con la interacción de goma xanthan en cantidades de 0.1, 0.3 y 0.5% p/p y monoglicérido destilado con 0.5, 1 y 1.5% p/p por sus características como agentes mejoradores en la panificación, obteniéndose un total de 9 tratamientos. Se evaluaron parámetros como la dureza (g), trabajo dureza terminado (mJ), y deformación recuperable (mm) durante 3 días en el texturómetro Brookfield CT-3, durante el almacenamiento del producto en fundas de celofán selladas y a temperatura ambiente (20°C). Además se realizó un análisis sensorial para todos los tratamientos y se determinó como mejor tratamiento a la interacción 0.5% goma xanthan y 1% monoglicérido destilado. Asimismo, se determinó que este tratamiento posee un adecuado comportamiento reológico de la masa, menor pérdida de peso y humedad comparada con la muestra patrón (sin aditivos), presentando también un tiempo de vida útil de 4 días.

PALABRAS CLAVE: textura, almidón de yuca, aditivos, pan.

### SUMMARY

This research evaluated the effect of the incorporation of additives in the making of cassava starch bread, with the purpose of improving and to preserve the soft texture of bread for a longer time, because as time passes by and due to the cooling, cassava starch bread texture becomes rigid due to retrogradation of starch and moisture loss. We worked with a combination of xanthan gum at 0.1, 0.3 and 0.5 % w/w, and distilled monoglycerid at 0.5, 1 and 1.5% w/w because of their characteristics as improvers in baking: thus, we obtain a total of 9 treatments. The parameters evaluated were: hardness (g), hardness finished work (mJ), and recoverable deformation (mm) during 3 days with Brookfield CT-3 texturometer, storing the product in sealed cellophane bags at room temperature (20°C). Additionally, a sensorial analysis was performed for all treatments and as a result the combination of 0.5% xanthan gum and 1% distilled monoglycerid was established as the best treatment. Likewise, it was determined that this treatment has an adequate mass reological behavior, a lesser weight and moisture loss compared to the standard sample (without additives), and a product shelf life of 4 days.

KEYWORDS: texture, cassava starch, additives, bread.

### INTRODUCCIÓN

El consumo de pan se ha extendido en el mundo, lo que ha ocasionado una creciente dependencia del trigo importado en nuestro país. Sin embargo, Ecuador dispone de una mayor producción de otros productos como la yuca, la cual, aunque no posea las mismas características panificables del trigo, puede utilizarse para la elaboración de pan, siendo además una alternativa viable como alimento apto para celíacos debido a su carencia de gluten (Tinoco, 2008).

Sin embargo este producto sufre un rápido proceso de envejecimiento, el cual se debe principalmente a la aparición de dos sub-procesos que se manifiestan de forma separada: la rigidez causada por la transferencia de humedad desde la miga a la corteza y la rigidez intrínseca de las paredes celulares asociada a la re-cristalización durante el almacenamiento (Mule, 2011).

El mismo autor manifiesta que los procesos que ocasionan rancidez y dureza en el pan empiezan durante la fase final de enfriado (es decir al salir del horno) y

comienzan incluso antes de que el almidón se haya solidificado. Durante el almacenamiento, la miga del pan se va poniendo cada vez más dura, seca y crujiente. En este proceso la corteza se va haciendo más blanda y húmeda.

La retrogradación es un fenómeno complejo y está directamente relacionado con el envejecimiento del pan, éste depende de varios factores, tales como la fuente y concentración de almidón, la temperatura de cocción y enfriamiento, el pH y la presencia de solutos. La pérdida de la capacidad de retención de agua y la restauración de la cristalinidad también se presentan durante el envejecimiento de los geles de almidón gelatinizados (Villagra, 2010).

Según Mule (2011), otros factores que afectan la velocidad de pérdida de firmeza son la temperatura de almacenamiento, el contenido y la migración de la humedad en el pan durante su almacenamiento.

Los análisis de textura del pan son muy importantes, ya que influyen en gran medida en las decisiones de compra de los consumidores. La corta vida útil del pan y la pérdida de frescura de la miga está fundamentalmente asociada con la evolución de dos parámetros de textura: el incremento de firmeza y pérdida de elasticidad (Callejo, 2010).

Martínez (2010), indica que la goma xanthan es el ingrediente que sustituye las funciones del gluten dentro de la elaboración del pan libre de gluten, debido a su alta capacidad de absorción de agua, de viscoelasticidad y de termo-coagulación, lo cual le diferencia de cualquier otra proteína vegetal. Otro uso en panificación debido a sus propiedades, es como agente emulsificante, ya que además de poseer un alto contenido de fibra dietética, se caracteriza por su capacidad de retención de agua y sus propiedades de adhesión y formación de película.

Según Tejero (2011), el monoglicérido destilado reduce la velocidad de endurecimiento al impedir la cristalización de la fracción de amilopectina, además proporciona fuerza, tolerancia, volumen, flexibilidad, esponjamiento en la miga y suavidad en la corteza; en resumen, aumento de vida en los panes y la bollería.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para la elaboración del pan de almidón de yuca se siguen los pasos propuestos por Vega (2011) que se describen en la Figura 1.

Se trabajó con almidón de yuca al cual se incorporó goma xanthan en cantidades de 0.1, 0.3 y 0.5% p/p y monoglicérido destilado al 0.5, 1 y 1.5% p/p; para evaluar el efecto combinado de estos dos aditivos, se realizaron un total de 9 tratamientos.

Posteriormente, se llevó a cabo la evaluación del efecto de los aditivos en la textura del pan de almidón de yuca a través del tiempo, se empleó el texturómetro Brookfield Analyzer CT-3, acorde al manual de funcionamiento del equipo, con el que se determinaron las ca-

racterísticas de dureza total, trabajo dureza terminado y deformación recuperable de los tratamientos evaluados; los análisis se realizaron diariamente.

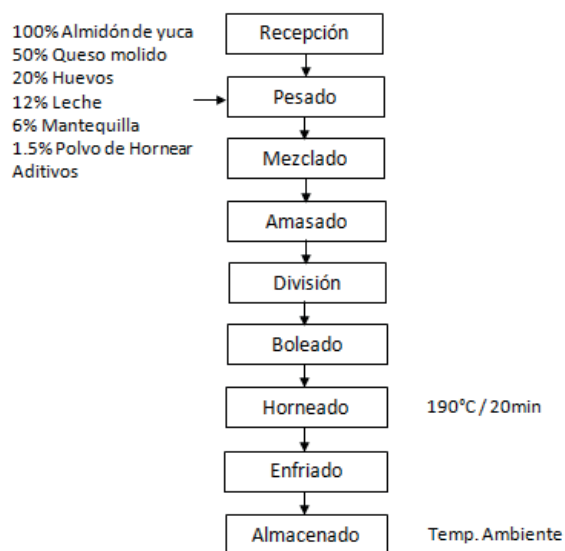


Figura 1. Diagrama de flujo para la elaboración de pan de almidón de yuca

Para la selección del mejor tratamiento, a partir de los análisis realizados en el texturómetro Brookfield, se aplicó el diseño experimental de tipo factorial 3n a través de un Análisis de Varianza (ANOVA) a un nivel de confianza del 95% y la diferencia significativa entre los tratamientos por medio de la Prueba de respuesta óptima en el programa estadístico Statgraphics Plus.

Al mejor tratamiento se efectuó una caracterización reológica de la masa mediante el Mixolab System (Método ICC N° 173), y se estableció entre sus características físicas: la pérdida promedio de peso después de la cocción, método basado en la Norma INEN 530, al igual que la determinación de la pérdida de humedad en el pan de yuca cocinado durante varios días. Asimismo, para evaluar la estabilidad microbiológica del pan de almidón de yuca, se realizó un recuento de mohos y levaduras (Norma INEN 1529-10:98).

Con el fin de determinar el grado de aceptación por parte de consumidores potenciales se realizaron pruebas de tipo sensorial del mejor tratamiento en comparación a 2 marcas comerciales de pan de almidón de yuca, empleando una escala hedónica con rango de (1-5), donde se evaluaron las propiedades sensoriales: apariencia, color, olor, sabor, textura y aceptabilidad a través de una hoja de catación basada en la Norma INEN 530, se selecciona el mejor tratamiento por medio de un diseño experimental de bloques.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se determinaron las variaciones de textura en el pan almacenado a condiciones ambientales; se seleccionó como mejor tratamiento a aquel que presenta menor cambio de dureza en la corteza así como en la miga durante el período de almacenamiento, en comparación con la muestra de pan de almidón de yuca sin aditivos (control).

En lo referente a la característica de dureza total, los datos obtenidos reflejaron una relación directamente proporcional con el tiempo de almacenamiento, ya que se nota un incremento en la dureza con el paso de los días, sin embargo, los valores de los tratamientos reflejan una menor dureza en comparación al pan control (sin aditivo), de igual manera para los análisis de trabajo dureza terminado y deformación recuperable realizados, se observa una tendencia semejante, mostrando a las 72h de almacenamiento los valores reportados en la Tabla 1.

TABLA 1. Datos promedio finales del análisis del texturómetro Brookfield al 3er día para todos los tratamientos

MUESTRA		Análisis		
		DT (g)	TDT (mJ)	DR (mm)
Sin Aditivos	control	1675,00	70,27	3,51
0,1% Goma Xanthan + 0,5% Monoglicérido Destilado	a0b0	1843,33	90,49	2,31
0,1% Goma Xanthan + 1,0% Monoglicérido Destilado	a0b1	1604,78	76,66	2,58
0,1% Goma Xanthan + 1,5% Monoglicérido Destilado	a0b2	1518,72	73,80	2,31
0,3% Goma Xanthan + 0,5% Monoglicérido Destilado	a1b0	1465,00	70,68	3,25
0,3% Goma Xanthan + 1,0% Monoglicérido Destilado	a1b1	1284,78	65,11	2,47
0,3% Goma Xanthan + 1,5% Monoglicérido Destilado	a1b2	1332,44	70,73	2,71
0,5% Goma Xanthan + 0,5% Monoglicérido Destilado	a2b0	1306,11	62,87	3,33
0,5% Goma Xanthan + 1,0% Monoglicérido Destilado	a2b1	1242,78	58,88	2,03
0,5% Goma Xanthan + 1,5% Monoglicérido Destilado	a2b2	1263,86	60,63	2,32

El mejor tratamiento, determinado a través de la prueba de respuesta de optimización en el programa estadístico Statgraphics, aplicando el diseño 32, indicó que, en cuanto a minimización de dureza total y trabajo dureza terminado, el tratamiento óptimo corresponde a a2b1 con 0.5% de goma xanthan p/p y 1% de monoglicérido destilado p/p, cuya formulación logró mantener mejores características en la textura por mayor tiempo durante el almacenamiento, obteniéndose valores de 1242 g para dureza, 58,8 mJ en trabajo dureza terminado y 2,03 mm para la deformación recuperable, en comparación al patrón que produjo valores de 1675 g para dureza, 70,27 mJ en trabajo dureza terminado y 3,51 mm en deformación recuperable.

Por otro lado, se caracterizó el comportamiento reológico del mejor tratamiento mediante el análisis estadístico realizado, a través del Mixolab System, el cual permite caracterizar el comportamiento reológico de una masa sometida a amasado, procesos de calentamiento y enfriamiento. Los índices presentados muestran la factibilidad de empleo del tratamiento a2b1 para la elaboración de un pan de calidad como se observa en la Figura 2, puesto que presentó un valor promedio de 8,5 para el índice de amilasas, lo cual indica que el almidón de yuca analizado presenta una baja actividad amilásica o diastásica, por lo que, según Cortés (2011), origina un pan seco debido a que no existe gran cantidad de las

alfa amilasas para romper las cadenas del almidón.

Sin embargo, se obtuvo un valor de 6 para el índice de retrogradación, el cual indica que el pan elaborado puede durar un tiempo prudencial, puesto que según Dubat (2011), un índice bajo determina una larga vida útil para el pan, porque una alta retrogradación y por ende una menor vida útil se asocia con un índice más alto.

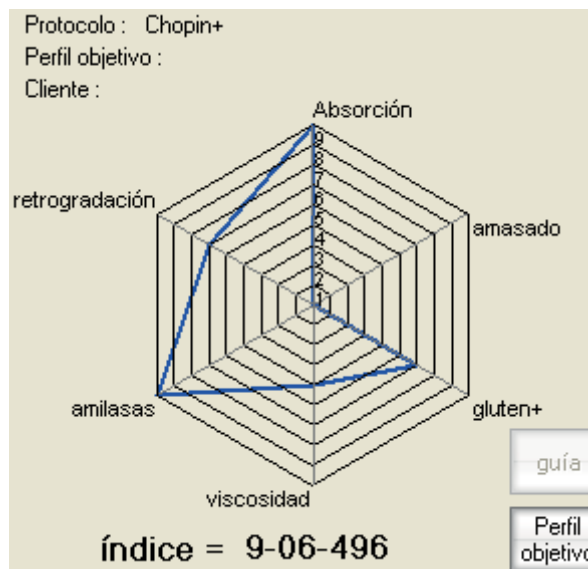


FIGURA 2. Comportamiento reológico para el mejor tratamiento en el Mixolab System

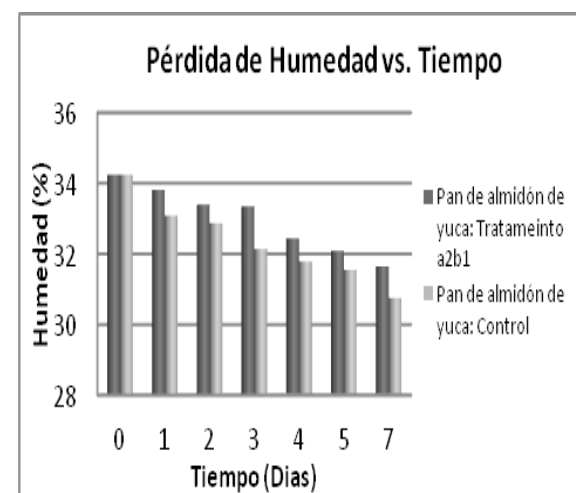


FIGURA 3. Análisis de pérdida de humedad pan de almidón de yuca del mejor tratamiento y control

Se evaluaron además las características físicas (pérdida de humedad y peso) del mejor tratamiento en comparación con el control (sin aditivos); los valores de pérdida de peso posterior al horneado presentados fueron de 1,86g para el pan del mejor tratamiento y 4,41g para la muestra control, además de ello, los valores de pérdida de humedad registrados en el pan del tratamiento a2b1 después del horneado y a lo largo de su almacenamiento, indicaron una humedad final de 31.6% al séptimo día, al contrario del patrón que presentó una humedad final de 30.7%, a pesar de que ambas muestras de pan fueron sometidas a iguales condiciones de almacenamiento,

como se observa en la Figura 3.

De igual manera, se realizaron análisis microbiológicos para recuento de mohos y levaduras, durante varios días para el mejor tratamiento y el control (sin aditivos). Se consideró como límite crítico un valor de 50 ufc/g, por lo que se puede manifestar que el tiempo de vida útil del pan de almidón de yuca con mejoradores (0.5% de goma xanthan y 1% de monoglicérido destilado) es de 4 días a una temperatura de 20°C, puesto que alcanzó un valor de 28 ufc/g para el tratamiento a2b1 y 31 ufc/g en el pan patrón a las 96 horas de almacenamiento.

Por otro lado, la evaluación sensorial realizada a muestras del mejor tratamiento y de marcas comerciales, utilizó a 50 jueces no entrenados, el ensayo se llevó a cabo con réplica. En la Tabla 2, se observa una mayor preferencia por el pan de yuca del mejor tratamiento en cuanto a sabor, aceptabilidad y especialmente textura, cuya puntuación promedio para el pan del mejor tratamiento fue de 4.6/5 puntos para el atributo textura, calificándolo como un pan suave; por el contrario, los panes de las marcas comerciales que obtuvieron calificaciones de 2.68 y 2.3/5 puntos, es decir un pan ligeramente duro.

Se efectuó además un análisis de costos para evaluar su rentabilidad dentro del mercado, revelando un costo unitario de 0,15 ctvs., en comparación a panes de almidón de yuca de la marca "A" que se expenden a 0.30 ctvs. la unidad, y el pan yuca de la marca "B", comercializado a 0.37 ctvs. en el mercado ambateño.

TABLA 2. Resultados del análisis sensorial del pan de yuca con marcas comerciales

MUESTRA	Marca A	Marca B	Tratamiento a2b1
	Pts./5 Pts.		
APARIENCIA	3.32 b	3.94 a	3.80 a
COLOR	2.18 c	2.50 b	2.84 a
OLOR	4.52 a	3.50 b	3.56 b
SABOR	3.50 b	3.54 b	4.26 a
TEXTURA	2.68 b	2.30 c	4.60 a
ACEPTABILIDAD	3.64 b	3.58 b	4.52 a

Promedios seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas según prueba de comparación de Tukey

### CONCLUSIONES

Los aditivos empleados lograron retardar el endurecimiento del pan de almidón de yuca, obteniendo una textura menos envejecida en comparación al pan de almidón de yuca sin aditivos (control), sometidos a iguales condiciones de almacenamiento.

Se estableció como mejor tratamiento a la interacción

a2b1 (0.5% goma xanthan y 1% monoglicérido destilado) por medio de un análisis estadístico. Así mismo, se determinó por medio de un análisis reológico en el Mixolab System que este tratamiento posee un índice de retrogradación 6, lo cual indica que el pan puede durar un tiempo prudencial puesto que, a pesar de estar elaborado con almidón, su tiempo de vida útil corresponde a un valor intermedio, presenta además una menor pérdida de peso y mayor retención de humedad durante el horneado y su almacenamiento en comparación al pan de almidón de yuca control.

Se comprobó asimismo que la presencia de los aditivos no varía el tiempo de vida útil del producto, puesto que tanto el pan control como el del mejor tratamiento se encuentran dentro de los límites establecidos microbiológicamente hasta el cuarto día.

En cuanto a su aceptabilidad, un análisis sensorial realizado entre el mejor tratamiento y marcas comerciales, manifestó una mayor preferencia para el pan de yuca del mejor tratamiento en cuanto a sabor, textura y aceptabilidad, con una rentabilidad alta en el mercado, puesto que su costo unitario fue de 0,15 ctvs para una producción semi-industrial.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CALLEJO, M. 2010. "Principales atributos sensoriales del pan. La importancia de la cata". Universidad Politécnica de Madrid. Dpto. Tecnología de Alimentos. Disponible en: <http://www.molineriaypanaderia.com/tecnica/sensorial-pan>.
- CORTÉS, M. 2011. Harinas, una pieza clave para el futuro panadero. Disponible en: <http://www.candeal.eu/documentacion/tiposharinas.htm> Consultado: 10/05/12.
- DUBAT, A. 2011. Sistema Mixolab. El club del pan. Chile. Disponible en: [http://www.elclubdelpan.com/es/libro\\_maestro/sistema-mixolab](http://www.elclubdelpan.com/es/libro_maestro/sistema-mixolab). Consultado: 10/04/12.
- MARTÍNEZ, P. 2010. "Elaboración de pan de caja libre de gluten para personas con intolerancia al gluten". Universidad Iberoamericana León. México. Disponible en: <http://dspace.leon.uia.mx:8080/jspui/handle/123456789/75>.
- MULE. 2011. "El pan". España. Disponible en: <http://www.mulecarajonero.com/recetas/89-conocimientos-basicos/3791-el-pan>.
- TINOCO, X. 2008. "Efecto de aditivos mejoradores sobre la calidad organoléptica y tiempo de vida útil en la elaboración del pan de almidón de yuca". Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción. Ecuador. Disponible en: <http://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/11933>.
- TEJERO, F. 2011. "Los emulsionantes en la panificación". Asesoría Técnica en Panificación. España. Disponible en: <http://www.franciscotejero.com/tecnica/mejorantes/los%20mejorantes.htm>.
- VEGA, R. 2011. "Etapas de elaboración del pan". Universidad Nacional de Educación Enrique Guzmán y Valle. Perú. Disponible en: <http://rodwenvega.galeon.com/panypas.htm>.
- VILLAGRA, A. 2010. "Almidón retrogradado en el tratamiento dietoterápico de la Diabetes Mellitus tipo 2". Universidad ISALUD. Licenciatura en Nutrición. Disponible en: <http://www.isalud.org/html/pdf/tf-villagra.pdf>



# ELABORACIÓN DE UN PRODUCTO PROTEICO ALTERNATIVO A PARTIR DE SOYA (*Glycine max*) Y QUINUA (*Chenopodium quinoa Willd*)

## DEVELOPMENT OF AN ALTERNATIVE PROTEIN PRODUCT FROM SOYBEAN (*Glycine max*) AND QUINUA (*Chenopodium quinoa Willd*)

López, Susana; Alvarado, Juan de Dios y Silva, Mónica

Universidad Técnica de Ambato (UTA) - Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos  
Campus Huachi, Av. Los Chasquis y Río Payamino, e-mail: fcial@uta.edu.ec

### RESUMEN

La presente investigación propone una nueva tecnología de procesamiento la misma que permite elaborar un producto de origen vegetal rico en proteínas, al ser de carácter socioeconómico busca contribuir con la sociedad permitiendo que las personas puedan alternar con nuevos productos en su dieta diaria y a la vez mantengan una alimentación sana y balanceada.

El objetivo del presente trabajo de investigación fue elaborar un producto proteico alternativo a partir de soya y harina de quinua, para esto se aplicó el diseño experimental 3n, el mismo que consta de dos factores de estudio y cada uno posee tres niveles: Factor A: Proporción de soya (70g, 80g, 90g) y Factor B: Proporción de harina de quinua (30g, 20g, 10g), como resultado de obtuvieron 9 tratamientos en estudio, de los cuales se realizaron los respectivos análisis físico-químicos: pH y acidez, para luego mediante la aplicación de una evaluación sensorial proceder a la determinación del mejor tratamiento en donde se analizaron atributos tales como: color, olor, sabor, textura y aceptabilidad.

Una vez obtenido estadísticamente el mejor tratamiento (Tratamiento 7= 90g soya y 30g harina de quinua) correspondiente a 58,25% soya y 19,42% harina de quinua con relación a la mezcla total de ingredientes, se lo sometió a diferentes análisis obteniendo así como resultado: pH=6,66; acidez=0,0088; humedad=59,8%; proteína=23,0%; aminoácidos esenciales: Histidina=0,61%, Isoleucina=0,81%, Leucina=1,40%, Lisina=1,19%, Metionina=0,29%, Fenilalanina=1,03%, Treonina=0,77%, Valina=0,94%. Se calculó también el tiempo de vida útil, siendo éste de 13 días en almacenamiento por refrigeración a 4°C. El rendimiento fue del 98,5% y el costo unitario por cada bandeja (120g) es de \$1,02 (incluida utilidad del 15%).

Palabras Claves: soya, quinua, proteína, aminoácidos esenciales.

### ABSTRACT

This research proposes a new processing technology which enables it to develop a plant product rich in protein, being of socioeconomic seeks to contribute to society by allowing people to socialize with new products in their daily diet, yet maintain a healthy and balanced food.

The objective of this research was to develop an alternative protein product from soy and quinoa flour for this experimental design was applied 3n, the same two factors consisting of study and each has three levels: Factor A: Proportion of soybeans (70g, 80g, 90g) and Factor B: Proportion of quinoa flour (30g, 20g, 10g), obtained as a result of 9 treatments under study, which is conducted the respective physicochemical analysis: pH and acidity, then by applying a sensory evaluation procedure for determining the best treatment which analyzed attributes such as color, odor, flavor, texture and acceptability.

Once obtained statistically the best treatment (Treatment 7 =90g and 30g soya quinoa flour) corresponding to 58,25% and 19,42% soy quinoa flour relative to the total mixture of ingredients was subjected to various analyzes getting and result: pH=6,66; acidity=0,0088; humidity=59,8%, protein=23,0%, essential amino acids: Histidine=0,61%, Isoleucine=0,81%, Leucine=1,40%, Lysine=1,19%, Methionine=0,29%, Phenylalanine=1,03%, Threonine=0,77%, Valine=0.94%. We also calculated the lifetime, this being 13 days in storage by refrigeration at 4°C. The yield was 98,5% and unit cost for each tray (120g) is \$ 1,02 (including 15% value).



## INTRODUCCION

La falta de productos proteicos con mezclas vegetales similares a la carne se ha convertido en un problema de salud para los consumidores frecuentes de carnes rojas ya que se han visto afectados por una serie de enfermedades cardiovasculares que atacan al organismo, precisamente por la mal nutrición y la falta de productos proteicos alternativos. Estas limitaciones han hecho crecer el interés por investigar nuevas tecnologías de procesamiento para obtener productos alternativos nutricionalmente más sanos pero con las mismas características organolépticas que una carne animal (Acurio, 2009).

La combinación adecuada de soya y quinua ofrece el potencial para elaborar un producto proteico alternativo capaz de cumplir con todos los requerimientos nutricionales y sensoriales similares a una carne animal e incluso mejorando su cantidad de proteína pero siendo ésta de tipo vegetal. Así pues la sustitución parcial en la dieta diaria de proteína animal por proteína vegetal permitirá balancear la alimentación y beneficiar la salud del consumidor, puesto que ambos vegetales se complementan entre sí logrando obtener una fuente rica de proteína y proporcionando a la vez aminoácidos esenciales para el ser humano.

En la actualidad se pueden encontrar diversos concentrados proteicos y proteína texturizada que se comercializan como carne vegetal pero estos concentrados se suelen obtener mediante tratamientos térmicos elevados, provocando modificaciones importantes sobre las propiedades funcionales de las proteínas.

Los tratamientos térmicos modifican la estructura proteica mediante cambios en los enlaces de hidrógeno, ruptura de interacciones hidrofóbicas y separación de pares de iones. Estos cambios dependen de la estructura proteica, concentración de proteína, presión, temperatura, pH y fuerza iónica (Lullien, Perrein, 2002).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Materia prima

Soya, Harina de quinua, orégano, sal de cebolla, ajo, agua.

### Equipos e Instrumentos

Balanza analítica, pH-metro, bureta, vaso de precipitación, probeta, tubos de ensayo, espátula, olla de cocción, tamiz, licuadora.

### Diseño Experimental

Se aplicó un diseño experimental 3n, compuesto por 2 factores de estudio y cada uno con 3 niveles, obteniendo un total de 9 tratamientos, corrido con dos replicas (Tabla 1).

Tabla 1: Diseño Experimental 3n

Factores	Niveles	Tratamientos
A: Proporción de soya	A_0= 70 g	1 A_0 B_0
	A_1= 80 g	2 A_0 B_1
	A_2= 90 g	3 A_0 B_2
B: Proporción de harina de quinua		4 A_1 B_0
	B_0= 30 g	5 A_1 B_1
	B_1= 20 g	6 A_1 B_2
	B_2= 10 g	7 A_2 B_0
		8 A_2 B_1
		9 A_2 B_2

Elaborado por: Susana López, 2013

Proceso de elaboración del producto proteico alternativo a partir de soya y harina de quinua

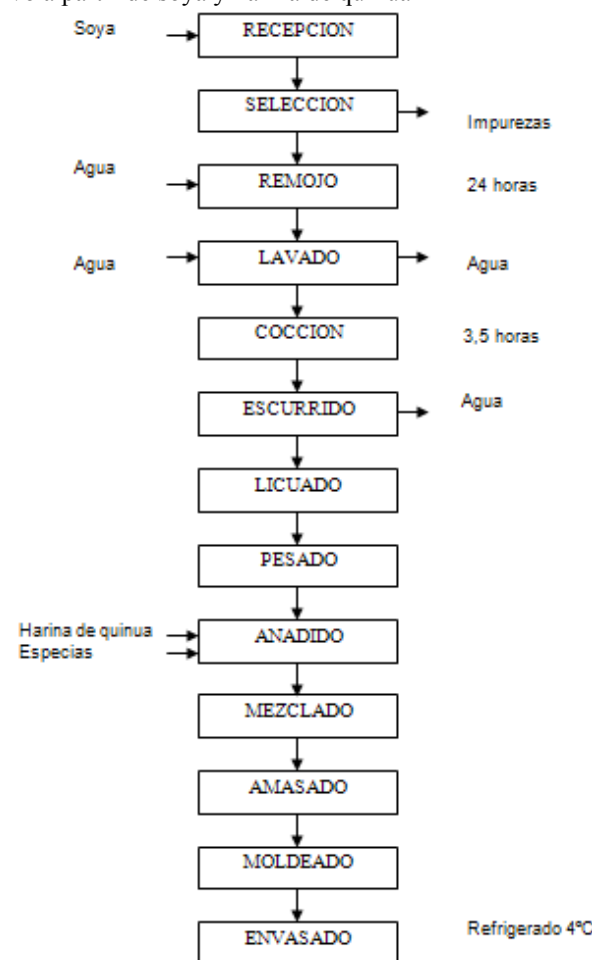


Gráfico 1: Diagrama de flujo del producto proteico alternativo

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Análisis Físico-Químicos

#### pH

En el gráfico 2 se puede observar la variación de pH en los diferentes tratamientos, conforme se aumenta la cantidad de harina de quinua, su pH es más ácido, así: en el tratamiento 1 con 70g de soya y 30g de harina de quinua su pH es de 6,63; en el tratamiento 2 con 70g

de soya y 20g de harina de quinua su pH es de 6,65 y en el tratamiento 3 con 70g de soya y 10g de harina de quinua su pH es de 6,67.

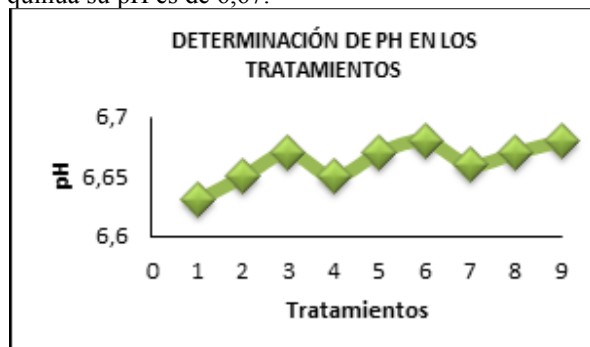


Gráfico 2: Determinación de pH en los Tratamientos

### Acidez

El ácido predominante en la soya es el ácido glutámico cuyo factor de acidez es de 0,1471. En el gráfico 3 se observan los valores de acidez de los diferentes tratamientos en donde se identifica que conforme disminuye la cantidad de harina de quinua del tratamiento, disminuye la acidez, así: en el tratamiento 1 con 70g de soya y 30g de harina de quinua su acidez es de 0,0103; en el tratamiento 2 con 70g de soya y 20g de harina de quinua su acidez es de 0,0088 y en el tratamiento 3 con 70g de soya y 10g de harina de quinua su acidez es de 0,0081.

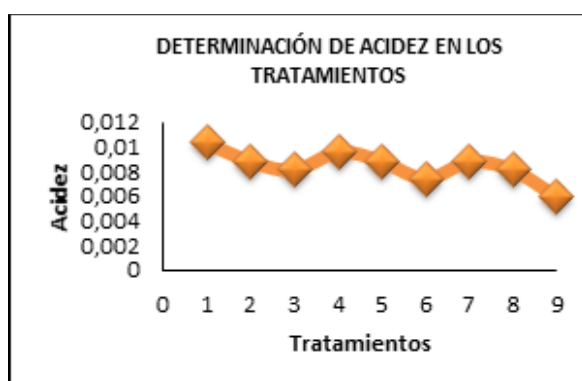


Gráfico 3: Determinación de Acidez en los Tratamientos

### Análisis de la Evaluación Sensorial

Para la evaluación sensorial del producto proteico alternativo a partir de soya y quinua se sometieron los diferentes tratamientos a una previa técnica de cocción como es la fritura en donde se utilizó huevo batido y miga de pan para de esta manera mejorar su sabor y hacer más atractivo y aceptable el producto ante los ojos de los consumidores. El producto fue degustado por 18 catadores, semi-entrenados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, los mismos que evaluaron los siguientes atributos: color, olor, sabor, textura y aceptabilidad.

Al obtener resultados ideales tanto para sabor como para aceptabilidad y una vez comprobado con la prueba

de Tukey se concluye que el mejor tratamiento es el 7 (90g soya y 30g harina de quinua) por lo que debe ser sometido a un análisis de su calidad proteica, análisis microbiológico y determinación del tiempo de vida útil.

Tabla 2: Formulación del Mejor Tratamiento (Cantidad en Gramos)

Ingredientes	Gramos
Soya	90,0
Harina de quinua	30,0
Agua	30,0
Orégano	1,0
Sal de cebolla	1,5
Ajo	2,0
<b>Total</b>	<b>154,5 g</b>

Elaborado por: Susana López, 2013

Tabla 3: Formulación del Mejor Tratamiento (Porcentajes)

Ingredientes	Porcentaje
Soya	58,25%
Harina de quinua	19,42%
Agua	19,42%
Orégano	0,65%
Sal de cebolla	0,97%
Ajo	1,29%
<b>Total</b>	<b>100,00%</b>

Elaborado por: Susana López, 2013

### Determinación de Proteína en el mejor Tratamiento

La determinación de proteína se realizó en el INIAP (Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias) en el Laboratorio de Servicio de Análisis e Investigación en Alimentos; las muestras analizadas fueron 2 la una es el producto proteico alternativo (cocido) en donde se obtuvo un 19,9% de proteína y la otra es el producto (crudo) en donde se obtuvo un 23,0% de proteína.

Tabla 4: Comparación de la cantidad de proteína del producto elaborado con diferentes carnes de origen animal

Alimento (100g)	Proteína (g)
Producto proteico alternativo a partir de soya y harina de quinua	23
Carne de soya	18
Carne vacuna magra	19
Carne de ternera muy magra	20
Hamburguesas desgrasadas	20
Carne de cerdo magra	17
Pollo con piel	28
Pollo sin piel	23
Pavo sin desgrasar	19
Carne de cordero	18

Fuente: Tabla Nutricional de las Carnes (Johnson D., 2010)

El producto proteico alternativo es comparable con los otros indicados, pues el contenido de proteína llega a ser similar a una carne animal.

## Porcentaje de Aminoácidos en el mejor Tratamiento

El porcentaje de aminoácidos se determinó en el INIAP (Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias) en el Laboratorio de Servicio de Análisis e Investigación en Alimentos

Tabla 5: Comparación de los Aminoácidos Esenciales: Patrón FAO, producto elaborado y carne vacuna

% Aminoácidos					
AA Esenciales	Patrón FAO	Producto elaborado	% AA limitante	Carne vacuna	% AA limitante
Isoleucina	0,80	0,81	101,25	0,91	113,75
Leucina	1,40	1,40	100,00	1,49	106,43
Lisina	1,10	1,19	108,18	1,54	140,00
Metionina	0,70	0,29	41,43 *	0,46	65,71 ***
Fenilalanina	1,20	1,03	85,83 **	0,75	62,50 **
Triptófano	0,20	No deter.	-----	0,09	45,00 *
Treonina	0,80	0,77	96,25	0,83	103,75
Valina	1,00	0,94	94,00 ***	1,00	100,00

Aminoácidos limitantes: (\*) primer limitante, (\*\*) segundo limitante, (\*\*\*) tercer limitante Fuente: PATRÓN FAO - OMS 1973

Las proteínas de los alimentos de origen animal en general presentan en su composición un contenido de aminoácidos similar o superior al Patrón FAO, por el contrario las proteínas de los alimentos vegetales son deficientes en diferentes aminoácidos, así se tiene que los cereales son deficientes en lisina y el maíz en triptófano; las leguminosas son deficientes en metionina y las semillas de oleaginosas son deficientes tanto en metionina como en lisina. Cabe recalcar que debido a estas deficiencias las proteínas de origen vegetal son de una calidad inferior o sea que el organismo las utiliza menos eficientemente que las de origen animal.

La calidad de las proteínas vegetales se incrementa mediante suplementación o complementación. En la suplementación se adiciona el aminoácido, que se encuentra por debajo de los requerimientos establecidos mediante el patrón de aminoácidos. Así se tiene por ejemplo que a los cereales se les incrementa el contenido de lisina mientras que a las leguminosas se les agrega metionina.

La complementación se refiere al uso de proteínas con diferente deficiencia, por ejemplo el consumo de leguminosas y cereales simultáneamente. La complementación óptima no significa que necesariamente se deban consumir en cantidades iguales los dos alimentos, sino que al complementarlos satisfagan el porcentaje necesario de aminoácidos requeridos (Kochert, G., 1973).

En conclusión el producto proteico alternativo al ser un alimento complementado entre una leguminosa y un pseudocereal no presenta mayor deficiencia de aminoácidos con respecto al Patrón FAO por lo que se puede decir que el producto elaborado es de buena calidad proteica similar a una carne animal, ratificando de esta manera lo antes mencionado.

## Análisis Microbiológico del Mejor Tratamiento

### Recuento Total de Aerobios mesófilos

Según la Recopilación de Normas Microbiológicas de los Alimentos y Bebidas y otros parámetros Físico-Químicos de Interés Sanitario; los límites mínimo y máximo de aerobios mesófilos es de 104 y 105 UFC/g, respectivamente; por lo que se puede decir que al obtener un máximo de 750000 microorganismos, el producto proteico alternativo está dentro de los parámetros establecidos por la Norma.

Tabla 6: Recuento Total de Aerobios Mesófilos

Tiempo (seg)	Recuento Total Ufc/gr muestra			Promedio Ufc/gr
	R1	R2	R3	
0	956	835	987	926
172800	4000	3600	3800	3800
777600	188000	185000	191000	188000
1036800	700000	760000	790000	750000

Fuente: Laboratorio de la UOITA

### Recuento de Mohos y Levaduras

Según la Norma Técnica AINIA (norma Microbiológica), los límites mínimo y máximo de mohos y levaduras es de 10 y 105 UFC/g, respectivamente; por lo que se puede decir que al obtener un máximo de 17 levaduras, el producto proteico alternativo está dentro de los parámetros establecidos por la Norma.

Tabla 7: Recuento Total de Mohos y Levaduras

Tiempo (seg)	Recuento Total Ufc/gr muestra			Promedio Ufc/gr
	R1	R2	R3	
0	14	2	14	10
172800	15	13	11	13
777600	15	14	16	15
1036800	18	15	18	17

Fuente: Laboratorio de la UOITA

### Vida Útil del Mejor Tratamiento

Para determinar el tiempo de vida útil se sometió a refrigeración (4°C) a varias muestras del mejor tratamiento con el propósito de ir analizando una por una conforme pasan los días.

Las siembras microbiológicas se fueron realizando paulatinamente hasta el doceavo día en donde las muestras aún mantenían sus características físicas en buenas condiciones, pero esto duro hasta el día 15 puesto que para el siguiente día ya se observó la presencia de mohos, indicativo de que el producto ya está en malas condiciones. De esta manera se determina que durante la fase experimental el producto presenta un tiempo de vida útil máximo de 15 días.

### Calculo del tiempo de vida útil

#### Ecuación 1:

$$\ln C = Kt + \ln C_0$$

Donde:

$r = 0,9985$   
 $\ln C_0 = 6,9872$   
 $K = 6E-06$   
 $C = 10E5$  valor bibliográfico para recuento total de Aerobios Mesófilos, que se considera como límite máximo de contaminación según la: Recopilación de Normas Microbiológicas de los Alimentos y Bebidas y otros parámetros Físico-Químicos de Interés Sanitario

Despejando tiempo de la ecuación anterior se tiene:

$$t = (\ln C - \ln C_0) / K$$

$$t = (13,8155 - 6,9872) / (6E-06)$$

$$t = 1138050 \text{ segundos}$$

$$t = 13,2 \text{ días}$$

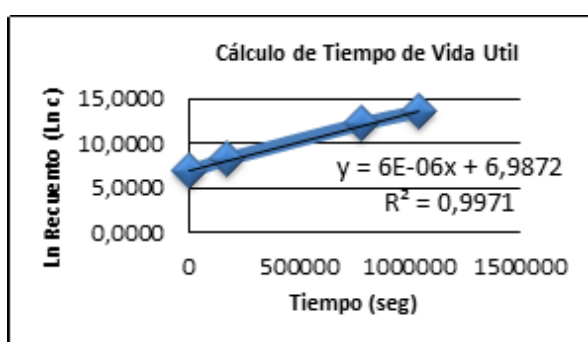


Gráfico 4: Cálculo de Orden de Reacción "n"

El tiempo de vida útil obtenido en forma teórica es de 13 días mientras que el tiempo de vida útil experimental de 15 días lo que quiere decir que tanto la parte experimental como los cálculos realizados están debidamente ejecutados pues la diferencia de días es mínima.

Cabe recalcar que el tiempo de vida útil del producto también fue comparado con otros productos similares existentes en el mercado como: empanadas de verde, bolones de verde, empanadas de morocho, cuyo tiempo de vida útil es de 15 días, por lo que se puede concluir que el producto proteico alternativo es un producto inocuo que cumple con todos los requerimientos que demanda el consumidor.

#### Rendimiento y Costo del Producto

El producto proteico alternativo tiene un rendimiento de 98,5% lo que representa que la materia prima durante su transformación en producto terminado no presenta pérdidas al contrario la soya durante su remojo y cocción absorbe gran cantidad de agua la misma que permite mayor obtención de masa de soya con respecto a la cantidad de grano de soya que ingresa al proceso, por lo que se concluye que es un producto altamente rentable.

Para determinar el rendimiento del producto se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{Rendimiento} = W_{\text{Final}} / W_{\text{Inicial}} * 100$$

$$\text{Rendimiento} = 6,76 \text{Kg} / 6,86 \text{Kg} * 100$$

$$\text{Rendimiento} = 98,5\%$$

Para el costo de producción se analizaron varios detalles como: materiales directos e indirectos, equipos y utensilios, suministros empleados para la industrialización y finalmente costos referentes al personal; obteniendo así un precio por cada bandeja de \$1,02 (incluida utilidad del 15%), la misma que contiene 120g (12 tortillas de 10g cada una).

#### CONCLUSIONES

En el presente estudio de investigación se elaboró un producto proteico alternativo en el que se utilizó la soya y la quinua como ingredientes ya que estos son alimentos que poseen alto contenido de proteína, razón por la cual se los combinó entre sí para poder obtener un producto diferente el mismo que contenga proteína de buena calidad capaz de satisfacer las necesidades nutritivas y a la vez ayudar a preservar la salud del ser humano.

Se determinó la variación de pH por el efecto de la mezcla soya y quinua en el producto terminado, llegando a la conclusión de que mientras más cantidad de harina de quinua esté presente en el producto proteico alternativo, este es más ácido puesto que la quinua es más ácida que la soya, claro que la diferencia es mínima así por ejemplo: en el tratamiento 7 con 90g de soya y 30g de harina de quinua su pH es de 6,66; en el tratamiento 8 con 90g de soya y 20g de harina de quinua su pH es de 6,67 y en el tratamiento 9 con 90g de soya y 10g de harina de quinua su pH es de 6,68, cabe recalcar que el tratamiento 7 fue determinado como el mejor de todos y su pH es similar a la carne animal y está dentro del rango establecido para la misma siendo éste de 6,66 a 6,68.

Se dedujo el mejor tratamiento en base a evaluación sensorial en donde se elaboraron 9 tratamientos con diferentes proporciones de soya y harina de quinua, se utilizaron 18 catadores y cada uno degustó 5 tratamientos, para esto se empleó una ficha de catación la misma que permitió calificar atributos como: color, olor, sabor, textura y aceptabilidad todo esto mediante una escala hedónica de 5 puntos la misma que va desde 1 "gusta mucho" hasta 5 "no gusta", gracias a la aplicación de cálculos estadísticos tanto en Excel como Statgraphics se concluyó que el mejor tratamiento es el 7 cuya proporción es 90g de soya y 30g de harina de quinua lo que representa 58,25% soya y 19,42% harina de quinua ya que éste obtuvo en promedio una calificación de 1 (gusta mucho) tanto para sabor como para aceptabilidad.

Se estimó el tiempo de vida útil del mejor tratamiento, mediante unidades formadoras de colonias (UFC), para esto se realizaron siembras microbiológicas du-

rante 2 semanas aproximadamente tanto para recuento de Aerobios Mesófilos como para mohos y levaduras, el producto fue sometido a refrigeración (4°C), experimentalmente el tiempo de vida útil del producto es de 15 días puesto que sus propiedades tanto físicas como sensoriales ya se vieron afectadas y en forma teórica el tiempo de vida útil calculado es de 13 días, por lo que se puede concluir que el producto almacenado en óptimas condiciones varía su tipo de vida útil de 13 hasta máximo 15 días.

Se caracterizó la calidad proteica del mejor tratamiento ya que el producto alternativo elaborado a base de soya y harina de quinua posee un porcentaje de aminoácidos similar al Patrón FAO, no presenta mayor deficiencia de aminoácidos esenciales por ser un alimento complementado convirtiéndolo en producto de buena calidad proteica, el mismo que sin duda alguna puede y debe ser incluido en la dieta diaria, para así proporcionar una alimentación balanceada y más saludable para el organismo, cabe recalcar que por ser éste un producto de origen vegetal complementado su proteína es de buena calidad y lo más importante es que no va a traer consecuencias en la salud del ser humano, el porcentaje de proteína presente en el producto elaborado es de 23% mientras que la proteína presente en la carne vacuna es de 19% por lo que se puede concluir que el producto proteico alternativo, cumplió con todos los objetivos planteados en la presente investigación, llegando de esta manera a ser similar en calidad proteica con una carne animal.

En muchos casos la vida de anaquel de un alimento no sigue un determinado orden de degradación, por lo que se determinó el valor de  $n$  dando como resultado que  $n=1$  lo que quiere decir que es una ecuación de cinética de primer orden.

## REFERENCIAS

ACURIO, P. 2009. "Propiedades Nutricionales de las Leguminosas". Departamento de Tecnología Alimentaria. Edición única. México. Pags: 64-80.

AGUIRRE, R. 2011. "Semillas de Resistencia Alimentaria, La Quinua y la Maca Alimentos Andinos del Futuro". Editorial Lunazul. Primera Edición. Perú. Pags: 45-52.

ARAUJO, O. 2007. "Propiedades Nutricionales de la Quinua". Departamento de Agricultura. Mercosur. Bolivia. Pags: 184-186.

ARNUA, S. 2006. "Soya Descripción y Características Físicas". Editorial Alas. Edición única. Argentina. Pags: 63-84.

ASBRIDGE, D. 2010. "Situación Mundial de la Soya". Asociación Americana de Soya. Revista Soya Noticias N°15. E.E.U.U. Pags: 15-19.

CARRASCO, V. 2006. "Quinua: Características Físicas". Revista Agricultura y Tecnología Alimentaria. Editorial Arcasur. Edición Única. Perú. Pags: 123-126.

CAVINS, F. 2010. Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) Base Nacional de Datos, sobre nutrientes como estándar de referencia, Edición única. Pags: 145-150.

ENDRE, F. 2007. "Proteína de Soya". Asociación americana de Soya. Revista Soya Noticias N°20. E.E.U.U. Pags: 32-38

ERMAND, J. 2009. "Cultivos de Soya". Asociación Americana de Soya. Revista Soya Noticias N° 16. Pags: 22-28.

ERICKSON, D. 2010. "Composición Química de la Semilla de Soya". Asociación Americana de Soya. Revista Soya Noticias N°17. E.E.U.U. Pags: 235-239.

GIBNEY, C. 2006. "Proteínas Vegetales". Instituto de Investigación Tecnológica de Nicaragua. Editorial Senarol. Segunda Edición. Pags: 264 -267.

JOHNSON, D. 2010. "Composición de las Carnes" Editorial Asociación Americana de Nutrición. Edición única. E.E.U.U. Pags: 162 -163.

KOCHERT, G. 1973. "Calidad Proteica de los Alimentos". Editorial Iowa. Primera Edición. Estados Unidos. Pags: 326-340.

LULLIEN, PERREIN, 2002. "La Proteína y su Estructura". Editorial Hemisferio Sur. Primera Edición. Argentina. Pags: 120-129.

NARANJO, P. 2008. "Guión de Prácticas". Folleto Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Quito-Ecuador. Pags: 124-126.

ORTEGA, V. 2010. "Proyecto de Mejoramiento Agropecuario de la FAO" Editorial Interamericana S.A. Ecuador: Pags: 56-82.

PEDLUM, S. 2005. "Productos Elaborados base de Soya" Asociación Americana de Soya. Revista Soya Noticias N°21. E.E.U.U. Pags: 41-43.

PADILLA, H. y SÁNCHEZ, G. 2003. "La Quinua y sus Propiedades: Nutricionales y Curativas". Archivos Latinoamericanos de Nutrición. Bolivia. Editorial Lunazul. Primera Edición. Pags: 152-158.

PERALTA, E. 2010 "Consumo de Quinua en Ecuador". El Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (Iniap). Revista del Programa Nacional de Leguminosas y Granos Andinos. Ecuador. Pags: 35-42.

PEREZ, L. 2008. "Limitada Oferta de Productos Elaborados a Base de Soya (Glycine max) y su Escaso Consumo en la Ciudad de Ambato". Perfil de Proyecto de Investigación previo a la Obtención del Título de Ingeniero en Alimentos. Ambato-Ecuador. Pags: 10-14.

**HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS DE SUERO LÁCTEO  
CON PROTEASAS DE TRACTO DE TRUCHA ARCOIRIS  
(*Oncorhynchus mykiss*) PARA REDUCIR LA CONTAMINACIÓN  
ORGÁNICA DEL AGUA MEDIANTE LA POSIBLE APLICACIÓN  
COMO FERTILIZANTE ORGÁNICO.**

**ENZYMATIC HYDROLYSIS OF WHEY PROTEINS WITH  
PROTEASE FROM DIGESTIVE TRACT OF RAINBOW TROUT  
(*Oncorhynchus mykiss*) TO REDUCE ORGANIC POLLUTION OF  
WATER THROUGH ITS POSSIBLE APPLICATION AS AN ORGANIC  
FERTILIZER.**

Oscar Salazar, Ana Alfaro, Cecilia Carpio

Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.  
Campus Académico Huachi. Av. Los Chasquis y Río Payamino, Tel: 032400987.  
e-mail: oscarins8@gmail.com

**RESUMEN**

En la presente investigación, se aplicó un método sencillo para la extracción de proteasas a partir del tracto de truchas arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*). El contenido proteico de los extractos cuantificados por el método de Lowry, fue de  $1,213 \pm 0,04$  mg/ml para los estómagos y  $1,446 \pm 0,02$  mg/ml para los intestinos, expresados como BSA. Se determinó también la actividad proteásica por el método de Anson utilizando hemoglobina como sustrato. Los valores de actividad fueron de  $4,70 \text{ E-}04$  y  $6,92 \text{ E-}05$  (milimoles de tirosina desprendidas por la hidrólisis en un minuto) para las enzimas extraídas utilizando los estómagos y los intestinos, respectivamente.

Se determinó que con el mejor tratamiento para la hidrólisis del suero lácteo se alcanza un 9,3% de hidrólisis, con este porcentaje de hidrólisis se pudo aportar nutrientes (péptidos y aminoácidos) que pueden ser asimilados por las plantas, produciendo un aumento de tamaño del follaje y del rábano, lo cual muestra que el suero lácteo hidrolizado puede ser empleado como fertilizante orgánico.

Palabras clave: truchas, suero lácteo, hidrólisis, rábanos, fertilizante.

**SUMMARY**

In this research, a simple method for the extraction of proteases from the tract of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) was applied. The protein content of the extracts as quantified by the Lowry method and expressed as BSA was  $1.213 \pm 0.04$  mg / ml for the stomach extract, and  $0.02 \pm 1.446$  mg / ml for the solution from the intestines. Protease activity was also determined by the Anson method using partially denatured hemoglobin as substrate. Activity values were  $4.70\text{E-}04$  and  $6.92\text{E-}05$  EU (millimoles of tyrosine per minute released by hydrolysis) for the enzymes extracted using the stomachs and intestines, respectively.

It was determined that the best treatment (a0b03) for whey hydrolysis produced 9.3 % hydrolysis, with this percentage of hydrolysis, whey hydrolysate could provide with nutrients (peptides and amino acids) that plants can absorb thus producing enlarged radish and radish leaves , which shows that hydrolyzed whey can be used as organic fertilizer.

Keywords: trout, whey, hydrolysis, radish, fertilizer.

## INTRODUCCIÓN

Las enzimas son catalizadores biológicos de naturaleza proteica altamente específicos. Se recuperan al final de la reacción igual como estaba al principio (no se consumen en la reacción) de tal manera que una pequeña cantidad de enzima puede catalizar la transformación de una gran cantidad de sustrato (Cordero et al., 2006). Las proteasas son enzimas hidrolíticas, clasificadas como EC 3.4. Estas enzimas degradan las proteínas mediante la hidrólisis de los enlaces peptídicos, como resultado de su actividad producen cadenas más cortas (péptidos) o aminoácidos libres. Las enzimas se utilizan en varios tipos de industria, como la cervecera, la de fabricación de detergentes, tratamiento de cuero, elaboración de quesos y en ablandamiento de carnes (Fernández, 2008).

La industria láctea genera cantidades significativas de residuos líquidos, mayormente leche diluida, leche separada, crema y suero, incluyendo grasas, aceites, sólidos suspendidos y nitrógeno. La descarga de éstos sin tratamiento previo se convierte en un foco contaminante. Los lavados contienen residuos alcalinos y químicos utilizados para remover la leche y los productos lácteos; así como materiales total o parcialmente caramelizados de los tanques, tambores, latas mantequeras, tinas, tuberías, bombas, salidas calientes y piso (Valencia et al., 2009).

Del sistema digestivo de animales marinos se han aislado tres tipos de serin-proteasas: tripsina, quimotripsina y elastasa. Estas enzimas tienen estructuras similares y comparten esencialmente la misma secuencia de aminoácidos alrededor de la tríada catalítica formada por la histidina 57, serina 195 y aspártico 102. Todas las proteasas pertenecientes a esta subclase tienen en común los primeros 3 dígitos del código asignado por la CE: 3.4.21, e individualmente les corresponden los siguientes códigos: tripsina 3.4.21.4, quimotripsina 3.4.21.1 y elastasa 3.4.21.11 (Whitaker, 2000).

Los aminoácidos son compuestos fundamentales para la vida de todo ser vivo, ya que contienen C, H, O, S y N enlazados de forma que su unión forma estructuras básicas en la célula de un ser vivo, las proteínas. Los aminoácidos libres son sustancias nutritivas de fácil absorción y asimilación tanto por vía foliar como radicular, transportándose rápidamente a los órganos del vegetal en los que existe una mayor demanda debido a su actividad. Los aminoácidos tienen una importante actividad biocatalizadora de reacciones enzimáticas, activando la síntesis de fitohormonas, así como un importante papel como nutriente directo de fácil asimilación que no es necesario metabolizar (Acuña et al., 2008).

Las transformaciones de aminoácidos en nuevos aminoácidos así como otras reacciones bioquímicas son reguladas por hormonas y principalmente por las enzimas que juegan el papel de catalizadores biológicos. Los hidrolizados de proteína parece ser que afectan de algún modo positivo a estos mecanismos (Acuña et al., 2008).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Materiales

Truchas arco iris obtenidas en el Centro recreacional de pesca deportiva "El Chaparral" ubicado en el cantón Salcedo de la provincia de Cotopaxi, Suero Lácteo obtenido en Productos Lácteos "Kasu" cantón Ambato de la provincia de Tungurahua, Albumina sérica bovina (BSA), Tyrosina, Hemoglobina.

### Métodos

#### Obtención de proteasas

Se adquirió truchas arco iris en el Centro recreacional de pesca deportiva "El Chaparral" del cantón Salcedo de la provincia de Cotopaxi, las que fueron seleccionadas por tamaño, para facilitar el transporte.

Se extrajo el tracto digestivo completo en baño de hielo realizando una incisión en toda la parte inferior de la trucha y se separó las dos regiones digestivas estómago e intestinos. Para comprobar si estas diferencias se reflejarán en las características de las proteasas que actúan en cada parte del aparato digestivo.

Los extractos enzimáticos se obtuvieron tras homogeneizar las porciones digestivas en un mortero, el estómago con buffer de acetato de sodio pH 4 en una proporción de mezcla de 1 a 2 peso/volumen, y los intestinos en buffer carbonato de sodio de pH 9 con la misma relación peso volumen (1 a 2). Los homogeneizados fueron centrifugados a 3000 rpm durante 15 min. El sobrenadante se almacenó a temperatura de refrigeración hasta su posterior uso (Moyano et al., 1996).

#### Cuantificación de proteínas

Para la cuantificación de proteínas se utilizó el método de Lowry (Chang, 2003) y se empleó como estándar seroalbúmina bovina (BSA) de 1 mg/ml.

#### Curva de calibración de albúmina sérica bovina (BSA)

Para preparar la curva de calibración se utilizó 1 ml de soluciones de BSA con concentraciones que variaron entre 0,1 a 1,0 mg/ml se agregó 5 ml de reactivo de Lowry en cada tubo, se agitó y se dejó en reposo por 15 minutos, para agregar 0,5 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu al 33%, diluido en agua se agitó y se dejó reposar 30 minutos, se midió las absorbancias de cada estándar en un espectrofotómetro HACH DR 2800, a 500 nm.

La pendiente de la recta será el factor que relaciona a la absorbancia obtenida a 500 nm con la concentración de proteínas en la muestra.

#### Cuantificación de las proteínas en los extractos

Para medir la cantidad de proteína en las muestras se tomó 0,2 y 0,4 ml del extracto del estómago y de los intestinos, respectivamente, se completó el volumen de cada una hasta 1 ml con agua destilada y se procedió como se describe en anteriormente.

#### Determinación de la actividad enzimática

Para cuantificar la actividad de las proteasas del estómago y de los intestinos se utilizó el método de Anson (1938). Para las del estómago, se hidrolizó 2,5 ml de hemoglobina (2,0% p/v, pH 1,6) desnaturalizada con



HCl 0,3 N con 0,5 ml de la solución de la proteasa del estómago extraída a pH 4, y para cuantificar las proteasas de los intestinos extraídas a pH 9, el sustrato fue hemoglobina al 2,2% desnaturizada con urea en medio alcalino, ambas reacciones se realizaron a 25°C, durante 10 min. La hemoglobina no hidrolizada se precipitó con 5 ml de ácido tricloroacético (TCA al 8%). Para eliminar cualquier residuo sólido, se centrifugó el sobrenadante, a 10000 rpm por 15 minutos, se tomó una alícuota de 1,5 ml del sobrenadante clarificado, se agregó 5 ml de hidróxido de sodio 0,5 N, se agitó enérgicamente y se añadió 1,5 ml de reactivo fenólico al 33%, el cual produce una coloración azul con tirosina, triptófano y en menor grado con cistina, cisteína e histidina. La absorbancia se midió a 600 nm en un espectrofotómetro HACH DR 2800 (Guadix et al., 2000).

Para la proteasa del estómago, 1 unidad de actividad (UEEstómagos) se definió como la cantidad de enzima que permite la formación de hemoglobina digerida no precipitable por ácido tricloroacético con la misma absorbancia que 1 miliequivalente de tirosina por minuto en 5 ml de la mezcla estándar de digestión a pH 1,6 y 25°C.

Para las proteasas de los intestinos, 1UEIntestinos equivale a la cantidad de enzima que permite la formación de hemoglobina digerida no precipitable por ácido tricloroacético con la misma absorbancia que 1 miliequivalente de tirosina por minuto en 5 ml de la mezcla estándar de digestión, medida a pH 7,5 y 25°C a partir de hemoglobina parcialmente desnaturizada con urea en medio alcalino.

La expresión matemática para el cálculo de la actividad para los dos tipos de enzimas es la siguiente:

$$\text{Activ.} \frac{\text{UE}}{\text{ml}} = \frac{[\text{Tyr}] \text{ mM}}{t \text{ (min)}} \times \frac{V_{\text{Reacción}} \text{ (l)}}{V_{\text{enz}} \text{ (ml)}} \times F_d$$

Donde:

[Tyr] = a las milimoles de Tyr/l obtenidas a partir de la curva estándar.

t = 10 min

VReacción=3 ml = 3 x 10<sup>-3</sup>L

Venz = 0,5 ml

Fd = factor de dilución que en este caso es 1 porque no hubo dilución de los productos de la reacción.

#### Curva de calibración con tirosina 181,2 mg

La curva de calibración de tirosina se preparó a partir de una solución madre 0,179 mM de tirosina en HCl 0,2 N. El rango de concentraciones utilizadas varió entre 0,036 y 0,179 mM, de cada dilución se tomó una alícuota de 1,5 ml para suspenderla en 5 ml de NaOH 0,5 N, agregarle 1,5 ml de Folin-Ciocalteu y medir las absorbancias en un espectrofotómetro HACH DR 2800 a 600 nm, la ecuación de la recta relaciona las absorbancias obtenidas a 600 nm con la concentración mM de tirosina.

#### Tratamientos de hidrólisis enzimática en el suero

#### lácteo

El suero empleado para la hidrólisis fue obtenido de la empresa de productos lácteos “Kazú” del cantón Ambato de la provincia de Tungurahua.

Para elaborar las curvas de hidrólisis del suero lácteo producidas por la actividad de las proteasas presentes en el tracto de las truchas, se mezcló en un erlenmeyer 36 ml de suero lácteo con 4 ml de la solución de proteasas del estómago o de los intestinos, se agitó e inmediatamente se tomó una alícuota de 3 ml de la solución, la cual constituye el blanco, a continuación se colocó este erlenmeyer en un agitador NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC a la temperatura establecida en el diseño experimental (18°C y 38°C) a una velocidad de agitación de 150 rpm y se comenzó a registrar el tiempo de reacción.

Se extrajeron muestras de 3 ml luego de 1, 2, 3 y 4 h de hidrólisis. A cada alícuota (3 ml) se agregó 5 ml de ácido tricloroacético al 8% diluido en agua para precipitar las proteínas que no fueron hidrolizadas, se centrifugó la mezcla a 10000 rpm por 15 minutos en una centrifuga PLC SERIES, se tomó una alícuota de 1,5 ml del sobrenadante y se procedió como se describe en 3.1 para los estándares de tirosina. Se midió la absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro HACH DR 2800.

La cantidad de producto formado por la actividad hidrolítica de las proteasas del estómago y del intestino de la trucha se determinó a partir de las absorbancias de cada tratamiento, calculando la concentración de tirosina liberada de las proteínas presentes en el suero lácteo.

#### Diseño experimental

Tabla 1: Factores para el diseño experimental.

Factor A = Origen de las enzimas	
a0	Enzimas Ácidas (estómago)
a1	Enzimas Alcalinas (intestinos)
Factor B = Temperatura para la hidrólisis	
b0	18°C
b1	38°C
Factor C = Tiempo de hidrólisis	
c0	1 Hora
c1	2 Horas
c2	3 Horas
c3	4 Horas

Para el estudio del mejor tratamiento para la hidrólisis se utilizó un diseño Ax BxC con 2 réplicas para cada tratamiento (Tabla 1), y una prueba de comparación múltiple (Tukey).

#### Hidrólisis total del suero lácteo

En una ampolla de vidrio se colocó 1,5 ml de ácido clorhídrico (8 M) con 0,5 ml del suero que va a ser tratado, se selló la ampolla y se llevó a la estufa a 110°C



por 48 horas, para romper todos los enlaces peptídicos de las proteínas (Guardix et al., 2000).

Pasado el tiempo mencionado se enfrió la muestra, se neutralizó con 3,1 ml de hidróxido de sodio (8 M), se la centrifugó por 15 minutos a 10000 rpm en una centrifuga PLC SERIES, se tomó 1 ml del sobrenadante y se diluyó con 3 ml de agua; de esta dilución (1/4) se tomó 1,5 ml y se procedió como se describe en 3.1. La intensidad del color azul se determinó midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro HACH DR 2800 a 600 nm. Preparación del blanco

En un tubo de ensayo se colocó 1,5 ml de ácido clorhídrico (8 M) con 0,5 ml del suero, se mezcló e inmediatamente se neutralizó con 3,1 ml de hidróxido de sodio (8 M), se lo centrifugó por 15 minutos a 10000 rpm en una centrifuga PLC SERIES, se tomó 1 ml del sobrenadante se diluyó con 3 ml de agua, de esta dilución 1/4 se tomó 1,5 ml y se agregaron todos los reactivos descritos. Con esta solución se ajustó el 0 del espectrofotómetro.

#### Determinación del porcentaje de hidrólisis

Se calculó a partir de la relación existente entre la cantidad de tirosina generada por la hidrólisis enzimática y la cantidad total de tirosina producida por hidrólisis ácida, expresada en porcentaje.

#### Empleo del suero hidrolizado para aplicación foliar y radicular en plantas de rábano

Se sembró rábanos en dos cajas con el mismo tipo de tierra, se colocó tres semillas en cada hoyo ubicados a un radio de 10 cm, ; a los rábanos de una caja se aplicó foliar, y radicularmente el suero lácteo hidrolizado diluido al 10% en agua potable, en la otra caja se le aplicó foliar y radicularmente agua potable, ésta sirvió como testigo. Para la aplicación del suero hidrolizado se regó las plantas cada semana iniciando el proceso a la semana de haber sido sembrados.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuantificación de proteínas y de la actividad catalítica en proteasas de trucha

Dos factores importantes de determinar para una caracterización preliminar de enzimas son el contenido de proteínas y la actividad enzimática, debido a que las enzimas son catalizadores proteicos.

Tabla 2: Contenido de proteínas, actividad catalítica y actividad específica de las proteasas extraídas del tracto digestivo de truchas.

Fuente	Concentración proteica (mg de BSA/ml)	Actividad catalítica (UE/ml)	Activ. Específica* (UE/mg proteína)
Estómagos	1,213±0,04	4,70E-04	3,87E-04

Intestinos	1,446±0,02	6,92E-05	4,79E-05
------------	------------	----------	----------

\*Relación entre la actividad catalítica y el contenido de proteína de las enzimas

En la Tabla 2 se resumen los valores del contenido de proteínas y la actividad enzimática de los extractos obtenidos a partir de estómagos e intestinos de trucha, calculados a partir de los datos experimentales y gráficos de las curvas estándar de BSA y tirosina, Gráficos 1 y 2. Se incluye también la actividad específica de las proteasas de trucha.

Los resultados revelan que existe una concentración de proteínas expresadas como BSA equivalente a 1,213±0,04 mg/ml en los estómagos de las truchas frente a una concentración de 1,446±0,02 mg/ml para las proteasas de los intestinos, en ambos casos las concentraciones fueron calculadas en muestra húmeda, estos datos muestran que la concentración de proteínas en los intestinos es mayor en un 8,77%.

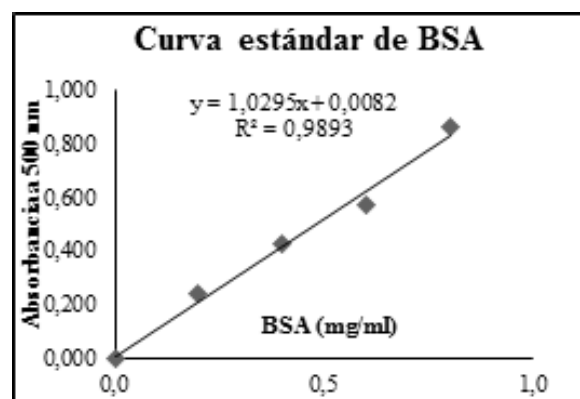


Gráfico 1. Curva de calibración de Albúmina Sérica Bovina (BSA), para cuantificación de proteína.

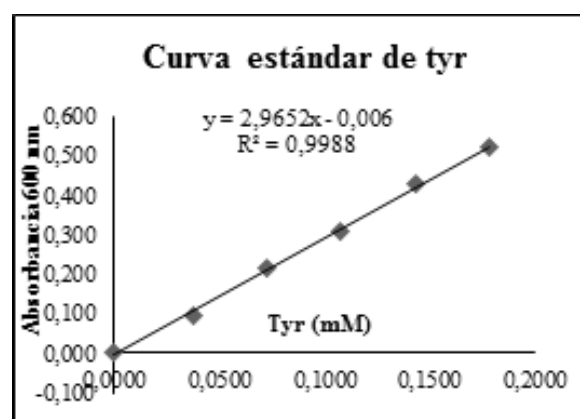


Gráfico 2. Curva de calibración de Tirosina para determinar la actividad enzimática.

#### Determinación de la actividad enzimática

Por medio del método normalizado de Anson se determinó la actividad proteolítica de las enzimas presentes en el tracto de las truchas, empleando hemoglobina como sustrato. La actividad catalítica de las enzimas del estómago fue de 4,70E-04 UEest/ml de extracto (mM de tirosina/min-ml), en tanto que las de los intestinos

tuvieron una actividad de  $6,92E-05$  UEint/ml. Sin embargo, no es factible establecer una comparación exacta entre los valores de actividad ya que las condiciones de hidrólisis (pH del medio de reacción y preparación del sustrato) empleadas para los dos tipos de proteasas son distintas.

### Hidrólisis enzimática de proteínas en el suero lácteo

Las curvas de cinética enzimática en los 16 tratamientos se presentan en el Gráfico 3, en el cual se observa el avance de la hidrólisis del suero lácteo provocado por las proteasas del tracto digestivo de la trucha expresado como variación de la absorbancia a 600 nm debido a la presencia de fragmentos de proteína no precipitables con TCA. Al analizar estas gráficas se nota que las proteasas ácidas a 18°C, producen la máxima conversión a las 4 horas de reacción.

Las proteasas ácidas a 38°C, presentan mayor actividad enzimática, 50% más alta que a 18°C en la primera hora de proceso luego de la cual disminuye significativa-  
Tabla 3: Producto formado por la actividad hidrolítica de las proteasas en los diferentes tratamientos, expresada en concentración milimolar de tirosina.

mente. A 38°C se obtiene la misma conversión máxima luego de 4 horas pero el incremento en la cantidad de producto formado luego de la primera hora es tan solo del 9% frente al 66% de aumento cuando la temperatura es de 18°C.

El proceso de hidrólisis de las proteínas del suero lácteo catalizado por las proteasas alcalinas, muestra que al cabo de 4 h de proceso no ha alcanzado la máxima conversión a ninguna de las dos temperaturas. A 18°C, se ha conseguido apenas un tercio del máximo logrado con las proteasas ácidas y a 38°C, la conversión equivale tan solo al 43,6% del valor final con proteasas ácidas.

### Diseño experimental

Los resultados obtenidos mediante el diseño experimental empleado en este estudio se resumen en la Tabla 3.

Los promedios luego del respectivo análisis estadístico, indican que el tratamiento con mayor concentración de

Tratamientos	[C1]	[C2]	[C3]	Promedio±DS
a0b0c0	0,060	0,062	0,063	0,061±0,002
a0b0c1	0,067	0,068	0,069	0,068±0,001
a0b0c2	0,079	0,080	0,079	0,079±0,001
a0b0c3	0,100	0,101	0,101	0,101±0,001
a0b1c0	0,092	0,092	0,092	0,092±0,000
a0b1c1	0,094	0,094	0,095	0,095±0,001
a0b1c2	0,097	0,097	0,098	0,097±0,001
a0b1c3	0,100	0,100	0,100	0,100±0,000
a1b0c0	0,021	0,022	0,022	0,021±0,001
a1b0c1	0,022	0,023	0,023	0,023±0,000
a1b0c2	0,028	0,029	0,029	0,029±0,001
a1b0c3	0,035	0,035	0,035	0,035±0,000
a1b1c0	0,014	0,015	0,014	0,014±0,000
a1b1c1	0,026	0,027	0,027	0,027±0,001
a1b1c2	0,031	0,031	0,031	0,031±0,000
a1b1c3	0,045	0,045	0,044	0,045±0,001

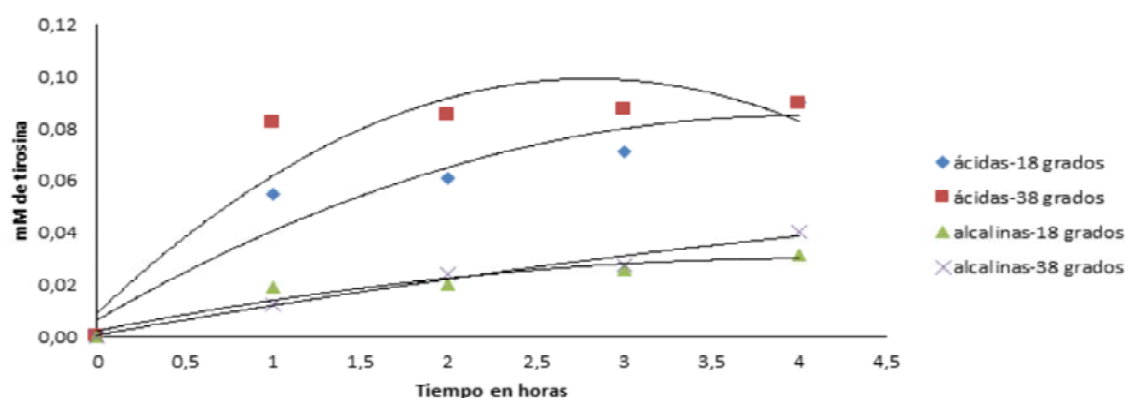


Gráfico 3. Cinética de hidrólisis del suero con los diferentes tratamientos.

tirosina es el a0b0c3 (ácidas, 18°C y 4 horas) el cual generó 0,090 mM de tirosina, y produjo un porcentaje de hidrólisis de enlaces peptídicos de 9,3%.

#### **Empleo del suero hidrolizado en plantas de rábano**

Para el empleo del suero lácteo hidrolizado se realizó una dilución al 10% en agua potable, el modo de empleo fue cada semana iniciando una semana después de haber sido sembrados, se utilizó dos sistemas de aplicación, foliar (hojas), y radicular (raíces).

En las plantas de rábanos se registró que el empleo del hidrolizado controló de mejor manera la humedad de la tierra, así también se observó que el hidrolizado del suero aportó nutrientes (péptidos y aminoácidos) que fueron asimilados por las plantas, prueba de esto es el aumento en el tamaño del follaje y de los rábanos (Fig. 1) como demuestra el incremento en el peso promedio de cada planta varió en un 22,53%.

#### **CONCLUSIONES**

Se determinó que existe mayor concentración de proteínas en el extracto de los intestinos con  $1,446 \pm 0,02$  mg/ml con relación al de los estómagos cuya concentración es de  $1,213 \pm 0,04$  mg/ml, ambas concentraciones expresadas como mg de BSA /ml. Se determinó también la actividad proteásica por el método de Anson utilizando hemoglobina parcialmente desnaturalizada como sustrato. Los valores de actividad fueron de  $4,70E-04$  y  $6,92E-05$  UE (milimoles de tirosina desprendidas por la hidrólisis/min-ml de extracto) para las enzimas extraídas utilizando los estómagos y los intestinos, respectivamente.

Se comprobó que los factores de interacción origen de las proteasas, temperatura y tiempo de reacción influyen significativamente en la actividad proteolítica de las proteasas sobre el suero lácteo, analizados al 95 % del nivel de confianza. Con la prueba Tukey se determinó que el mejor tratamiento para la hidrólisis del suero

lácteo fue el a0b0c3, el cual generó 0,090 mM de tirosina liberadas por la hidrólisis, con el que se logró 9,3% de enlaces peptídicos hidrolizados, porcentaje suficiente para que la aplicación del mismo aporte con nutrientes que pueden ser asimilados por las plantas, prueba de esto es el aumento del tamaño del follaje y del rábano, lo cual muestra que el suero lácteo hidrolizado mejoró la calidad nutricional del sustrato de las plantas.

#### **REFERENCIAS**

- Acuña, O., Simbaña, C. (2008). Estudio de las propiedades físicas y funcionales de un hidrolizado enzimático de proteína de chocho a escala piloto y su aplicación como fertilizante. *Revista Politécnica*. 2008. Vol 1. Páginas 78-96, 81.
- Anson, M. L. (1938). The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. *The journal of General Physiology*. Páginas 79-86.
- Cordero, P., Verdugo, L. (2006). *Apuntes de Bioquímica Humana*. Disponible en: [http://books.google.com.ec/books?id=NSK3IRRoaboC&printsec=frontcover&hl=es&source=gs\\_bse\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](http://books.google.com.ec/books?id=NSK3IRRoaboC&printsec=frontcover&hl=es&source=gs_bse_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false).
- Chang, S. K. C. *Protein Analysis in Food Analysis*. S. Nielsen (ed). 3rd Edition. Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York, 2003. Páginas 131-142.
- Fernández, P. (2008). *Enzimas utilizadas en la industria alimentaria*. Disponible en: <http://www.rincondelasciencias.com/enzimas%20en%20industria%20alimentaria.pdf>
- Guardix, A., Guardix, E., Páez-Dueñas, M., González-Tello, P., Camacho, F. (2000). Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. *Artículos Pharmaceutica*. 41:1; 79-89. Disponible en: <http://digibug.ugr.es/bitstream/10481/25136/1/21597224.pdf>.
- Moyano, F., Díaz, F., Alarcón, M. (1996). Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead seabream. *Fish Physiology and Biochemistry*. Páginas 121-130.
- Valencia, E., Ramírez, M. (2009). La industria de la leche y la contaminación del agua. *Revista Elementos* No. 73 Vol. 16. Disponible en: <http://www.elementos.buap.mx/num73/htm/27.htm>.
- Whitaker, J. (1994). *Principles of enzymology for the food sciences*. 2nd. ed. New York. Marcel Dekker.

**UTILIZACIÓN DE ENZIMAS AMILASAS (Fungamyl) EN LA FERMENTACIÓN ÁCIDO-LÁCTICA DE UNA COLADA DE MOROCHO (*Zea mays, variedad Morochon*) CON MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS (Cultivo lácteo SLB 953: *Lactobacillus bulgaricus*, (*Streptococcus thermophilus*) y *Lactobacillus casei*.**

**USE OF ENZYMES AMYLASES (Fungamyl) IN THE FERMENTATION LACTIC ACID OF WASH WHITE CORN (*Zea mays, Morochon variety*) WITH PROBIOTIC MICROORGANISMS (SLB 953 milk culture: *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*) and *Lactobacillus casei*.**

Dario Israel Ojeda Sánchez, Gladys Cecilia Navas Miño

Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos. Av. Los Chasquis y Río Payamino, Campus Académico Huachi. Tel: 2400987 / 2400989.

ojeda.dario.i@gmail.com – glacenam@hotmail.com

AMBATO-ECUADOR

**RESUMEN**

En el trabajo de investigación se comparó el efecto de la utilización de enzimas amilasas (Fungamyl) en la fermentación ácido láctica de una colada de morocho con microorganismos probióticos (Cultivo lácteo SLB 953 y *Lactobacillus casei*). Se estableció que un 0,05% de enzima (Fungamyl) incrementó la viscosidad aparente y el índice de consistencia, mientras que en características sensoriales (color, aroma sabor y aceptabilidad) un 0,03% de enzima permitió obtener la mayor aceptabilidad. El tipo de microorganismos probióticos utilizados, también repercutió en las características reológicas, además de influir en la presentación y las características tanto sensoriales como microbiológicas. El tiempo de vida útil de la bebida fermentada almacenada a temperatura de 4 °C fue de 7 días para los tratamientos a0b1c2 (0,03% de enzima, 7% leche en polvo y cultivo lácteo SBL 593- Lb. Casei) y a0b1c0 (0,03% de enzima, 7% leche en polvo y cultivo lácteo SBL 593). Sin embargo, para los tratamientos a1b0c2 (0,03% de enzima, 7% leche en polvo y cultivo lácteo SBL 593) y a1b1c1 (0,05% de enzima, 7% leche en polvo y Lb. Casei) el tiempo estimado de vida útil fue de 5 días. El trabajo realizado proporciona información sobre el bioproceso en la elaboración de esta bebida fermentada utilizando la enzima (Fungamyl) y microorganismos probióticos de importancia por sus beneficios conocidos.

Palabras clave: enzima, fermentación ácido láctica, probióticos, morocho.

**SUMMARY**

In the research compared the effect of the use of amylase enzymes (Fungamyl) in the lactic acid fermentation in a wash white corn with probiotic microorganisms (milk culture SLB 953 and *Lactobacillus casei*). It was determined that 0.05% enzyme (Fungamyl) increased the apparent viscosity and the consistency index, while in organoleptic characteristics (color, aroma, flavor and acceptability) 0.03% enzyme allowed greater acceptability. The type of probiotic microorganisms used, also had repercussions on the rheological, in addition to influencing the presentation characteristics and both sensory and microbiological characteristics. The lifetime of the fermented drink stored at 4°C was 7 days for treatments a0b1c2 (0.03% enzyme, 7% milk powder and milk culture SBL 593 - Lb. Casei) and a0b1c0 (0.03% enzyme, 7% milk powder and milk culture SBL 593). Nevertheless, for treatments a1b0c2 (0.03% enzyme, 7% milk powder and milk culture SBL 593) and a1b1c1 (0.05% enzyme, 7% milk powder and Lb. Casei) estimated useful time life was 5 days. The work provides information on the BioProcess in the preparation of this fermented beverage using enzyme (Fungamyl) and probiotic microorganisms of importance for their known benefits.

Key words: enzyme, lactic acid fermentation, probiotics, white corn.

## INTRODUCCIÓN

El maíz, (*Zea mays* L.), es uno de los granos alimenticios más antiguos que se conocen. Pertenece a la familia de las Poáceas (Gramíneas), tribu Maydeas, y es la única especie cultivada de este género. Otras especies del género *Zea*, comúnmente llamadas teosinte y las especies del género *Tripsacum* conocidas como arrocillo o maicillo son formas salvajes parientes de *Zea mays*. Son clasificadas como del Nuevo Mundo porque su centro de origen está en América (Ripusudan, 2001). El grano de maíz, sobre todo el blanco, es un cereal importante para el consumo humano, especialmente en África y América Latina. Es evidente que la demanda de este maíz continuará aumentando en el futuro. La Organización de Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) estima que serán necesarias 60 millones de toneladas adicionales en el año 2030 (citado por Ripusudan, 2001).

La mayor parte del maíz blanco se consume directamente como alimento y pequeñas cantidades se destinan a otros usos. El maíz blanco se come en diversas formas, que varían de una región a otra y en una misma región. En África generalmente se hierven o cuecen las comidas preparadas con maíz, mientras que en América se las hornea o fríe (FAO, 1997).

Según García et al., (2010), las alfa-amilasas son hidrolasas que tienen la función de degradar complejos de carbohidratos, son una familia de enzimas que rompen el almidón (polisacárido), primero en cadenas cortas y luego en glucosa libre, su origen es fúngico (*Aspergillus oryzae*), bacteriano (*B. stearothermophilus*, *B. subtilis*), de cereales y del páncreas.

Probiotic (2009), indica que *Lactobacillus casei* es una bacteria beneficiosa que se encuentra naturalmente en la boca y los intestinos de los seres humanos; produce ácido láctico que ayuda a reducir los niveles de pH en el sistema digestivo e impide el crecimiento de bacterias dañinas. *Lactobacillus casei* se pueden encontrar en “productos lácteos crudos o fermentados y en vegetales frescos o fermentados”.

Spreer (1991), clasificó a los microorganismos *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* como especies bacterianas termófilas. Con respecto a las temperaturas óptimas de crecimiento, éstas oscilan entre 37 a 42°C para *S. thermophilus* y 42-45°C para *L. bulgaricus*. Además, vale la pena destacar que en la simbiosis existente entre estos dos microorganismos, el *S. thermophilus* es quien inicia la fermentación láctica y la que desarrolla muy intensamente hasta un pH de 5.5. La acidez, el consumo de oxígeno y la liberación de sustancias volátiles, por ejemplo ácido fórmico, que produce y crea las condiciones ideales para que se desarrolle el *L. bulgaricus*.

La fermentación del ácido láctico, aumenta la solubilidad de proteínas y la disponibilidad de aminoácidos limitantes en algunos casos por tanto como 50%. El impacto nutricional de los alimentos fermentados en las enfermedades nutricionales puede ser directo o indirecto. Fermentaciones de alimentos que aumentan el contenido de proteína o mejorar el equilibrio de aminoácidos esenciales o su disponibilidad tendrá un efecto curativo directo. Del mismo modo fermentaciones que aumentan el contenido o la disponibilidad de vitaminas como la tiamina, la riboflavina, la niacina o el ácido fólico puede tener profundos efectos directos sobre la salud de los consumidores de estos alimentos (Steinkraus, 1997).

Entre los alimentos funcionales se encuentran los probióticos, que son microorganismos vivos añadidos a un alimento que ejercen un efecto beneficioso sobre la salud humana. Los efectos más destacables se pueden resumir en: a) la mejora de la respuesta inmunitaria; b) el mantenimiento de la microbiota del colon; c) el tratamiento de la diarrea del viajero y la secundaria a la terapia antibiótica; d) el control de los rotavirus y de la colitis inducida por *Clostridium difficile*; y e) la prevención de las úlceras relacionadas con *Helicobacter pylori*. Otros aspectos más controvertidos incluyen la reducción de la absorción del colesterol, la prevención de las caries, y la prevención y el tratamiento de las infecciones del tracto urinario (Alvarez y Oberhelman, 2001). El objetivo de este trabajo es emplear enzimas amilasas (*Fungamyl*) y microorganismos probióticos (*Cultivo lácteo SLB 953: Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*) y *Lactobacillus casei* en la fermentación ácido-láctica de una colada de morocho (*Zea mays*, variedad *Morocho*).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Materia prima

El morocho (*Zea mays*, variedad *Morocho*), se adquirió en el mercado mayorista de la ciudad de Ambato. Las enzimas amilasas se adquirieron de la empresa Quifatex S.A. – de Quito. El cultivo SLB 953 fue adquirido en el almacén Todo para la Industria Láctea en la ciudad de Ambato y *Lactobacillus casei* se adquirió en la Farmacia Cruz Azul de la ciudad de Ambato.

### Diseño experimental

Se aplicó un diseño experimental completamente aleatorio con arreglo factorial, A×B×C con dos replicas, determinándose un número de doce tratamientos más un control o testigo, este diseño experimental.

### Factor A: Porcentaje de enzima.

$$a_0=0,03\% \text{ y } a_1=0,05\%$$

### Factor B: Porcentaje de leche en polvo.

$$a_0=3\% \text{ y } b_1=7\%$$

Factor C: Tipo de microorganismos probióticos.

c0= Cultivo lácteo SLB 953, c1= Lb. Casei y c2= Cultivo lácteo SLB 953-Lb. Casei.

### **Análisis pH y acidez durante el proceso de fermentación.**

Se realizó mediciones de pH y acidez cada 30 minutos durante el proceso de fermentación para cada tratamiento. Este parámetro permite controlar el proceso de fermentación debido a que los microorganismos sólo pueden crecer en un rango estrecho de pH y acidez.

### **Análisis reológicos**

Se obtuvieron valores de porcentaje de escala total (%FS) de los diferentes tratamientos con el viscosímetro rotacional Brookfield LVTD con el rotor LV3, a 4°C+2.

Se determinaron propiedades reológicas a través del modelo propuesto por Ostwald de Waele o más conocido ampliamente como la Ley de la Potencia, Ecuación 1.

$$T = K (\dot{\gamma})^n \quad (1)$$

Y la Ecuación 2 propuesta por Alvarado (1996).

$$\log \mu_r = (n-1) \log \mu_r (4\pi N) + \log K \quad (2)$$

### **Evaluación sensorial**

Los atributos sensoriales: color, aroma, sabor, viscosidad y aceptabilidad, fueron evaluados por 26 jueces semientrenados, cada catador analizó tres muestras al azar, de forma que existieron seis réplicas para cada tratamiento, se utilizó una escala hedónica estructurada de 5 puntos: 1 desagrada mucho; 5 agrada mucho.

Los datos fueron analizados por el programa estadístico Statgraphics Centurion.

### **Análisis microbiológico**

Se determinó para los 4 mejores tratamientos mediante el recuento de aerobios mesófilos, mohos y levaduras, estas pruebas se realizaron al haber concluido con la elaboración de la bebida fermentada, que fue almacenada a temperatura de 4+2°C.

Para el cálculo de vida útil, se ejecutó recuento de mohos y levaduras a 4+2°C, dichos análisis se determinó hasta llegar a los niveles permitidos de la Norma (INEN: 2395) de leches fermentadas.

### **Análisis proximal**

Se utilizaron métodos A.O.A.C.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Análisis pH y acidez durante el proceso de fermentación.**

El pH se relaciona de forma inversamente proporcional al tiempo de fermentación, es decir que decrece a medida que el proceso fermentativo avanza. En los tratamientos descendió aproximadamente de 6,67 hasta 4,37 aproximadamente, mostrándose así que las bacterias influyeron en el descenso del pH debido al proceso de fermentación.

La acidez se tomó como parámetro fijo de proceso, haciendo que todos los tratamientos lleguen a un rango entre 48°D a 53°D., este parámetro fue basado en el análisis del proceso fermentación, los microorganismos probióticos (Cultivo lácteo SLB 953 y Lb. Casei) desarrollan acidez mediante la producción de ácido láctico generado a partir de lactosa y este a su vez del porcentaje de leche que lleva la formulación, por lo que el tiempo de fermentación no es igual para todos los tratamientos.

### **Análisis reológicos**

#### **Viscosidad aparente**

Los valores presentados en la Tabla 1 son de viscosidad aparente; se observó que decrece cuando aumenta la gradiente de velocidad de deformación, comprobando así su comportamiento no-Newtoniano. Se observó que los resultados de viscosidad aparente más significativos son los tratamientos a1b1c2 (0,05% de enzima, 7% de leche en polvo y cultivo lácteo SLB 953-Lb casei) con 22,2 Pa×s y a1b1c0 (0,05% de enzima, 7% de leche en polvo y cultivo lácteo SLB 953) con 24,0 Pa×s que presentan valores altos.

Según Espitia (2009), las  $\alpha$ -amilasas son enzimas licuantes, debido a su rápida acción para disminuir la viscosidad de las soluciones de almidón; reduce la viscosidad, pues rompe los enlaces alfa 1-4 al azar y forma cadenas de glucosa de distintos tamaños.

La viscosidad aparente Figura 1 decrece cuando aumenta el gradiente de velocidad de deformación, esto permite confirmar el que el comportamiento de la bebida fermentada fue no-Newtoniano tipo pseudoplástico; este comportamiento indica una reorganización continua de la estructura molecular, dando como resultado una menor resistencia al flujo, debido al rompimiento de sustancia de alto peso molecular como el almidón de maíz y la leche en polvo.

Se observa en la Tabla 2 y Tabla 3 que este tipo de bebida fermentada es un fluido no-newtoniano, se puede decir que sigue un comportamiento pseudoplástico. El comportamiento del fluido se comprueba con el índice de comportamiento de flujo n (adimensional) que es menor a 1.

#### **Índice de consistencia (K)**

Aplicando la Ley de la Potencia como se puede observar en la Tabla 2 y en su gráfico demostrativo Figura 2,

se observó que en los tratamientos: a1b1c2 (0,05% de enzima, 7% leche en polvo y cultivo lácteo SLB 953-Lb casei) con 3957 mPa×sn y para el tratamiento a1b1c0 (0,05% de enzima, 7% leche en polvo y cultivo lácteo SLB 953) con valores 3313 mPa×sn, que presentan valores altos.

Según la ecuación propuesta por Alvarado, 1996, como se puede observar en la Tabla 3 y en su gráfico demostrativo Figura 3, se observó que en los tratamientos: a1b1c2 (0,05% de enzima, 7% leche en polvo y cultivo lácteo SLB 953-Lb casei) con 3888 mPa×sn y para el tratamiento a1b1c0 (0,05% de enzima, 7% leche en polvo y cultivo lácteo SLB 953) con 3225 mPa×sn.

Tabla 1. Valores promedio viscosidad aparente  $\mu_r$  [Pa×s] de la colada fermentada de morocho

Velocidad de deformación (1/s)	0,06	0,13	0,31	0,63	1,26	2,51	6,28	12,57
T1:a0b0c0	2,80	2,50	1,76	1,16	0,80	0,53	0,29	0,21
T2:a0b0c1	5,60	3,70	2,12	1,44	0,87	0,54	0,30	0,21
T3:a0b0c2	3,80	3,10	2,12	1,34	0,87	0,56	0,32	0,22
T4:a0b1c0	11,60	8,00	5,52	3,48	2,17	1,32	0,69	0,45
T5:a0b1c1	9,60	7,30	4,48	2,90	1,78	1,08	0,55	0,37
T6:a0b1c2	12,60	8,50	4,72	2,94	1,87	1,20	0,65	0,43
T7:a1b0c0	8,20	6,30	3,80	2,38	1,46	0,88	0,45	0,30
T8:a1b0c1	10,20	7,10	4,16	2,72	1,64	0,98	0,51	0,37
T9:a1b0c2	9,80	7,40	4,32	2,66	1,67	1,02	0,56	0,41
T10:a1b1c0	24,00	13,80	7,60	4,74	2,86	1,62	0,82	0,53
T11:a1b1c1	14,40	10,70	6,16	3,84	2,29	1,35	0,68	0,46
T12:a1b1c2	22,20	13,80	8,20	5,40	3,33	2,02	1,04	0,69
T13:Testigo	2,80	2,10	1,20	0,74	0,46	0,28	0,16	0,13

Porcentaje de enzima a0:0,03%

a1:0,05%

Porcentaje de leche en polvo b0:3%

b1:7%

Tipo de microorganismos probióticos

c0: Cultivo lácteo SLB 953

c1: Lb. Casei

c2: Cultivo lácteo SLB 953-Lb. Casei

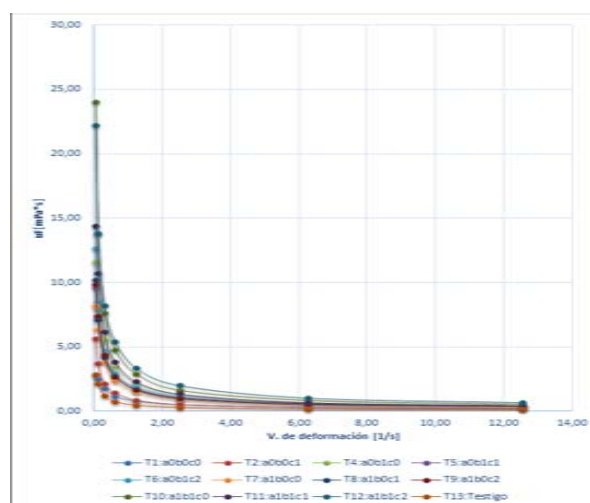


Figura 1. Relación entre el velocidad de deformación y viscosidad aparente  $\mu_r$  [Pa×s].

### Índice de comportamiento de flujo (n)

Paredes (2002), reportó valores del índice de consistencia de 3693 mPa×sn para una bebida de avena tipo yogurt considerando que la avena sin germinar es rica en hidratos de carbono, especialmente almidón, que combinada con leche contribuye a la viscosidad y consistencia de la bebida tipo yogurt, por tanto al comparar con los valores de índice de consistencia obtenidos 3957 mPa×sn y 3888 mPa×sn son adecuados para tomarlos como control en la elaboración de la bebida fermentada.

Tabla 2. Valores de índice de comportamiento de flujo (n) e índice de consistencia (K) [mPa×s] de la colada fermentada de morocho.

Tratamientos	n		K [mPa×s]		R2	
	R1	R2	R1	R2	R1	R2
T1:a0b0c0	0,47	0,50	847	840	0,990	0,969
T2:a0b0c1	0,32	0,43	1178	858	0,993	0,998
T3:a0b0c2	0,44	0,44	953	984	0,981	0,989
T4:a0b1c0	0,38	0,37	2388	2363	0,979	0,983
T5:a0b1c1	0,39	0,35	1860	2070	0,968	0,990
T6:a0b1c2	0,38	0,33	2028	2400	0,994	0,998
T7:a1b0c0	0,35	0,35	1558	1701	0,973	0,985
T8:a1b0c1	0,36	0,35	1862	1899	0,985	0,986
T9:a1b0c2	0,35	0,39	1984	1905	0,996	0,981
T10:a1b1c0	0,27	0,28	3278	3313	0,995	0,993
T11:a1b1c1	0,34	0,31	2596	2615	0,977	0,985
T12:a1b1c2	0,35	0,33	3567	3957	0,994	0,994
T13:Testigo	0,36	0,42	646	455	0,970	0,986

Tabla 3. Valores de índice de comportamiento de flujo (n) e índice de consistencia (K) [mPa×s] de la colada fermentada de morocho

Tratamientos	n		K [mPa×s]		R2	
	R1	R2	R1	R2	R1	R2
T1:a0b0c0	0,47	0,5	832	825	0,992	0,97
T2:a0b0c1	0,32	0,43	1157	843	0,998	0,999
T3:a0b0c2	0,44	0,44	936	966	0,989	0,993
T4:a0b1c0	0,38	0,37	2346	2322	0,992	0,994
T5:a0b1c1	0,39	0,35	1827	2034	0,987	0,997
T6:a0b1c2	0,38	0,33	1992	2358	0,998	1,000
T7:a1b0c0	0,35	0,35	1531	1671	0,992	0,995
T8:a1b0c1	0,36	0,35	1829	1865	0,995	0,996
T9:a1b0c2	0,35	0,39	1949	1872	0,999	0,992
T10:a1b1c0	0,27	0,28	3220	3255	0,999	0,999
T11:a1b1c1	0,34	0,31	2550	2569	0,994	0,997
T12:a1b1c2	0,35	0,33	3504	3888	0,998	0,998
T13:Testigo	0,36	0,42	635	447	0,991	0,993

Porcentaje de enzima a0:0,03, a1:0,05%

Porcentaje de leche en polvo b0:3%, b1:7%

Tipo de microorganismos probióticos

c0: Cultivo lácteo SLB 953

c1: Lb. Casei

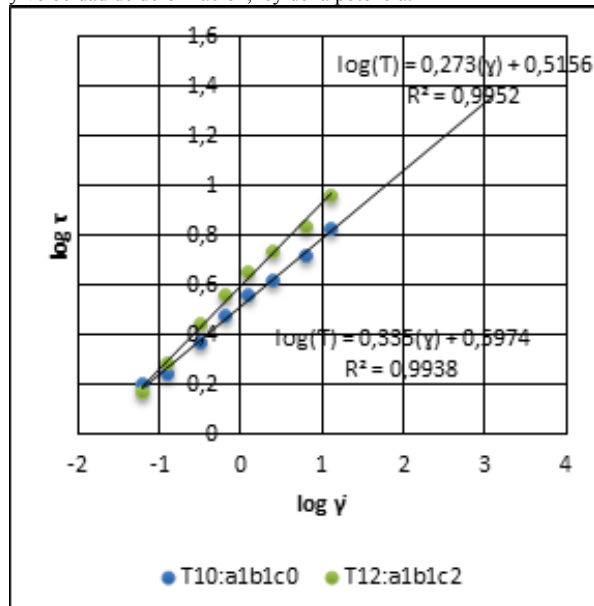
c2: Cultivo lácteo SLB 953-Lb.

R2: Coeficiente de correlación

R1: Replicha 1

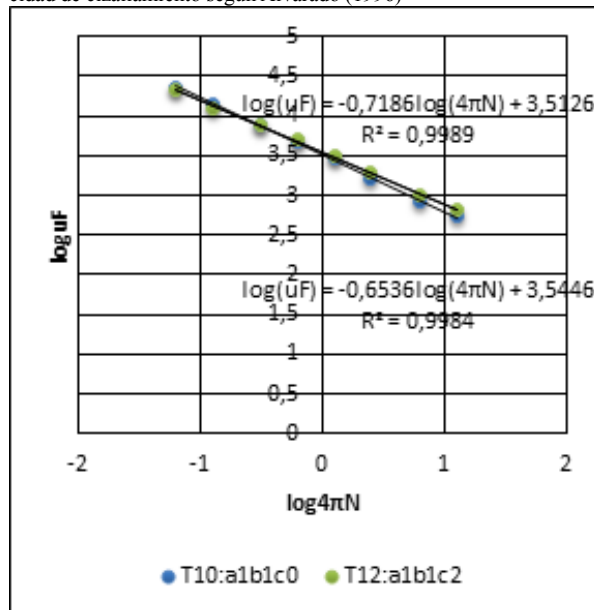
R2: Replicha 2

Figura 2. Relación entre los logaritmos del esfuerzo de cizallamiento y velocidad de deformación, ley de la potencia.



Porcentaje de enzima a0:0,03%, a1:0,05%  
 Porcentaje de leche en polvo b0:3%, b1:7%  
 Tipo de microorganismos probióticos

Figura 3. Relación entre los logaritmos de viscosidad aparente y velocidad de cizallamiento según Alvarado (1996)



c0: Cultivo lácteo SLB 953  
 c1: Lb. Casei  
 c2: Cultivo lácteo SLB 953-Lb. Casei

Los valores de índice de comportamiento de flujo indican cómo se interrelacionan los compuestos en la bebida.

Por lo tanto se observó que al utilizar el porcentaje más alto de enzima y de leche, el índice de consistencia tiende a una relación directa, si la concentración de enzima y de leche se incrementa el índice de consistencia

también se incrementa, en diferente proporción en cada tratamiento.

### Evaluación sensorial

El ensayo se realizó con dos réplicas, fue aplicado con la participación de los estudiantes que cursan los últimos semestres de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, de la Universidad Técnica de Ambato.

Mediante el análisis estadístico de la evaluación sensorial de la bebida fermentada se estableció que el mejor tratamiento es a0b1c2 (0,03% de enzima, 7% de leche en polvo y cultivo lácteo SBL 593- Lb. Casei), por tener mayor valoración por los catadores en los atributos de color, sabor y aceptabilidad. El tratamiento a1b0c2 (0,05% de enzima, 3% leche en polvo y cultivo lácteo SBL 593- Lb. Casei), es el segundo mejor tratamiento por su valoración en aceptabilidad, viscosidad y 3ro en sabor. El tratamiento a0b1c0 (0,03% de enzima, 7% leche en polvo y cultivo lácteo SBL 593), es el tercer mejor tratamiento por ser segundo con mayor valoración en color, sabor y tercero en aroma, viscosidad y aceptabilidad. Como cuarto mejor tratamiento a1b1c1 (0,05% de enzima, 7% leche en polvo y Lb. Casei), por tener mayor valoración en aroma, tercero en color y cuarta en sabor y aceptabilidad.

### Vida útil.

La evaluación de la calidad microbiológica de los 4 mejores tratamientos obtenidos a partir del análisis sensorial permitió estimar el tiempo de vida útil a 4+2°C en ausencia de conservantes Tabla 4. Para los tratamientos a0b1c2 (0,03% de enzima, 7% leche en polvo y cultivo lácteo SBL 593- Lb. Casei) y a0b1c0 (0,03% de enzima, 7% leche en polvo y cultivo lácteo SBL 593) el tiempo estimado de vida útil fue de 7 días; mientras que para los tratamientos a1b0c2 (0,03% de enzima, 7% leche en polvo y cultivo lácteo SBL 593) y a1b1c1 (0,05% de enzima, 7% leche en polvo y Lb. Casei) el tiempo estimado de vida útil es de 5 días.

Tabla 4. Cálculo de tiempo de vida útil.  
 Ecuación de primer orden  $\ln C = kt + \ln C_0$

Tratamientos	Ecuación de regresión	Vida Útil (Días)
T4:a0b1c0	$y = 0,0346x - 0,1396$	7
T6:a0b1c2	$y = 0,0389x - 0,3113$	7
T9:a1b0c2	$y = 0,0473x - 0,8570$	5
T11:a1b1c1	$y = 0,0556x - 0,7577$	5

Tipo de microorganismos probióticos  
 c0: Cultivo lácteo SLB 953  
 c1: Lb. Casei  
 c2: Cultivo lácteo SLB 953-Lb. Casei

La bebida fermentada a base de morocho en su mejor tratamiento (a0b1c2: 0,03% de enzima, 7% leche en polvo y cultivo lácteo SBL 593- Lb. Casei) contiene



29,10% de sólidos totales, 2,16% de proteína, 0,72% de cenizas, 2,52% de grasa y 23,7% de carbohidratos totales, notándose que los carbohidratos y grasa suministran energía al cuerpo, especialmente al cerebro y al sistema nervioso, aportando 131 kcal siendo una bebida óptima para la ingesta diaria.

#### CONCLUSIONES

El porcentaje más alto de enzima amilasa (Fungamyl) (0,05%) influyó en las características reológicas de la colada de morocho fermentada. La viscosidad aparente y el índice de consistencia tienden a incrementarse al aumentar el porcentaje de enzima debido a que la enzima contribuye al desdoblamiento del almidón en azúcares de menor peso molecular que son utilizados por los microorganismos para la generación de ácido láctico; este aumento de la acidez contribuye a la formación del gel característico de una bebida fermentada aumentando su viscosidad. En cuanto a las características sensoriales (color, aroma sabor y aceptabilidad) el efecto fue contrario, se observó mayor aceptabilidad utilizando 0,03% de enzima.

Los microorganismos probióticos (Cultivo lácteo SLB 953 y *Lactobacillus casei*) influyeron directamente en el tiempo de fermentación. Sin embargo, la combinación de microorganismos permite obtener mejores características a nivel fisicoquímico, reológico, sensorial y microbiológico.

#### BIBLIOGRAFÍA

Alvarado, J. de D. (1996). "Principios de Ingeniería Aplicados a Alimentos". Radio Comunicaciones. Quito-Ecuador. Pp. 73-84, 201-218.

Alvarez-Olmos, M.I., Oberhelman, R.A. 2001, Probiotic agents and infectious diseases: A modern perspective on a traditional therapy. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 1567-1576

A.O.A.C Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist: 16th Ed, Vol. II Cap.33, pág. 7.

Espitia, L. 2009. Determinación de la concentración de alfa y beta amilasas comerciales en la producción de etanol a partir de almidón de cebada empleando *Saccharomyces cerevisiae*. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Carrera de Microbiología Industrial. Bogotá-Colombia.

FAO. 1997. EL MAIZ BLANCO: un grano alimentario tradicional en los países en desarrollo. ISBN 92-5-303882-9, Roma, Italia. Fecha de consulta: 22/02/2013. Disponible: [www.fao.org](http://www.fao.org).

García, C. A., Arrázola, S., Durango, A. M. (2010). Producción de Ácido Láctico por vía Biotecnológica. *Rev. Vol II*. (1): 65.

Norma Técnica Ecuatoriana (INEN 2395). 2011. Leches Fermentadas. Quito- Ecuador

Paredes M., 2002. Obtención de una bebida tipo yogurt utilizando avena (*Avena sativa*) más leche entera de vaca con empleo de dos cepas liofilizadas de microorganismos. Tesis de grado de Ingeniería en Alimentos, UTA – FCIAL, Ambato – Ecuador.

PROBIOTIC.ORG. 2009. *Lactobacillus casei*. Fecha de consulta: 20/12/2013 Consultado en: <http://www.probiotic.org/lactobacillus-casei.htm>.

Ripusudan L. Paliwal, Gonzalo Granados, Honor Renée Lafitte, Alejandro D. Violic, Jean-Pierre Marathée. 2001. El Maíz en los trópicos: mejoramiento y producción. Colección FAO: Producción y protección vegetal N.-28. ISBN 9253044578. Roma. Pp 392.

Spreer, E. 1991. *Lactología industrial*. 2a ed. Zaragoza: Acribia, Pp. 432-434.

Steinkraus, K. H. 1997. Classification of fermented foods: worldwide review of household fermentation techniques. *Food Control*, 8: 311–31.

# APROVECHAMIENTO DE RESIDUOS SÓLIDOS DOMICILIARIOS EN LA OBTENCIÓN DE BOCASHI CON LA APLICACIÓN DE CENIZA VOLCÁNICA Y LA CONSTRUCCIÓN DE COMPOSTERAS DOMÉSTICAS

## TAKING ADVANTAGE OF DOMESTIC SOLID WASTE TO OBTAIN BOCASHI WITH APPLICATION OF VOLCANIC ASH AND CONSTRUCTION OF DOMESTIC COMPOST BINS

María Daniela Garcés, María Teresa Pacheco

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO.  
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS  
Campus Académico Huachi. Av. Los Chasquis y Río Payamino, Telf: 032400987  
e-mail: gemedani@gmail.com

### RESUMEN

En la presente investigación, se aplicó un método para la obtención del abono orgánico bocashi a partir de residuos sólidos domiciliarios con la construcción de composteras domésticas. Aplicando un diseño factorial AxB y un ANOVA con un 95% de confianza, se pudo determinar que la dosificación y el sistema de remoción-ventilación influyen significativamente sobre la cantidad de materia orgánica, el contenido de C, N y la relación C/N.

El mejor tratamiento en cuanto al contenido de materia orgánica, contenido de C y N fue el a1b1 (70% residuos materia orgánica + 0% ceniza volcánica + 30% suelo, sistema de remoción manual) y para la relación C/N fue el tratamiento a3b1 (40% residuos materia orgánica + 40% ceniza volcánica + 20% suelo, sistema de remoción manual) permitiendo alcanzar un valor de 7.406.

Palabras clave: Abono orgánico, bocashi, ceniza volcánica, composteras domésticas.

### SUMMARY

Organic fertilizer (bocashi) was obtained from household solid waste with the construction of domestic compost bins. Using a factorial design AxB and ANOVA with 95 % confidence, it was determined that the dosage and the removal-ventilation system significantly influence the amount of organic matter, the content of C, N, and C/N ratio. The best treatment on the content of organic matter, C and N content was a1b1 (70% waste organic matter + 0% volcanic ash + 30% soil, manual removal system) and considering the C/N ratio, the best treatment was a3b1 (40% organic matter waste + 40% volcanic ash + 20% soil, manual removal system) allowing to reach a value of 7,406 .

Keywords: Organic fertilizer, bocashi, volcanic ash, domestic composting.

### INTRODUCCIÓN

Los residuos sólidos urbanos se definen como el conjunto de componentes y/o etapas desde la generación de los residuos por parte de cada uno de los habitantes, su recolección (por contenedores, puerta a puerta), su transporte (para aquellas ciudades donde existen plantas de transferencia), los diferentes tratamientos (plantas de separación y acondicionamiento de reciclables) y la disposición final, (Armas, 2006).

La fabricación de abonos orgánicos a partir de basura orgánica parece ofrecer una alternativa atractiva a los vertederos para la descomposición de residuos sólidos

domésticos y agrícolas. Comparado con otros métodos de eliminación alternativos, la fabricación de abonos orgánicos tiene ventajas ambientales considerables (Atlas, 2002).

Los hongos presentes en los residuos sólidos domiciliarios se encuentran en menor número en relación con las bacterias y los actinomicetos, pero con mayor masa. Los actinomicetos son especialmente importantes en la formación del humus, y funcionan como antagonistas de muchas bacterias y hongos patógenos de las plantas, debido a que producen antibióticos (efectos biostáticos y biocidas); éstos benefician el crecimiento y la activi-

dad de algunos fijadores de nitrógeno como Azotobacter y de las micorrizas (Bejarano, 2005).

El compostaje de residuos orgánicos es un proceso de degradación química y biológica en el cual se controlan parámetros como temperatura, humedad y aireación para optimizarlo. Un posterior periodo de maduración lleva a la estabilización de la materia orgánica produciendo un producto final (el compost) capaz de incrementar la fertilidad del suelo a través de sustancias del tipo ácidos húmicos contenidas en ellos (Hernández et al., 1990; García et al., 1991).

La actividad volcánica histórica, particularmente durante el Cuaternario, ha dado origen a numerosos depósitos piroclásticos a partir de los cuales se han desarrollado los suelos de alto potencial productivo de gran parte de la región cordillerana, y sobre los cuales se ha establecido la vegetación actual (Cremona, 2013).

La ceniza volcánica presenta reacción medianamente ácida a neutra, levemente variable según el lugar de recolección, pero con baja capacidad buffer o de amortiguación de pH. Esto indica que, agregadas al suelo que en la región en general posee un pH cercano a la neutralidad y una buena capacidad de amortiguación, no se espera que produzcan efectos en la reacción del mismo (Cremona, 2013).

El carbono orgánico (CO) es un componente fundamental del suelo del cual dependen muchas de sus propiedades químicas, físicas y biológicas. Su contenido y propiedades están íntimamente relacionados con las características edafoclimáticas del sitio y afectan directa e indirectamente la estabilidad del sistema de producción, dado su rol como reservorio de nutrientes y en la estabilización de la estructura edáfica. Actualmente, el CO es considerado uno de los atributos más importantes para definir la "calidad del suelo" (Carter, 2002).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Materiales

Ceniza volcánica del sector de los Pájaros del Cantón Baños, residuos domésticos que contenían desperdicios de cocina (frutas, verduras), composteras domésticas de madera, microorganismos eficientes.

### Métodos

#### Construcción de composteras domésticas

Las composteras fueron elaboradas de acuerdo al modelo del proyecto de compostaje domiciliario del Instituto Nacional de Tecnología Industrial de la ciudad de Córdoba, donde se busca garantizar un compostaje eficiente (con adecuada humedad, temperatura y aireación). Las composteras fueron hechas de madera.

El modelo de compostera con aireación manual posee una manivela de metal para voltear de mejor manera los residuos sólidos domiciliarios y se genere más aireación para la descomposición adecuada de la materia

orgánica.

El modelo de compostera con aireación por tubos plástico de 30 cm de alto,  $\frac{3}{4}$  de pulg. de diámetro tipo flauta con agujeros de 6 mm de diámetro. Lo que permite que el aire ingrese dentro de la materia orgánica y se produzca una mejor aireación.

#### Recolección de la materia prima

Se realizó la recolección de los residuos sólidos domiciliarios, (material vegetal y barrido de las casas) se los corto en pedazos pequeños y se mezcló homogéneamente.

La ceniza volcánica se recolectó del sector Los Pájaros del Cantón Baños.

El suelo pobre se recogió en el Caserío San Vicente del Cantón Quero de la provincia de Tungurahua.

#### Elaboración de tratamientos en las composteras

Según los factores de la tabla N.1 se armaron los tratamientos, se colocaron los residuos sólidos domiciliarios, la ceniza volcánica y el suelo pobre en cada una de las composteras con sus respectivas replicas, cada compostera fue volteada y se añadió agua hasta obtener un 50 % de humedad, se colocó EM's (Microorganismos Eficientes) para acelerar el proceso de descomposición de los desechos orgánicos.

Tabla N.1 Factores para el diseño experimental.

Factor A = Dosificación	
a0	0% Residuos materia orgánica + 70% ceniza volcánica + 30% suelo
a1	70% Residuos materia orgánica + 0% ceniza volcánica + 30% suelo
a2	10% Residuos materia orgánica + 60% ceniza volcánica + 30% suelo
a3	40% Residuos materia orgánica + 40% ceniza volcánica + 20% suelo
a4	60% Residuos materia orgánica + 10% ceniza volcánica + 30% suelo
Factor B = Sistema de Remoción - Ventilación	
b0	Por tubo
b1	Manual

#### Parámetros de control

##### pH

Para determinar el pH de las muestras, se tomó 10 gramos de muestra y se colocó un vaso de plástico, a la muestra se le añadió 50 ml de agua destilada realizando una relación 1:5, se revolvió bien y se dejó que el suelo se sedimente completamente, aproximadamente unas 12 horas. La lectura del pH de los tratamientos se realizó a través del equipo pH-metro marca HANNA instruments HI 2221 calibration check pH/ORP Meter.

##### Temperatura

Se determinó la temperatura de las muestras con una termocupla marca Multi-Thermometer (-50 °C ± 300 °C) directamente en el sitio de muestreo, se sumergió la termocupla en la muestra y se esperó hasta que la lectura llegue a ser constante. Se repitió las determina-

ciones y lecturas tantas veces hasta obtener dos lecturas repetidas con el mismo resultado.

### Humedad

Se pesa una cápsula de porcelana, luego poner la balanza en cero (T). Se pesó entre 5 g y 10 g de muestra en una cápsula de porcelana. Se secó la muestra en la estufa secadora a 105 °C durante mínimo 12 horas.

Al cabo de las 12 horas se sacó las cápsulas, se colocó en el desecador para que se enfríen y después pesarlas.

### Caracterización y aplicación del mejor tratamiento

#### Determinación de carbono

Carbono orgánico total, Corg, en suelos se determinó fotométricamente después de la oxidación de la materia orgánica con potasio dicromato, según el método APHA, para lo cual se utilizó potasio dicromato (5 %), ácido sulfúrico (concentrado), bario cloruro (solución: 4 gr de BaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O y aforar a 1000 ml con agua destilada), glucosa estándar, equivalente a 5 % de carbono orgánico (se pesó 12.5 gr de glucosa seca y aforar a 100 ml con agua destilada).

Tabla N.2 Curva de calibración

#	Cantidad	Concentración
Blanco	0 µl	
Std 1	100 µl	0,5 %
Std 2	200 µl	1,0 %
Std 3	300 µl	1,5 %
Std 4	400 µl	2,0 %
Std 5	500 µl	2,5 %
Std 6	600 µl	3,0 %
Std 7	700 µl	3,5 %
Std 8	800 µl	4,0 %

Se colocó 1 gr de muestra en tubos de digestión y se añadió a todos los tubos (muestras y estándares):

- 10 ml de K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (5%)
- 5 ml de ácido sulfúrico concentrado

Se ubicó los tubos en un bloque de digestión y se calentaron a 150 °C durante media hora. Una vez frías las muestras y estándares, se aforaron a 50 ml con la solución de BaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, se agitaron bien y se dejaron en reposo por 12 horas. El día siguiente, se realizó la determinación fotométrica en la longitud de onda de  $\lambda = 586$  nm.

Las absorbancias de las muestras se midieron en un espectrofotómetro Termo Scientific 4001-000 Genesys 20.

### Determinación de nitrógeno

Las muestras fueron enviadas para su análisis al Laboratorio privado LABCESTTA donde fueron analizadas por método kjedahl.

### Determinación de materia orgánica

La determinación de materia orgánica se realizó según el Método APHA, por lo que se secaron de 5 a 10 gramos aproximadamente de muestra durante 12 horas a 105 °C en la estufa. Se pesaron de 3 a 5 gr de la muestra pre-secada y se colocó en una capsula de porcelana y se calcino en la mufla de 430 a 450 °C durante dos horas, después de haber llegado a la temperatura indicada, se dejaron enfriar las muestras en un desecador y se pesaron las muestras.

### Determinación de relación C/N

Los valores de carbono se dividieron a los valores de nitrógeno que contenía cada tratamiento.

### Prueba de germinación

Una vez terminado el proceso de descomposición se colocó en bandejas plásticas una cantidad de abono orgánico (bocashi), se sembraron 20 semillas de rábanos y se determinó el porcentaje de germinación de cada uno de los tratamientos después de 12 días.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Control del pH en base al tiempo en semanas durante el proceso de descomposición del abono orgánico.

El pH se tomó como un parámetro de control durante el proceso de descomposición del abono orgánico bocashi. El pH inicial de los tratamientos va de 6 a 8 pero en la semana 1 baja hasta 4 lo que indica que hay una liberación rápida de CO<sub>2</sub> y la descomposición de la materia orgánica más lábil generando ácidos orgánicos. En la segunda semana el pH va aumentando pero sigue manteniéndose ácido. En la tercera semana ocurrió un mayor aumento de pH hasta llegar a básico, ya que se produce una transformación de los ácidos orgánicos y hay generación de NH<sub>3</sub>. A partir de la 4 semana el pH comienza a disminuir y mantenerse en pH neutro ya que se comienzan a formar los compuestos húmicos que forman el abono orgánico. En la semana 5 y 6 el pH prácticamente no ha variado lo que es un indicativo que el abono orgánico ya está listo, esto se muestra en la figura N-1.

Control de la temperatura en base al tiempo en días durante el proceso de descomposición del abono orgánico. La temperatura de los tratamientos se tomó cada 3 días recogiéndose 16 temperaturas durante los 36 días que duro el proceso de elaboración del abono orgánico como se muestra en la figura N-2.

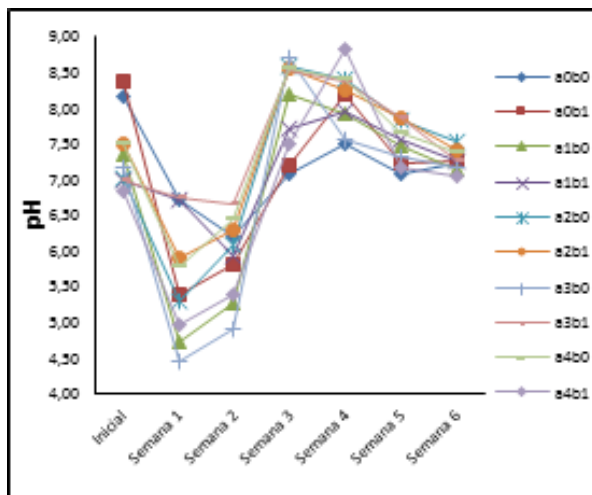


Figura N-1: Evolución del pH en relación al tiempo en semanas.

La temperatura inicial era de alrededor 20 °C pero a partir del día 5 hubo un incremento drástico de la temperatura ya que comienza haber mayor actividad microbiana y empieza a ocurrir una degradación de azúcares y aminoácidos, ya que las temperaturas altas favorecen la descomposición de la materia orgánica incrementándose esta hasta el día 12, la temperatura que alcanzaron los tratamientos fue hasta aproximadamente 55 °C. A partir del día 17 las temperaturas comienzan a disminuir, el volteo de cada tratamiento ayuda a que la temperatura disminuya y que haya oxigenación de la materia orgánica y haya un número alto de colonias microbianas. A partir del día 29 la temperatura comienza a estabilizarse lo que indica que el abono orgánico bocashi ya está listo, las temperaturas se estabilizaron a 22 °C aproximadamente.

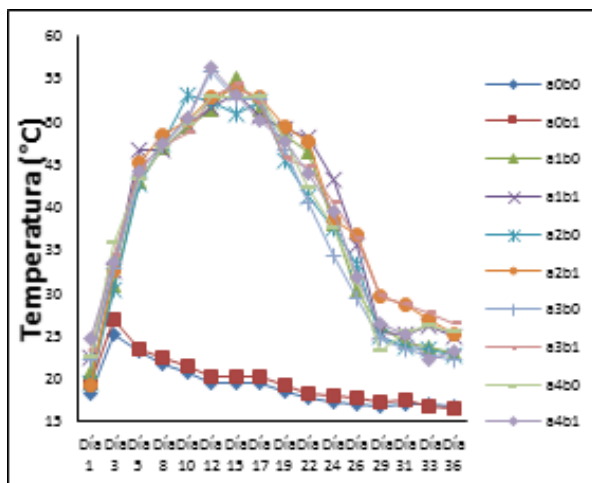


Figura N-2: Evolución de la temperatura en relación al tiempo en días.

Control de humedad en base al tiempo en semanas durante el proceso de descomposición del abono orgánico. En la figura N-3 se muestra los valores de humedad (%) tomados cada semana como control para que el proceso de compostaje se lleve a cabo adecuadamente ya que el agua disuelve compuestos que pueden incorporarse

fácilmente al interior celular. Si la humedad disminuye la actividad microbiana se detiene y el tiempo del proceso de compostaje aumenta. En la figura N-3 se puede observar que la humedad se mantiene dentro del rango óptimo por lo que el proceso de compostaje se llevó a cabo en 36 días. Los tratamientos que tuvieron una humedad baja fueron a0b0 y a0b1 debido a que las partículas de suelo por no poseer materia orgánica no pueden retener la humedad

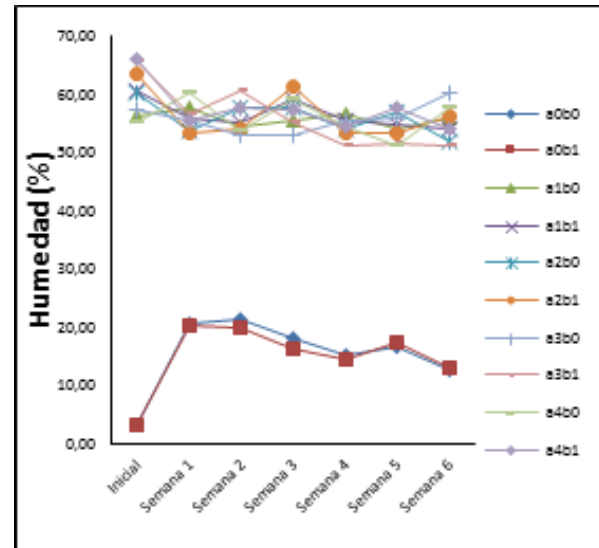


Figura N-3: Control de Humedad en relación al tiempo en semanas.

Control de materia orgánica en base al tiempo en semanas durante el proceso de descomposición del abono orgánico.

Conforme avanza el tiempo la cantidad de materia orgánica va disminuyendo ya que esta se va descomponiendo como se muestra en la figura N-4, lo que es un indicativo de que el bocashi se está produciendo correctamente a medida que varía la temperatura y el pH. Cuando el porcentaje de materia orgánica se va estabilizando es un indicativo de maduración del bocashi y que este está listo.

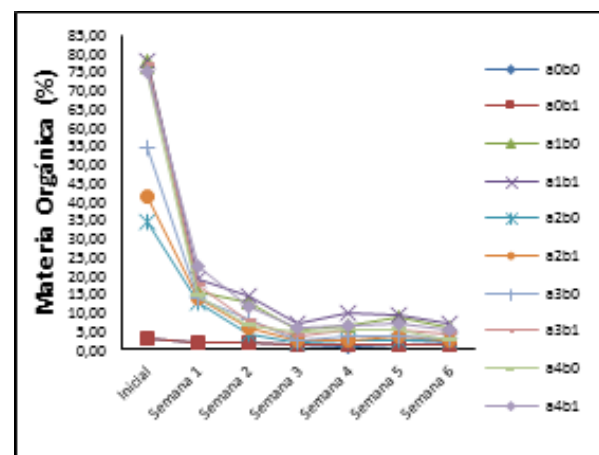


Figura A-4: Evolución de materia orgánica en relación al tiempo en semanas.

Control de carbono en base al tiempo en semanas durante el proceso de descomposición del abono orgánico. El porcentaje de carbono a medida que va llevándose a cabo el proceso de compostaje va disminuyendo como se muestra en la figura N-5 debido a que este se oxida por la acción del metabolismo microbiano para producir energía y CO<sub>2</sub>.

Por lo que se produce un descenso rápido de carbohidratos en la semana 3, en las semanas próximas el porcentaje de carbono va estabilizándose ya que compuestos resistentes como las ligninas son más difíciles de descomponer a productos más simples por lo que el proceso se vuelve lento hasta estabilizarse y mantener constante el porcentaje de carbono.

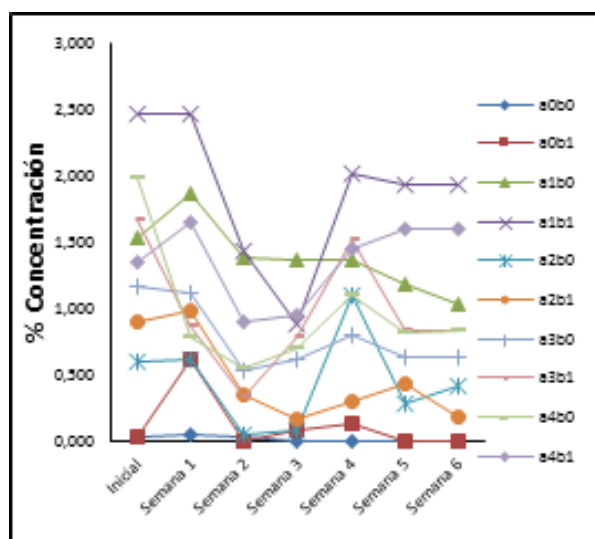


Figura N-5: Evolución de Carbono en relación al tiempo en semanas.

Variación del porcentaje nitrógeno al inicio y final del proceso de descomposición del abono orgánico.

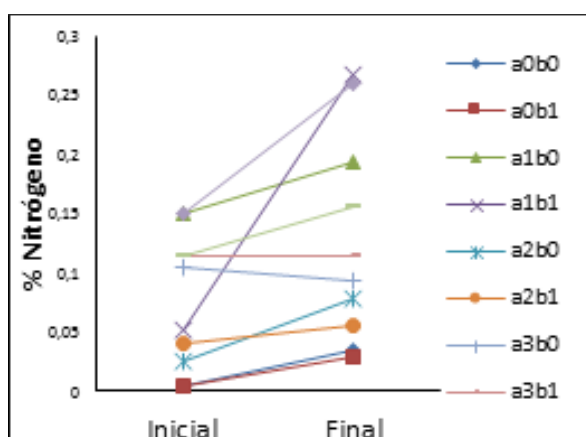


Figura A-6: Evolución de Nitrógeno al inicial y final del proceso.

En el proceso de compostaje el porcentaje de nitrógeno a diferencia del porcentaje carbono que disminuye va aumentando debido a que el nitrógeno se transforma en amoníaco sobre todo cuando se eleva la temperatura y el pH es bajo como se muestra en la figura A-6. El aumento de nitrógeno en los tratamientos al inicio y al

final no vario mucho a excepción del tratamiento a1b1 y el tratamiento a4b1 que tuvieron un incremento superior en comparación a los demás tratamientos.

Variación del porcentaje de relación C/N al inicio y final del proceso de descomposición del abono orgánico. La relación C/N, expresa las unidades de carbono por unidades de nitrógeno que contiene un material.

La relación C/N al inicio y al final disminuye considerablemente como se muestra en la figura N-7, esta relación con residuos sólidos domiciliarios por lo general es baja. Los microorganismos consumen generalmente: 30 átomos de carbono por 1 átomo de Nitrógeno por lo que la relación óptima debería ser mayor sin embargo en la elaboración del abono orgánico el tratamiento con la relación C/N más alta es a3b1 seguida del tratamiento a1b1 con una relación 7/1 aproximadamente.

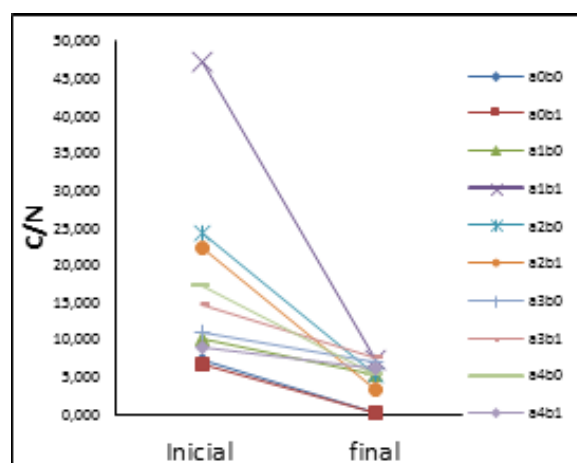


Figura A-7: Evolución de relación C/N al inicial y final del proceso.

### Contenido de materia orgánica.

Los resultados promedios luego del respectivo análisis estadístico, indican que los tratamientos con mayor contenido de materia orgánica son el tratamiento a1b1 (70% materia orgánica: 0% ceniza: 30% suelo, aireación manual) y el a4b1 (60% materia orgánica: 10% ceniza: 30% suelo, aireación manual).

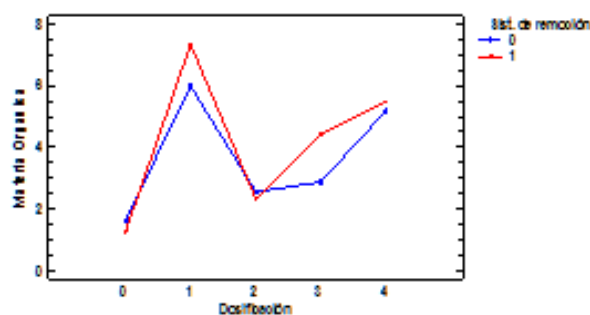


Figura N-8: Interacción e intervalos Tukey (HSD) al 95 % para la dosificación y sistema de remoción.

En la figura N-8 se reportan los resultados del análisis de varianza para los valores de contenido de mate-

ria orgánica, utilizando el 95 % de nivel de confianza; existe diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en los factores principales: A (dosificación) y B (sistema de remoción), al igual que en la interacción dosificación\*sistema de remoción.

### Contenido de carbono

Los resultados promedio luego del respectivo análisis estadístico, indican que los tratamientos con mayor contenido de carbono son el tratamiento a1b1 (70% materia orgánica: 0% ceniza: 30% suelo, aireación manual) y el a4b1 (60% materia orgánica: 10% ceniza: 30% suelo, aireación manual).

En la figura N-9 se muestran los resultados del análisis de varianza para los valores del contenido de carbono, utilizando el 95 % de nivel de confianza; existe diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en los factores principales: A (dosificación) y B (sistema de remoción), al igual que en la interacción dosificación\*sistema de remoción.

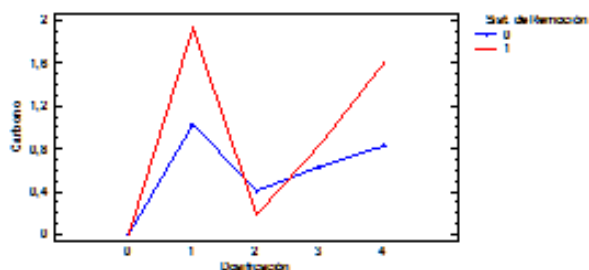


Figura N-9: Interacción e intervalos Tukey (HSD) al 95 % para la dosificación y sistema de remoción.

### Contenido de nitrógeno

Los resultados promedio luego del respectivo análisis estadístico, indican que los tratamientos con mayor contenido de nitrógeno son el tratamiento a1b1 (70% materia orgánica: 0% ceniza: 30% suelo, aireación manual) y el a4b1 (60% materia orgánica: 10% ceniza: 30% suelo, aireación manual).

En la figura N-10 se reportan los resultados del análisis de varianza para los valores del contenido de nitrógeno, utilizando el 95 % de nivel de confianza; existe diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en los factores principales: A (dosificación) y B (sistema de remoción), al igual que en la interacción dosificación\*sistema de remoción.

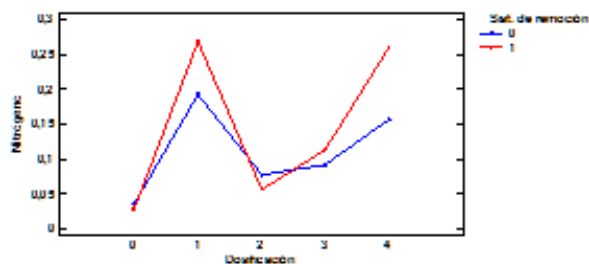


Figura N-10: Interacción e intervalos Tukey (HSD) al 95 % para la dosificación y sistema de remoción.

### Contenido de relación C/N

Los resultados promedio luego del respectivo análisis estadístico, indican que los tratamientos con mayor contenido de relación carbono/nitrógeno son el tratamiento a3b0 (40% materia orgánica: 40% ceniza: 20% suelo) con sistema de remoción por tubo y el a3b1 (40% materia orgánica: 40% ceniza: 20% suelo) con sistema de remoción manual.

En la figura N-11 se reportan los resultados del análisis de varianza para los valores del contenido de relación carbono/nitrógeno, utilizando el 95 % de nivel de confianza; existe diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en el factor principal: A (dosificación) pero no hay diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en el factor B (sistema de remoción) al igual que en la interacción dosificación\*sistema de remoción.

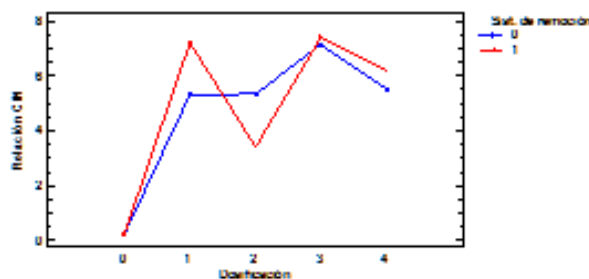


Figura N-11: Interacción e intervalos Tukey (HSD) al 95 % para la dosificación y sistema de remoción.

### Prueba de germinación

En la prueba de germinación los tratamientos que mostraron un porcentaje de germinación más alto fueron a4b1, a1b1 y a3b1, esto se debió a que poseían mayor cantidad de materia orgánica y una mayor relación C/N en comparación a los demás tratamientos. El tratamiento a4b1 posee 5.48 % de materia orgánica y 6.163 de relación C/N, el tratamiento a1b1 tiene 7.31 % de materia orgánica y 7.192 de relación C/N mientras que el tratamiento a3b1 contiene 4.40 % de materia orgánica y 7.406 de relación C/N, mientras que el tratamiento a0b1 con 1.64 % de materia orgánica y 0.224 de relación C/N y su porcentaje de germinación fue de 0 %, lo que evidencia que a mayor cantidad de materia orgánica y mayor relación C/N es mayor el porcentaje de germinación.

### CONCLUSIONES

Se probaron 5 metodologías diferentes para el aprovechamiento de ceniza volcánica en la obtención de bocashi utilizando residuos sólidos domiciliarios incluyendo sistemas de remoción para la aireación del abono orgánico y el uso de microorganismos eficientes. La mejor relación C/N permitió determinar que los mejores tratamientos son el a3b0 y el a3b1 que consisten en (40% materia orgánica: 40% ceniza: 20% suelo) con sistema de remoción por tubo y (40% materia orgánica: 40% ceniza: 20% suelo) con sistema de remoción manual respectivamente.

Se diseñó dos modelos de composteras domésticas una con un sistema de remoción manual que incluyó manivelas y otro sistema de remoción por tubos colocados en diferentes partes del abono orgánico a diferentes alturas para que la aireación sea continua y no haya necesidad de voltear; concluyendo que la aireación por remoción manual permite obtener un bocashi de mejor calidad en cuanto a cantidad de materia orgánica y cantidad de carbono, cantidad de nitrógeno y relación C/N.

Se evaluó la capacidad de aporte nutricional de la ceniza volcánica mediante determinación de porcentaje de materia orgánica, carbono, nitrógeno y relación carbono/nitrógeno y se estableció que el nivel a3 (40% materia orgánica: 40% ceniza: 20% suelo) da una mayor relación carbono/nitrógeno al suelo y que los niveles b0 (por tubo) y b1 (manual) no tenían diferencias significativas sobre la relación C/N.

Los residuos sólidos domiciliarios pueden ser utilizados para la elaboración de abono orgánico a pequeña escala para enriquecer suelos pobres, aprovechando la ceniza volcánica y con la construcción de composteras domésticas.

## REFERENCIAS

- ARMAS S. (2006). Breve acercamiento a la realidad de los residuos sólidos y su disposición final en el Distrito Metropolitano de Quito. Disponible en: [http://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&ved=0CD0QFjAB&url=http%3A%2F%2Fwww.camaraconstruccionquito.ec%2Findex.php%3Foption%3Dcom\\_docman%26task%3Ddoc\\_download%26gid%3D21%26Itemid%3D58%26lang%3Des&ei=H8UhUevdOs90QHJyIFo&usg=AFQjCNFEAUikhLyP6koShj7t\\_1Kut9g-LA&bvm=bv.42553238,d.dmQ](http://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&ved=0CD0QFjAB&url=http%3A%2F%2Fwww.camaraconstruccionquito.ec%2Findex.php%3Foption%3Dcom_docman%26task%3Ddoc_download%26gid%3D21%26Itemid%3D58%26lang%3Des&ei=H8UhUevdOs90QHJyIFo&usg=AFQjCNFEAUikhLyP6koShj7t_1Kut9g-LA&bvm=bv.42553238,d.dmQ)
- Atlas, R., Bartha, R., (2002). Ecología microbiana y Microbiología ambiental Madrid: Prentice Hall. 58 pp.
- Bejarano, H. (2005). Elaboración, uso y manejo de los abonos orgánicos Chocó: Universidad Tecnológica del Chocó.
- Hernández, M.T.; J.I Moreno; Costa; F. J. Gonzalez-Vila and R. Frund. (1990). Structural features of humic acid like substances from sewage sludge. *Soil Sci.* 149:63-68.
- García C.; T. Hernández F. Costa and A. Polo. (1991). Humic Substances in composted sewage sludge. *Wastes management and research.* 9: 189-194
- Cremona, M. (2013). La ceniza volcánica y los suelos de la región. Laboratorio de suelos y aguas INTA Bariloche.
- Carter, MR. (2002). Soil quality for sustainable land management: organic matter and aggregation interactions that maintain soil functions. *Agron. J.* 94: 38-47.



# DESARROLLO DE UNA PELÍCULA COMESTIBLE APLICANDO MOLÉCULAS PROTEÍCAS LÁCTEAS Y PRETRATAMIENTOS DE ACEITES ESENCIALES PARA EXTENDER LA VIDA DE ANAQUEL DE TOMATE HORTÍCOLA FRESCO (*Lycopersicum esculentum*)

## DEVELOPMENT OF AN EDIBLE FILM APPLYING DAIRY PROTEINS MOLECULES AND PRETREATMENTS OF ESSENTIAL OILS TO PROLONG THE SHELF LIFE OF FRESH HORTICULTURAL TOMATO (*Lycopersicum esculentum*)

Diana Sandoval Garzón, Carlos Moreno Miranda

Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos,  
Campus Académico Huachi – Av, Los Chasquis y Río Payamino, Ambato, Ecuador.  
dianasa\_21@hotmail.com, c.s.moreno.m@gmail.com

### RESUMEN

El presente trabajo trata sobre el desarrollo una película comestible aplicando moléculas proteicas lácteas y pre-tratamientos de aceites esenciales para extender la vida de anaquel del tomate hortícola fresco (*Lycopersicum esculentum*). Aplicando un diseño AxBxC los factores en estudio fueron la cantidad de glicerol (5% y 10%), tipo de aceite esencial (salvia, orégano y clavo) y el modo de aplicación (directa o indirecta); se estudiaron propiedades bioquímicas (pH, sólidos solubles, acidez titulable e índice de madurez), análisis microbiológico (Coliformes totales), análisis sensorial, permeabilidad al vapor de agua y tiempo de vida de anaquel. El mejor tratamiento corresponde al a1b2c1 (glicerol 5%, aceite esencial de orégano y aplicación directa), se muestra una disminución en los cambios de maduración teniendo un índice de madurez de 18,65 reduciendo en un 30,88% el índice de madurez normal aceptado en la industria; el análisis microbiológico muestra una reducción considerable de Coliformes totales, gracias al compuesto activo del aceite esencial de orégano como es el carvacrol. El análisis sensorial arroja que dicho tratamiento es aceptable por el consumidor. Al realizar el análisis de la permeabilidad al vapor de agua se obtuvo que estos recubrimientos poseen una permeabilidad moderada al vapor de agua constituyendo una gran ventaja para los procesos de respiración y transpiración evitando daños por condensación. El tiempo de vida de anaquel se estudió mediante la pérdida de peso y dureza; se alargó en 10 días más que el normal, a 5°C el tiempo de vida es de 16 días, a 15°C el tiempo de vida es de 13 días, a 25°C el tiempo de vida es de 4 días. El análisis de costos muestra que el producto posee un precio de venta al público similar a los ofertados en el mercado nacional siendo de \$2,08 el kg de tomate cubierto por la película comestible. Por lo expuesto anteriormente se concluye que el producto puede ser elaborado a escala industrial.

Palabras claves: Películas comestibles. Moléculas proteicas lácteas. Aceites esenciales. Tomate. Vida de anaquel.

### SUMMARY

The following study talks about the development of an edible film applying dairy proteins molecules and pre-treatments of essential oils to prolong the shelf life of fresh horticultural tomato (*Lycopersicum esculentum*). It was applied a design AxBxC, the factors in study were the quantity of glycerol (5% y 10%), several types of essential oils (sage, oregano and clove) and the way of application (direct and indirect). It was studied biochemical properties (pH, soluble solids, acidity and index of maturity), microbiological analysis (Total Coliforms), sensorial analysis, permeability of water steam, and shelf life time. The best treatment corresponds to a1b2c1 (glycerol 5%, essential oregano oils and direct applications). It is shown a decreasing in the changes of maturity. Having and index of maturity of 18,65 that was reduced in a 30,88%, the normal maturity index accepted in industry. The microbiological analysis shows a considerable reduction of Total Coliforms, thanks the active compound of the oregano essential oil, the carvacrol. The sensorial analysis shows that the previous treatment is acceptable for consuming. When the analysis of permeability of water steam was carried out, it was shown that these overlays have a moderate permeability to water steam; providing them a great advantage for breathing and sweating processes; avoiding damages for condensation. The shelf life time was studied through the weight and hardness losing. It was stretched on 10 more days than normal, to 5°C the life time is 16 days. To 15°C the life time is 13 days, to 25°C the life time is 4 days. The costs analysis displays that the product has a price for sale to public similar to the offered in the national market that is \$2,08 kg of tomato recovered by the edible film. As conclusion the product may be elaborated to industrial scale.

Key words: Edible films. Lactic protein molecules. Essential oils. Tomato. Shelf life.

## INTRODUCCIÓN

Las películas comestibles son productos que envuelven un alimento, creando una barrera semipermeable a gases (O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>) y vapor de agua. Mejoran las propiedades mecánicas ayudando a mantener la integridad estructural del producto que recubren, a retener compuestos volátiles y también pueden llevar aditivos alimentarios (agentes antimicrobianos, antioxidantes, etc.). Se crea una atmósfera modificada en el interior del fruto que reduce la velocidad de respiración y por tanto retrasa el proceso de senescencia del producto. Además, crean una barrera a la transferencia al vapor de agua retrasando el deterioro del producto hortofrutícola por deshidratación (Pérez, 2008).

Están compuestos de ceras naturales, polisacáridos y proteínas, formando un envase ideal desde el punto de vista medioambiental, puesto que son biodegradables y pueden ser consumidos con el producto. Pueden aplicarse en forma de finas capas de material alrededor de los alimentos mediante inmersión, pulverización o envolturas, con el fin de ofrecer una barrera selectiva a la transmisión de gases, vapor de agua y otros solutos y también para proteger al alimento (Pérez, 2008).

El contenido proteico del suero depende en su mayor parte del tipo de coágulo y de su tratamiento y la presencia en el mismo de partículas de la cuajada que puede aumentarlo considerablemente. En la leche, el 80% de las proteínas son caseínas; sin embargo, éstas se agregan en la cuajada durante la formación del queso, mientras que las proteínas séricas no quedan retenidas en la cuajada permaneciendo disueltas en la porción acuosa (Salazar, 2012).

Una de las características más importantes de las proteínas séricas es la alta presencia de residuos de aminoácidos con grupos sulfhidrilos que les permite formar enlaces covalentes intermoleculares durante procesos a altas temperaturas (lo que provoca su desnaturalización y posterior agregación). Las proteínas del suero son solubles en un amplio rango de pH y se desnaturalizan (individualmente y en solución) entre 64 y 85°C, y a partir de esta temperatura empiezan a agregarse y a gelificar. La desnaturalización implica la pérdida de solubilidad proteica (Salazar, 2012).

Los aceites esenciales (esencias o aceites volátiles) son productos de composición generalmente muy compleja (González, 2004). Actualmente se han identificado alrededor de cuatrocientos componentes químicos constituyentes de los aceites esenciales. La mezcla compleja que integra los aceites esenciales pertenece de manera casi exclusiva a grupos característicos distintos: el grupo de los terpenos, el grupo de los compuestos derivados del fenilpropano, los terpenos originarios del ácido acético, los terpenos provenientes del ácido siquímico (aromáticos) y otros como los compuestos procedentes

de la degradación de terpenos (Kubeczka, 2002).

Los aceites esenciales extraídos de algunos tipos de vegetales tienen actividad bactericida y pueden ser utilizados en la preservación de alimentos. La hidrofobicidad de los aceites esenciales permite que se solubilizan en la membrana de la célula bacteriana y de la mitocondria afectando sus propiedades estructurales y facilitando su permeabilización, favoreciendo a la liberación de iones y otros metabolitos celulares, que en gran cantidad produce la muerte celular (Morata, 2010)

El tomate es la hortaliza más difundida en todo el mundo y la de mayor valor económico. Su demanda aumenta continuamente y con ella su cultivo, producción y comercio. El incremento anual de la producción en los últimos años se debe principalmente al aumento en el rendimiento y en menor proporción al aumento de la superficie cultivada (INFOAGRO, 2003).

Jaramillo et al., 2007; reportan que, el tomate es una rica fuente de vitaminas A, B1, B2, B6, C y E, y de minerales como fósforo, potasio, magnesio, manganeso, zinc, cobre, sodio, hierro y calcio. Tiene un importante valor nutricional ya que incluye proteínas, hidratos de carbono, fibra, ácido fólico, ácido tartárico, ácido succínico y ácido salicílico.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Materia prima.** Se dispuso de tomate de variedad Daniela proveniente del Cantón Salcedo de la Provincia de Cotopaxi adquirido en el Mercado Mayorista de la Ciudad de Latacunga.

**Diseño experimental.** Se utilizó un diseño al azar en arreglo factorial A\*B\*C de 12 tratamientos, con dos réplicas.

**Factor A:** Cantidad de glicerol

a1: 5%; a2: 10%

**Factor B:** Tipo de aceite esencial (0,03%)

b1: salvia; b2: orégano; b3: clavo

**Factor C:** Modo de aplicación

c1: directa; c2: indirecta

**Desarrollo de película comestible.** La película se elaboró mediante la mezcla de glicerol (5% y 10%) como plastificante, suero seco de leche (7%) y utilizando una solución de agua y almidón de maíz al 5%. Se calentó la solución agua - almidón hasta 85°C durante 10 minutos, se enfrió a 70 °C y se adicionó el glicerol y el suero, se filtró y enfrió a 30 °C para su aplicación.

**Acondicionamiento.** Se realizó un pesado inicial de la materia prima. Se clasificó manualmente la materia en buen estado y se descartó la materia que contenía daños mecánicos, tamaño muy pequeño y posible contaminación externa. Se realizó un lavado manual con agua

corriente eliminando impurezas de mayor tamaño como tierra, sustancias químicas, insectos y partes de la planta como hojas y tallos. Se desinfecto la materia prima mediante la inmersión de la misma en un baño de cloro y metabisulfito de sodio (200 ppm) durante 10 minutos. Pretratamientos de aceites esenciales en el tomate. Luego de la etapa de acondicionamiento del tomate hortícola fresco se emplearon los diferentes aceites esenciales mediante inmersión del tomate en una solución de aceite esencial (0,03%) y tween 80.

### Parámetros de control

**Determinación del potencial de hidrógeno pH.** Se determinó según la norma AOAC 981.12; por lectura directa utilizando un potenciómetro manual portátil, marca HANNA HI 9126, previamente calibrado, a temperatura ambiente.

**Determinación de Sólido solubles (°Brix).** Se determinó según la norma AOAC 970.59; en forma directa utilizando el refractómetro, con una escala de 0-30 °Brix.

**Determinación de Acidez.** Se determinó siguiendo el procedimiento descrito por la norma ISO 750:1998; para encontrar acidez titulable en porcentaje de ácido cítrico.

**Determinación de la permeabilidad al vapor de agua.** Se utilizó la metodología descrita en la norma E 96-87 (ASTM, 1986).

**Evaluación microbiológica del tomate.** Se realizó un análisis cuantitativo de la contaminación de recuento de coliformes totales presentes en la muestra utilizando Petri films mediante por la metodología detallada por la casa fabricante.

**Análisis sensorial.** Se realizó en la parte inicial del estudio y se evaluaron los siguientes atributos: color, olor, sabor, textura y aceptabilidad, los datos se procesaron mediante la aplicación de un diseño experimental de bloques incompletos para asilar el efecto del catador.

**Análisis de vida de anaquel.** Se realizó el estudio del mejor tratamiento mediante el método TTT (Tolerancia, Time, Temperature), descrito por Alvarado (1996), se trabajó a tres temperaturas de almacenamiento de la muestra: 5°C, 15°C y 25°C, donde se evaluó la pérdida de peso, por cuadruplicado diariamente. Además se realizó el análisis de textura cuya respuesta experimental fue la dureza mediante pruebas de laboratorio utilizando el texturómetro Brookfield CT3, las muestras se valoraron cada dos días, donde se requería un mínimo de 10 muestra para el estudio.

**Análisis estadístico.** Se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia empleando el software Statgraphics Plus.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### pH

La tendencia de pH aumenta conforme transcurre el tiempo, en una relación directamente proporcional, la modificación del contenido de ácidos orgánicos presentes en la fruta es de gran importancia a nivel bioquímico ya que el pH acondiciona la actividad de un gran número de enzimas responsables en los sucesos de la maduración “ablandamiento, color entre otros” (Hernández, 2007).

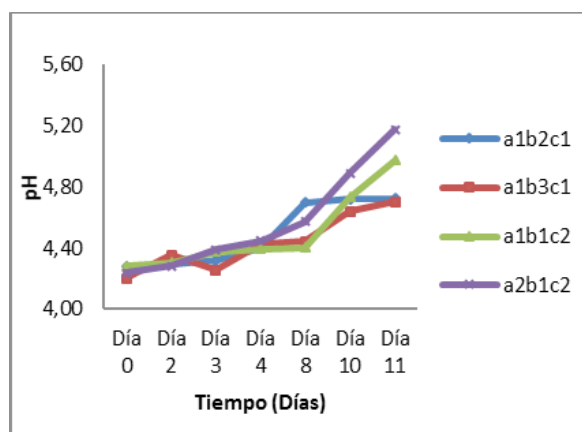


Figura 1. Variación de pH vs tiempo (días)

En la figura 1, se detalla la tendencia al aumento de pH de los tratamientos en función del tiempo; los tratamientos con menor variación son a1b2c1 (glicerol 5 %, orégano, aplicación directa), a1b3c1 (glicerol 5 %, clavo, aplicación directa), y a1b1c2 (glicerol 5 %, salvia, aplicación indirecta), frente al tratamiento con mayor aumento en el pH a lo largo del tiempo a2b1c2 (glicerol 10%, salvia, aplicación indirecta).

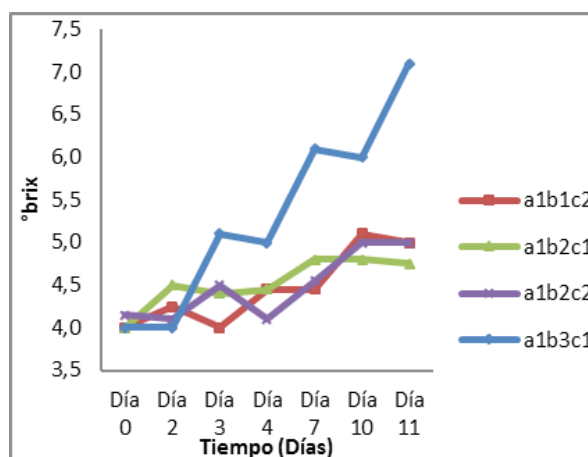


Figura 2. Variación de sólidos solubles (°Brix) vs tiempo (Días)

Al realizar el análisis estadístico los factores que influyen significativamente en este parámetro corresponden a la composición de la película del 5% de glicerol, los aceites esenciales de orégano y clavo y el modo de aplicación directo del recubrimiento. Este actúa como una barrera semipermeable de gases del producto hacia el ambiente produciendo una maduración más lenta y una

degradación leve de los ácidos presentes en el tomate. Sólidos solubles

Los sólidos solubles tienden a aumentar conforme la maduración se efectúa debido a que el tomate experimenta la descomposición de almidones y azúcares complejos por acción de enzimas a compuestos simples es decir los sólidos solubles.

La figura 2, muestra el menor aumento de sólidos solubles tratamientos a1b2c1 (glicerol 5%, orégano y aplicación directa), a1b2c2 (glicerol 5%, orégano, aplicación indirecta) y a1b1c2 (glicerol 5%, salvia, aplicación directa) con apenas una variación de 1°Brix frente al tratamiento con un aumento mayor de sólidos solubles que fue el a1b3c1 (glicerol 5%, clavo, aplicación directa) con una variación de 3°Brix.

En el análisis estadístico se evidencia que existe diferencia significativa, los factores que no favorecen al incremento de los sólidos solubles corresponden al tipo de aceite esencial siendo el de orégano y el de clavo, y el modo de aplicación indirecto.

### Acidez

La acidez es una característica que indica que a medida que transcurre la maduración los ácidos orgánicos (ácido cítrico) presentes en el tomate, son convertidos en azúcares disminuyendo así su contenido (Hernández, 2007). Durante la experiencia todos los tratamientos no poseen una variación notoria de la disminución de este parámetro.

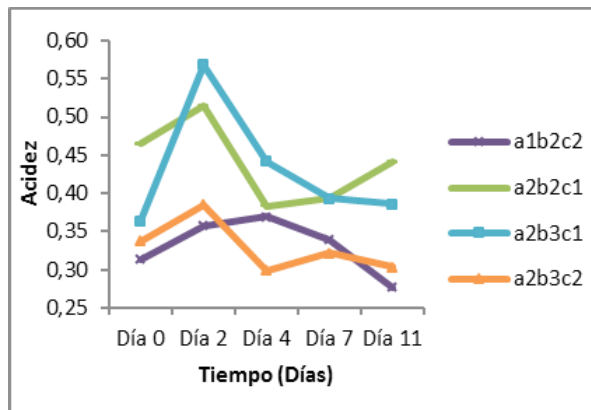


Figura 3. Variación de la Acidez titulable (gr/100 gr) vs Tiempo (Días)

La figura 3 muestra los mejores tratamientos para este parámetro con la variación más baja de acidez a lo largo del tiempo, a1b2c2 (glicerol 5%, orégano, aplicación directa), a2b2c1 (glicerol 10%, orégano, aplicación indirecta), a2b3c1 (glicerol 10%, clavo, aplicación indirecta) y a2b3c2 (glicerol 10%, clavo, aplicación directa).

Al realizar en análisis de varianza para la acidez los factores que influyen son el tipo de aceite esencial de

orégano y clavo y la forma de aplicación directa de la película comestible.

### Índice de Madurez

El índice de madurez corresponde a la relación entre °Brix / acidez titulable, es decir el incremento en sólidos solubles o el decremento de la acidez titulable provoca el aumento del índice de madurez.

La figura 4 detalla la tendencia del índice de madurez a lo largo del tiempo, los mejores tratamientos son al a2b3c1 (glicerol 10%, clavo, aplicación directa), a1b2c2 (glicerol 5%, orégano, aplicación indirecta), a2b2c1 (glicerol 10%, orégano, aplicación directa), el tratamiento con mayor variación corresponde al a2b2c2 (glicerol 10%, orégano, aplicación indirecta).

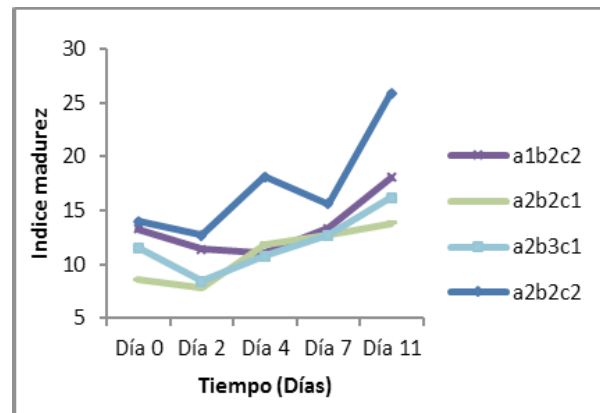


Figura 4. Variación del Índice de madurez (°Brix/Acidez titulable) vs Tiempo (Días)

En el análisis estadístico muestra que el porcentaje de glicerol y el tipo de aceite esencial no influyen directamente mientras que el modo de aplicación directa de la película ayuda a reducir en índice de madurez del tomate.

A partir de este resultado el tratamiento que presentó un índice de madurez menor fue el tratamiento a1b2c1 (glicerol 5%, aceite esencial de orégano, aplicación directa) con un índice de madurez de 12,89, mientras que el valor que reporta Reina (2008), es un valor de 18,65 para madurez intermedia, por lo tanto se logró reducir el índice de madurez en un 30,88%, esto es de gran beneficio para la industria ya que se corrobora la efectividad del recubrimiento al reducir el tiempo de maduración del tomate hortícola fresco.

### Análisis microbiológico

Se realizó el conteo de coliformes totales, la contaminación se efectúa solo en seis de los tratamientos como se detalla en la figura 5, a1b3c1 (glicerol 5%, clavo, aplicación indirecta), a1b3c2 (glicerol 5%, clavo, aplicación directa), a2b1c1 (glicerol 10%, salvia, aplicación indirecta), a2b3c1 (glicerol 10%, clavo, aplicación indirecta), a2b3c2 (glicerol 10%, clavo, aplicación directa) y a0b0c0 (testigo) verificando así el crecimiento

de Unidades formadoras de colonia (Ufc/gr), este crecimiento se efectuó en la dilución 10-2.

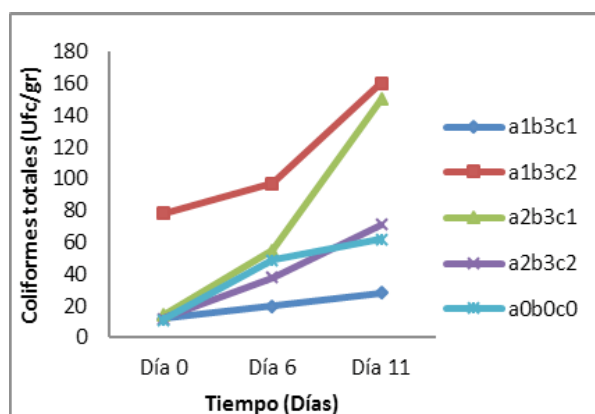


Figura 5. Contaminación coliformes totales (Ufc/gr) para tratamientos contaminados.

El carvacrol procedente del orégano presenta mayor capacidad inhibitoria frente a más microorganismos patógenos alimentarios.

En cuanto a los coliformes totales estos son bacilos gram negativos; según afirma Morata (2010), se cree que el carvacrol actúa incrementando la permeabilidad de las membranas de estos bacilos, interacciona con la membrana celular disolviéndose en la bicapa fosfolipídica, distorsionando, expandiendo y desestabilizando la estructura física; provoca además la fuga de iones fosfato y ATP. El grupo hidroxilo permite unirse a las proteínas del citosol impidiendo el funcionamiento de enzimas.

#### Análisis sensorial

En todos los atributos estudiados se existe diferencia significativa entre tratamientos, por lo cual se realizaron pruebas de comparación múltiple entre grupos LSD. En la tabla 1 se detallan los promedios de los tratamientos evaluados con su grupo comparativo para cada atributo. Para el caso de color se verifica tal diferencia debido a que la maduración fue diferente, se debe a la producción de un carotenoide específico como el licopeno y demás compuestos que generan el color se desarrollaron de a diferentes velocidades.

En cuanto al olor, el aceite esencial de salvia fue el más débil, en comparación de los demás aceites esenciales de clavo y orégano, los mismos son determinantes en el atributo del olor siendo muy perceptibles para el catador.

En cuanto al atributo de sabor y textura el tratamiento con mejor puntuación correspondió al a1b3c2 (glicerol 5%, clavo, aplicación indirecta), indica que el sabor del aceite agrada mucho en combinación con el tomate. Los cambios en la maduración que afectan al sabor y la textura son la degradación de reservas amiláceas a azúcares más simples y la degradación de pectinas y hemicelulosas (Kader, 2006).

Finalmente en cuanto al atributo de aceptabilidad el mejor tratamiento correspondió al a1b1c2 (glicerol 5%, salvia, aplicación indirecta), dicho tratamiento posee las mejores puntuaciones frente a los demás tratamientos degustados.

Tabla 1. Comparación múltiple entre grupos LSD para todos los tratamientos, C: Color; O: Olor; S: Sabor; T: Textura; A: Aceptabilidad.

Tr	C	O	S	T	A
a1b1c1	2,3c	3,2de	3,5bcd	4,1ab	3,8abcd
a1b1c2	4,5ab	3,8bcd	4,0abc	4,0abc	4,4a
a1b2c1	2,5c	3,4cde	4,1abc	3,2de	3,6abcde
a1b2c2	4,3ab	3,8bcd	3,7abcd	3,3cde	3,9abcd
a1b3c1	2,8c	2,8e	3,1d	3,8abcd	3,2cde
a1b3c2	4,3ab	4,2abc	4,2ab	4,2a	3,9abcd
a2b1c1	2,6c	3,4cde	3,1d	3,8abcd	2,9e
a2b1c2	4,6a	4,2ab	3,4bcd	3,5bcde	4,1ab
a2b2c1	2,5c	2,7e	3,5bcd	3,4bcde	4,3a
a2b2c2	3,8b	4,2abc	3,3cd	4,4a	3,1de
a2b3c1	2,1c	2,5e	3,1d	4,1ab	3,3bcde
a2b3c2	3,8b	4,3abc	4,1abc	3,8abcd	4,0abc
a0b0c0	4,8a	5,0a	4,3a	3,0e	3,4bcde

#### Vida de Anaquel

El tomate produce una tasa moderada de etileno de 1,0-10,0  $\mu\text{l}/\text{Kg}\cdot\text{h}$ , lo cual incrementa el desarrollo de fruto y por ende su temprano deterioro (Kader, 2006). La pérdida de agua es una causa principal del deterioro ya que causa pérdidas de apariencia tales como marchitamiento, deshidratación y pérdida de la calidad de textura conocida como el ablandamiento.

El estudio se realizó al mejor tratamiento a1b2c1 (glicerol 5%, aceite esencial de orégano y aplicación directa), se analizó la pérdida de peso (%) y la textura se analizó mediante un texturómetro Brookfield, cuyo parámetro fue la dureza (g) se trabajó por acción de fuerza externa por punción, en condiciones de almacenamiento de refrigeración ( $5^{\circ}\text{C}$ ), simulación de cuartos fríos ( $15^{\circ}\text{C}$ ) y a temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C}$ ).

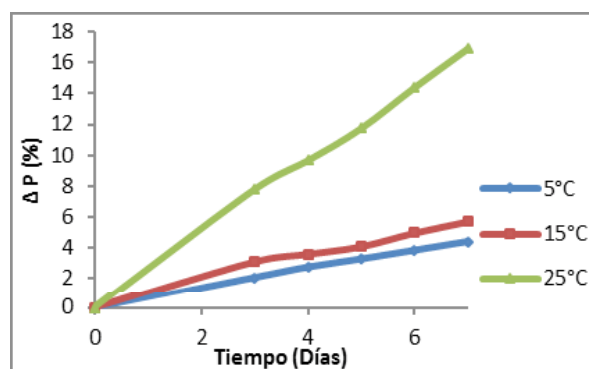


Figura 6. Variación de la pérdida de peso (%) vs Tiempo (Días)

En la figura 6, se observa que conforme aumenta la temperatura y transcurre el tiempo, la pérdida de peso es mucho mayor, altas temperaturas secan la película, produciéndose mayor migración de agua; no hay mucha diferencia de pérdida de peso a 5 y 15 °C, es importante mantener temperaturas bajas de almacenamiento.

Todas las regresiones lineales poseen coeficientes de determinación altos; se tomó en cuenta una pérdida máxima de peso de 10% en condiciones normales, a 5°C se tiene un tiempo de vida de anaquel de 16 días, a 15°C un tiempo de vida de anaquel de 13 días y finalmente a 25°C un tiempo de vida de anaquel de 4 días.

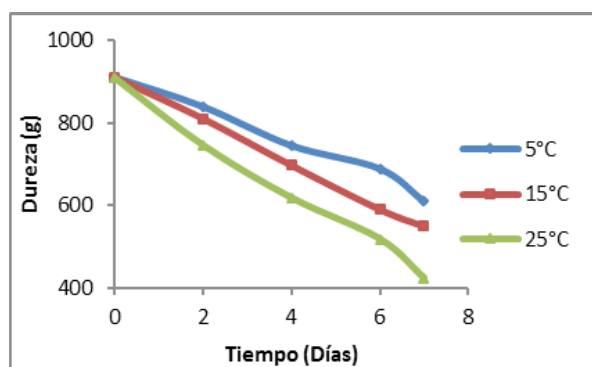


Figura 7. Dureza (g) vs. Tiempo (Días)

La figura 7, muestra la dureza en función del tiempo, la temperatura de almacenamiento influye de una manera determinante en la pérdida de la dureza, causada por la migración de humedad y pérdida de firmeza.

Se tomó en cuenta una aplicación máxima de dureza de 250 g reportada por Coronel (2007), para provocar daño del tomate conocida como fracturabilidad para realizar el análisis, a 5°C se tiene un tiempo de vida de anaquel de 16 días, a 15°C un tiempo de vida de anaquel de 13 días y finalmente a 25°C un tiempo de vida de anaquel de 10 días.

Según Reina (2008), el tomate hortícola fresco posee un tiempo de vida de anaquel de 6 días en condiciones de post-cosecha y expendio, por lo tanto con la aplicación de la película comestible y el manejo adecuado de temperaturas de refrigeración, se logró extender el tiempo de vida de anaquel en 10 días.

#### Permeabilidad al Vapor de agua

Se evaluó la permeabilidad de agua de las películas comestibles estudiadas para verificar la permeabilidad aportada por la proteína láctea, los recubrimientos A y B corresponden las formulaciones aplicadas en el diseño experimental y se añadió un control C, en cual en su formulación no contenía dicha proteína.

Figura 8. Valores de velocidad de transmisión de vapor de agua

Figura 9. Valores de permeabilidad al vapor de agua  
En la figura 8, se muestran los valores de transmisión del vapor de agua a través de los recubrimientos, los recubrimientos con adición de proteína láctea son los que poseen valores más altos de transmisión indicando que esta propiedad de permeabilidad es conferida por las moléculas del suero de leche ya que forma una película porosa, de igual manera ocurre con la permeabilidad calculada, en la figura 9, los valores altos se presentan en los recubrimientos con adición de moléculas séricas, además mayor permeabilidad posee el tratamiento con mayor cantidad de glicerol, debido a que este plastificante se encuentra en mayor concentración agrupa y ordena la estructura de todos los componentes evaluados y confiere la característica de flexibilidad.

La importancia de valores altos en la permeabilidad al vapor de agua es fundamental ya que al estar dispuesta la película en la superficie externa del tomate no impide el movimiento del vapor de agua, previniendo la condensación de agua durante la maduración por lo que se evita un factor de riesgo de deterioro para el tomate.

#### Análisis económico

Se realizó el análisis económico del mejor tratamiento T3 (Glicerol 5%, aceite esencial de orégano y aplicación directa), el precio de venta al público de \$ 2,08 en presentación de 1 Kg.

En el mercado nacional el precio del tomate fresco empacado oscila entre \$2,00 y \$3,50 dependiendo del origen, tamaño, peso y empaque. Las empresas comercializadoras de tomate empacado y tomate orgánico empacado son Hortana y Arsaico; los precios que están empresas ofertan son un poco elevados con relación al producto propuesto, hay que destacar que el producto permanece mayor tiempo en mejores condiciones físicas y microbiológicas que la competencia, lo cual es una ventaja al adquirir este producto y evitar así mermas en percha y también para el consumidor final, siendo competencia posible para las empresas comercializadoras de tomate hortícola fresco.

#### CONCLUSIONES

La forma de aplicación más adecuada de la película comestible corresponde al mejor tratamiento a1b2c1 (glicerol 5%, aceite esencial de orégano y aplicación directa), estos factores favorecen al alargamiento del tiempo de maduración conservando sus propiedades bioquímicas, sensoriales y microbiológicas.

Se midió el grado de conservación del tomate hortícola fresco (reducción de crecimiento microbiano) conseguido al emplear un pretratamiento de aceite esencial de orégano, este aceite contiene su compuesto activo denominado carvacrol, el cual desestabiliza la membrana celular y el metabolismo de bacterias gram (-) tales como Coliformes totales.



Al analizar los parámetros Físico-químicos mediante la aplicación de pruebas en laboratorio, tales como pH, acidez, °Brix e Índice de madurez, se verifica que la maduración continua de una manera lenta, comprobando la efectividad de la película comestible.

Mediante el análisis de los parámetros sensoriales se verifica que el producto es aceptado por el consumidor ya que la película no altera los atributos sensoriales, además gracias al aceite esencial aporta un aroma y sabor muy agradable.

El costo del producto en una presentación de 1 kg es de \$2,08; similar a los precios de la competencia, que ofertan tomate fresco empacado.

Este estudio constituye una alternativa a agricultores, productores e industriales para que mejoren el manejo post-cosecha del tomate hortícola y aportarle valor agregado a un producto muy demandado.

El uso de moléculas proteicas lácteas y pretratamientos de aceites esenciales favorecen al alargamiento del tiempo de vida útil del tomate hortícola fresco en 16 días ya que retarda los fenómenos bioquímicos de maduración incrementando su tiempo de manipulación.

#### REFERENCIAS

Alvarado, J. 1996. "Principios de Ingeniería Aplicados a Alimentos". Radio Comunicaciones. Quito- Ecuador. 134 pp.  
Coronel, J. 2007. "Alternativas de Mejora en el Manejo Post-cosecha de Tomate Riñón Cultivados en la Provincia de Santa Elena". Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador. ESPOL. Guayaquil-Ecuador.

González, L. 2004. Actividad Antifúngica de Aceites Esenciales y sus Compuestos sobre el Crecimiento de *Fusarium* sp. Aislados de Papaya (Carioca papaya). Revista Científica de la Escuela de Ingeniería Agrícola de la Universidad de Oriente, septiembre 2008, vol. 8N°3, pp 33-40.

Hernández, M. 2007. Fisiología Post-cosecha. Departamento de biología. Universidad Nacional de Colombia.

INFOAGRO. 2007. "El cultivo del tomate". <http://www.infoagro.com/hortalizas/tomate.htm>

Jaramillo, J.; Rodríguez, V.; Guzmán, M.; Zapata, M.; Rengifo T. 2007. Manual técnico: Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) en la producción de tomate bajo condiciones protegidas. <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/a1374s/a1374s02.pdf>

Kader, A. 2006. Biología y Tecnología de Post-cosecha: Una revisión General. Universidad de California. Publ. 3311.

Kubeczka K. 2002. Esencial Oils Analysis by Capillary Gas Chromatography and Carbon-13 nmr Spectroscopy. Segunda Edición. Nueva York, 461 p.

Morata, A. 2010. "Nuevas Tecnologías de Conservación de Alimentos" Segunda Edición. AMV Ediciones. Madrid- España. 187-203 pp.

Pérez, 2008. Recubrimientos comestibles en Frutas y Hortalizas. IVIA. Centro de poscosecha. Valencia. 19 pp.

Reina, C. 2008. Manejo Post-cosecha y Evaluación de Calidad de Tomate que se comercializa en la ciudad de Neiva. Universidad Sur de Colombia. Facultad de ingeniería Agrícola.

Salazar, D. 2012. "Estudio del efecto de la incorporación de concentrados de proteínas del suero de quesería en la elaboración de queso fresco con reducido contenido de grasa, para promover un mayor aprovechamiento del suero generado en las queserías del cantón Pillaro, Provincia de Tungurahua". Trabajo de Investigación Grado Académico de Magister en Gestión de la Producción Agroindustrial. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos. Universidad Técnica de Ambato. Ambato- Ecuador.

**EVALUACIÓN DEL VALOR NUTRICIONAL Y CALIDAD SENSORIAL DE TORTILLAS PRECOCIDAS ELABORADAS CON PAPA NATIVA (*Solanum tuberosum* ssp. *andigena*) DE TRES VARIEDADES (CHAUCHA ROJA, LEONA NEGRA Y YEMA DE HUEVO) ENRIQUECIDAS CON PASTA DE QUINUA (*Chenopodium quinoa* Willd)**

**EVALUATION OF THE VALUE NUTRITIONAL AND SENSORY QUALITY PRECOOKED OF TORTILLAS LIEGARED WITH NATIVE POTATOES (*Solanum tuberosum* ssp. *andigena*) FROM THREE VARIETIES (CHAUCHA RED, BLACK LEONE AND EGG YOLK) ENRICHED WITH QUINOA PASTE (*Chenopodium quinoa* Willd)**

Eliana Guillín\*, Milton Ramos y Mónica Silva

Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ciencia e Ingeniería En Alimentos.  
Av. Los Chasquis y Río Payamino, Casilla 18-01-0334. elianag\_23@yahoo.es  
Ambato – Ecuador

**RESUMEN**

La presente investigación se orientó a la búsqueda de una nueva tecnología de procesamiento de papas nativas (*Solanum tuberosum andigena*) y quinua (*Chenopodium quinoa* Willd), mediante la elaboración de tortillas de papas precocidas y refrigeradas en base a papas nativas (Chaucha Roja, Leona Negra y Yema de Huevo), pasta de quinua, sal de mesa y conservantes (Ácido Cítrico y Sorbato de Potasio) para alargar su tiempo de vida útil. Los factores de estudio fueron, el factor A: Variedad de papa nativa, a0= Chaucha Roja, a1= Leona Negra y a2= Yema de Huevo; y el factor B: Porcentaje de la pasta de quinua, b0= 15%, b1= 20% y b2= 25%. Se realizó análisis químicos (vitamina C, pH y acidez), microbiológicos y sensoriales (color, olor, sabor, textura y aceptabilidad). Se evaluó el valor nutritivo y la calidad sensorial de las tortillas. Los resultados de los análisis permitieron determinar estadísticamente el mejor tratamiento, la combinación a2b2 que corresponde a papa Yema de Huevo enriquecida con el 25% de pasta de quinua. El tiempo de vida útil del producto fue de 10 días a 4°C. El análisis proximal de la muestra patrón y del mejor tratamiento señala que existen diferencias en el valor nutritivo, debido a que la concentración de pasta de quinua (25%) incrementa el contenido de proteína de 1.72 a 2.46% en la tortilla de papa.

Palabras claves: tortilla de papa, papa nativa, pasta de quinua.

**SUMMARY**

This research was aimed at finding a new processing technology native potato (*Solanum tuberosum andigena*) and quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd), through the development of native potato tortillas refrigerated precooked potatoes basis (Chaucha Roja, Leona Negra y Yema de Huevo), quinoa pasta, salt and preservatives (citric acid and potassium sorbate) to extend its shelf life,. Study factors were, factor A: Variety native potato a0 =Chaucha Roja, a1 = Leona Negra a2 = Yema de Huevo, and factor B: Percentage of quinoa pasta, b0 = 15%, b1 = 20% and b2 = 25%. Chemical analysis was performed (vitamin C, pH and acidity), microbiological and sensory (color, odor, flavor, texture and acceptability). We evaluated the nutritional value and sensory quality of the tortillas. Results of statistical analysis allowed determining the best treatment, the combination a2b2 corresponding to potato Yema de Huevo enriched with 25% paste of quinoa. The shelf life of the product was 10 days at 4°C. Proximate analysis standard sample and the best treatment, points to differences in the nutritional value, due to the concentration of quinoa pasta (25%) increases protein content from 1.72 to 2.46% in potato tortilla.

Keywords: potato tortillas, potato native, quinoa pasta.



**INTRODUCCION**

La región de los Andes Centrales de Perú, Ecuador y Bolivia tiene una riqueza única de sistemas de producción de papa. Por miles de años los agricultores de zonas alto-andinas han desarrollado tecnologías tradicionales adaptadas a condiciones climáticas severas. Se conoce que los Andes Centrales de Perú y Bolivia son el centro de origen de la papa (*Solanum tuberosum* andígena) y poseen una amplia diversidad, registrándose más de 3,800 variedades diferentes de papas nativas (Caycho-Ronco et al., 2009).

En nuestro país existen variedades de papa nativa que son cultivadas sobre los 3,000 m.s.n.m; a estas alturas la fuerte radiación solar y los suelos orgánicos andinos brindan a estos productos cualidades especiales y además, son cultivadas generalmente sin el uso de fertilizantes químicos y casi sin aplicación de pesticidas (El Ciudadano, 2010). Se cultivan aproximadamente 400 variedades de papa nativa, pero solo alrededor de 20 de ellas tienen presencia comercial en los mercados en las provincias de la sierra central del país. (Martínez F, 2009).

Sin embargo, son pocos los industriales que conocen las papas nativas y la mayoría las confunden con las mejoradas. Algunas de las papas que se reconocen como nativas son: Yema de Huevo, Chaucha, Uvilla y Leona. (Monteros et al., 2005). Entre los principales usos de las variedades de papa nativa, se mencionan que se consume en forma fresca, cocida o como acompañante de platos típicos: Chaucha Roja, Leona Negra y Yema de Huevo. (Martínez F, 2009).

La tortilla de papa es un plato típico de la serranía ecuatoriana que para su elaboración se utiliza: papa, queso, especias, sal y achiote. En la presente investigación se planteó conocer el efecto de la utilización de papa nativa y el reemplazo del queso por la pasta de quinua en la elaboración de tortillas de papa, sin la adición de especias o colorantes naturales.

La Quinua es cultivada en la zona interandina, crece a alturas entre los 2,000 a 3,800 m.s.n.m. y es rico en nutrientes necesarios para la alimentación humana. La quinua es producida industrialmente en Bolivia, Perú y Ecuador a nivel mundial. Bolivia capta el 85% de la oferta mundial de quinua, le sigue Perú con 10% y por último Ecuador con apenas el 5%. (Cazar et al., 2004).

En las ciudades de la Sierra ecuatoriana se prefiere consumir la quinua en sopas, algunos guisos y como acompañamiento de diferentes platos. También se elaboran productos procesados con base a quinua, tales como harinas (mezclas con avena, trigo) y alimento para bebés (papilla con mezclas de harina de quinua, cereales y miel), hojuelas, fideos, pan mezclado con cereales. (CRS, CIP y FAO, 2003).

El objetivo de la presente investigación fue evaluar el valor nutritivo y calidad sensorial de las tortillas precocidas de papas nativas (Chaucha Roja, Leona Negra y Yema de Huevo) enriquecidas con pasta de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd).

**MATERIALES Y MÉTODOS**

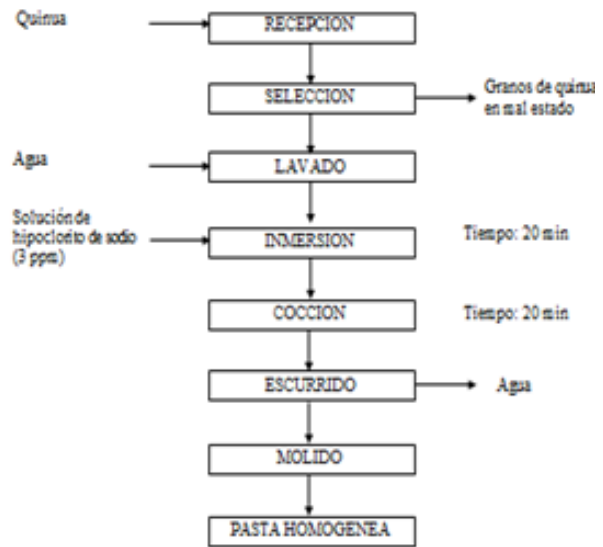


Gráfico 1. Diagrama de flujo de la elaboración de pasta de quinua precocida.

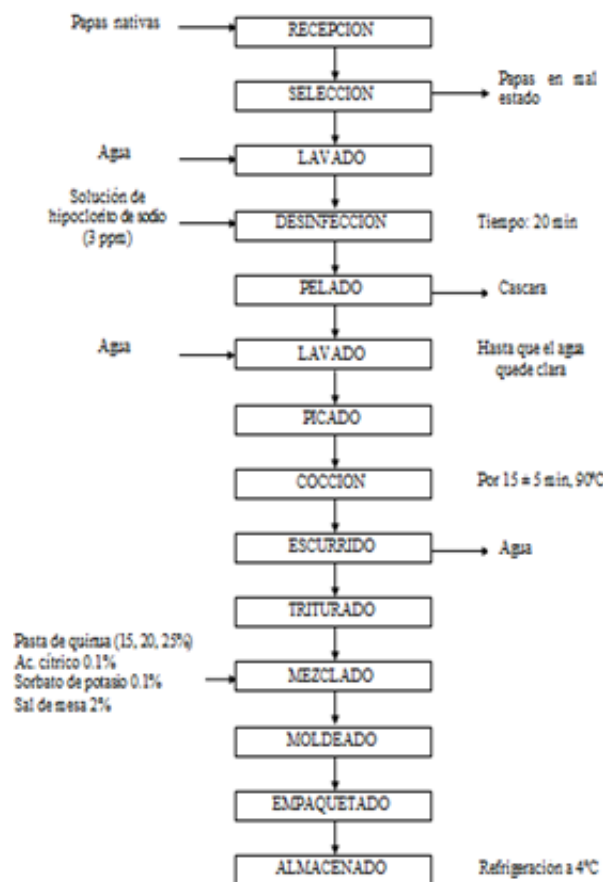


Gráfico 2. Diagrama de flujo de la elaboración de tortilla de papa nativa enriquecida.

Se utilizó materiales como: papas nativas frescas sin brotes (Chaucha Roja, Leona Negra y Yema de Huevo), quinua dulce desamargada, sal de mesa, ácido cítrico y sorbato de potasio.

El procedimiento para la elaboración de tortillas de papas nativas enriquecidas con pasta de quinua consta de dos etapas:

Proceso de elaboración de la pasta de quinua (Grafico 1).

Elaboración de la tortilla de papa nativa enriquecida con pasta de quinua (Grafico 2).

### Diseño Experimental

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo con los siguientes factores y niveles indicados en la Tabla 1.

Tabla 1: Factores y niveles del diseño experimental.

FACTORES	NIVELES	
Variedad de la papa nativa (A)	Chaucha Roja	ao
	Leona Negra	a1
	Yema de Huevo	a2
Porcentaje de la pasta de quinua (B)	15%	bo
	20%	b1
	25%	b2

Fuente: Eliana Guillín A.

Para establecer si existía relación entre los factores de estudio: variedad de papa nativa y porcentaje de pasta de quinua, se consideró aplicar un diseño factorial 3n, por lo que se tuvo 9 tratamientos, mismos que al trabajar con una réplica da un total de 18 tratamientos.

Las respuestas experimentales son:

- pH.
- Acidez.
- Determinación de vitamina C.
- Análisis microbiológico: aerobios mesófilos, mohos y levaduras, *Staphylococcus aureus*, coliformes totales y *Escherichia coli*.
- Análisis sensorial: color, olor, sabor, textura y aceptabilidad de la tortilla frita, Las calificaciones de los atributos para la tortilla de papa nativa enriquecida con pasta de quinua se valoró en un rango de 1 (disgusta mucho) hasta 5 (gusta mucho).
- Vida Útil

Los alimentos que se deterioran por orden uno, corresponde a una ecuación de cinética de primer orden. Se realizó una estimación del tiempo de vida útil, según el reporte de los microorganismos aerobios mesófilos.

Matemáticamente se expresa por:

$$\ln C = k t + \ln C_0 \quad (1)$$

Dónde:

C = parámetro escogido como límite de tiempo de vida útil.

C<sub>0</sub> = concentración inicial.

t = tiempo de reacción.

k = constante de la velocidad de reacción.

Durante la determinación de tiempo de vida útil de las tortillas de papa nativa enriquecidas con pasta de quinua, se evaluó lo siguiente:

- Análisis microbiológico: aerobios mesófilos y coliformes totales.
- Análisis sensorial: color, olor, sabor, textura de la tortilla frita; y color, olor y textura de la tortilla cruda (sin freír).
- Humedad.

### ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS.

#### Aerobios mesófilos

El análisis de varianza mostró que ninguno de los factores “variedad de papa nativa” y “porcentaje de pasta de quinua” influyó en el contenido de microorganismos aerobios mesófilos en los tratamientos de tortillas enriquecidas con pasta de quinua.

#### Mohos y levaduras

El análisis de varianza mostró que no existe influencia de los factores “variedad de papa nativa” y “porcentaje de pasta de quinua” en el contenido de microorganismos mohos y levaduras en las tortillas de papa nativa enriquecidas con pasta de quinua.

#### Coliformes

No se encontró presencia de coliformes en ningún tratamiento.

#### *Staphylococcus aureus*

Se realizó el análisis de varianza, sobre la influencia de los factores “variedad de papa nativa” y “porcentaje de pasta de quinua” en el contenido de *S. aureus* en las tortillas de papa nativa enriquecidas. De acuerdo a los resultados presentados en la tabla de análisis de varianza, se establece que el factor A (variedad de papa nativa) al igual que (AA) y (BB), influyen en el contenido de *S. aureus* en las tortillas enriquecidas con pasta de quinua, mientras que el factor B (% pasta de quinua) y la interacción de los factores (AB) no influyen.

### ANÁLISIS QUÍMICOS

#### Acidez

Se analizó la figura 1 y se observa que existe una diferencia en el porcentaje de acidez entre los promedios de los niveles bajos y altos del factor A, así como del factor B. Se concluyó que la variedad de papa Yema de Huevo presenta un menor % de ácido cítrico en relación a las variedades Chaucha Roja y Leona Negra.

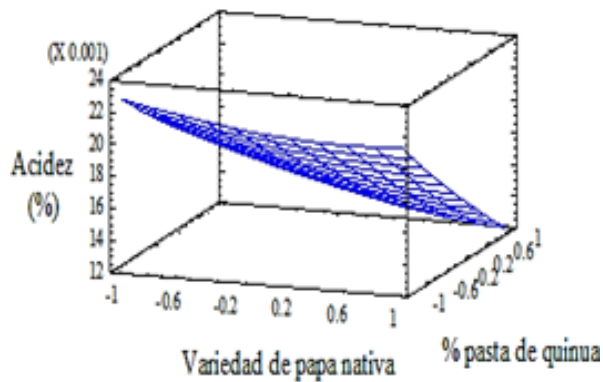


Figura 1. Superficie de respuesta estimada de la valoración de la acidez.

### Potencial hidrogeno (pH)

Según la figura 2 se concluyó que la utilización de la variedad Leona Negra en la elaboración de tortillas provee valores de pH más ácido en relación las variedades Chaucha Roja y Yema de Huevo. Además, el enriquecimiento con el 15% de pasta de quinua en las tortillas provee valor de pH más ácido en relación los porcentajes de 20% y 25% de pasta de quinua.

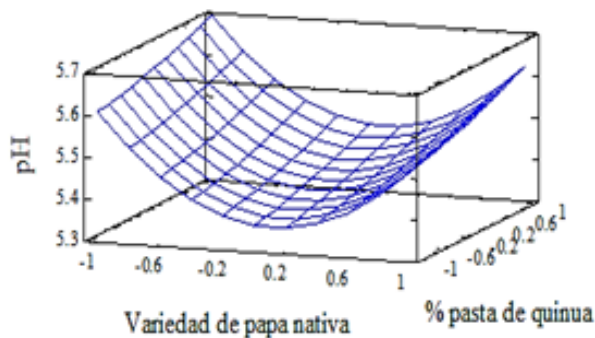


Figura 2. Superficie de respuesta estimada del valor de pH.

### Ácido Ascórbico (Vitamina C)

Según la Figura 3 se concluyó que la variedad de papa nativa que proporciona un mayor contenido de vitamina C a las tortillas es la Yema de Huevo, en relación con las variedades Leona Negra y Chaucha Roja. Además, se concluyó que la adición de 15% de pasta de quinua no modifica significativamente el contenido de vitamina C en las tortillas, en relación con la adición del 20% y 25% de pasta de quinua que si lo hacen.

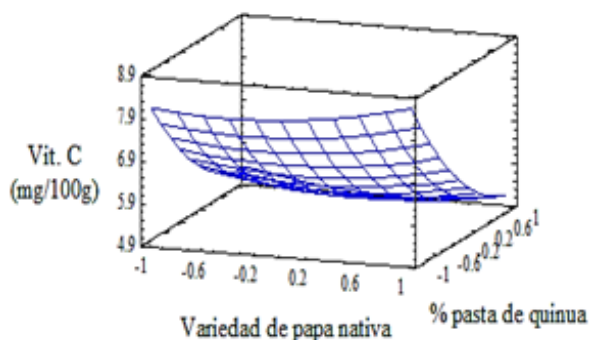


Figura 3. Superficie de respuesta estimada de los valores de Vitamina C.

## ANÁLISIS SENSORIAL

### Aceptabilidad

Se llegó a la conclusión que el tratamiento a2b2 que corresponde a la utilización de la papa Yema de Huevo enriquecida con el 25% de pasta de quinua, según la valoración de la aceptabilidad, es el tratamiento que más gustó a los catadores. En la figura 3 se representó la calificación promedio más alta con respecto a los otros tratamientos de papa nativa enriquecida con pasta de quinua.

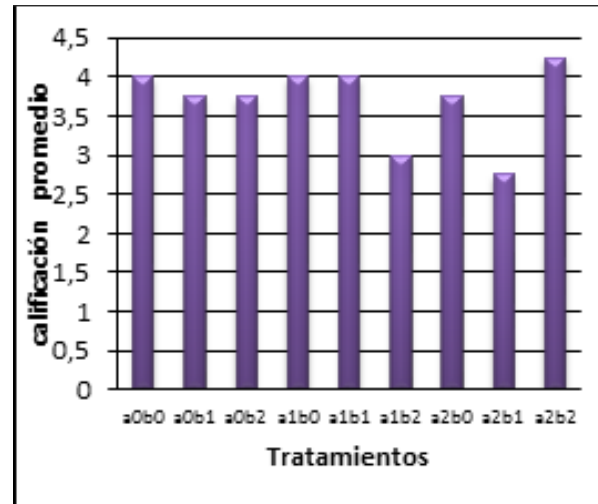


Figura 4. Diagrama de barras, en base a la calificación del atributo aceptabilidad

### Análisis de los componentes principales

El análisis de datos multivariante se basa en estudiar cada variable aisladamente y además las relaciones entre ellas. La técnica de componentes principales es debida a Hotelling. (Peña D., 2002)

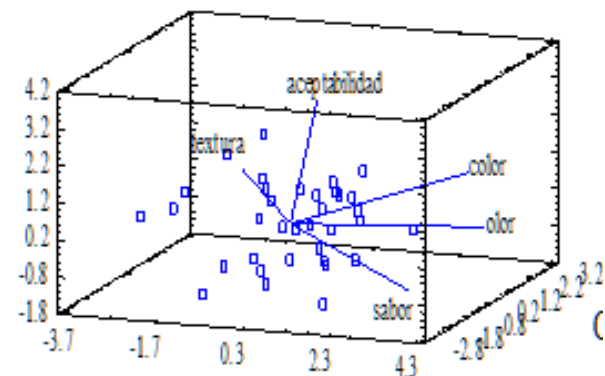


Figura 5. Diagrama Biplot de los componentes.

Se estableció según la figura 4 que la calificación de aceptabilidad del producto se ve influenciada en mayor parte por el componente 2 y 3 que representan al color y olor de la tortilla; en otras palabras, los catadores diferenciaron a los productos principalmente por el color y olor individual de los diferentes tratamientos.

### VIDA UTIL

Considerando la ecuación 1, se tiene:

$$\ln C = 0.0094 t + 3.7291$$

$$t = \frac{\ln(500) - 3.7291}{0.0094}$$

$$t = 264.414 \text{ horas} \quad h = 11.01 \text{ días}$$

Alternadamente, se estimó la vida útil en función de la pérdida de humedad del producto en almacenamiento. Cabe señalar que durante la experimentación se estableció una variación de humedad de las tortillas de papa nativa refrigeradas a 4°C, lo cual produjo cambios en la presentación del producto tanto crudo como frito: las tortillas crudas empezaron a secarse en la parte superior, creándose costras, así como cambios en la textura; en la tortilla frita se presentaron cambios en el olor y sabor. A partir de la 168 horas (7 días), los catadores identifican en la tortilla frita variaciones de olor y sabor, y en la tortilla cruda una mayor dureza asociada a la pérdida de humedad desde 75.0% hasta 72,6%, llegando a las 288 horas (10 días) hasta un 71,4%, por lo que se estima la vida útil del producto en 10 días.

### RENDIMIENTO Y COSTO DEL PRODUCTO

Se realizó el balance de materiales para la elaboración de pasta de quinua en base a 8 kg de quinua y el balance de materiales para la elaboración de tortillas de papa nativa enriquecidas con pasta de quinua, consideró un ingreso de 100 Kg de papa nativa Yema de Huevo, y se tiene como resultado un peso neto aproximado de 88.27 kg de tortillas de papa empacadas, que corresponde a un rendimiento en la producción de 88.27%. El costo del producto se determinó en base a una producción de 367 bandejas diarias de 6 unidades cada una, con un peso neto aproximado de 240g por bandeja, de \$ 0,93 USD, considerando una utilidad del 30% y 5% de imprevistos.

### CONCLUSIONES

Se estableció un proceso tecnológico de elaboración de tortillas de papa nativa utilizando las variedades de papa (Chaucha Roja, Leona Negra y Yema de Huevo) y enriquecidas con pasta de quinua (15, 20, 25%), el cual consiste de dos fases: En la primera se estableció el proceso para la elaboración de la pasta de quinua (*Chenopodium quinoa Willd*); y en la segunda, la tecnología para la elaboración de la tortilla de papa nativa. Además, en la elaboración de tortillas de papas nativas se utilizó: 0.1% de ácido cítrico, 0.1% de sorbato de potasio y 2% de cloruro de sodio (sal de mesa).

Se evaluó la calidad sensorial de las tortillas de papa nativa (Chaucha Roja Leona Negra y Yema de Huevo) enriquecidas con pasta de quinua (15, 20 y 25%), se observó en el mejor tratamiento que corresponde a una incorporación del 25% de pasta de pasta de quinua, calificaciones del producto: color = 4.0 (agradable), olor = 3.8 (agradable), sabor = 3.8 (agradable), textura = 4.0 (suave) y aceptabilidad = 4.3 (gusta poco).

Se evaluó el valor nutricional, a través del análisis proximal, del mejor tratamiento (papa Yema de Huevo - 25% pasta de quinua) y de la muestra patrón, papa (100% Yema de Huevo), donde se observó un incremento en

lo referente a proteína, de 1.76% en la muestra patrón, hasta un 2.46 % para el mejor tratamiento.

Se determinó que el tiempo de vida útil del mejor tratamiento a2b2 (papa Yema de Huevo y 25% de pasta de quinua) en almacenamiento bajo refrigeración (4°C) de 11 días.

El costo unitario de producción de una bandeja de tortilla precocida de papa nativa (Yema de huevo) enriquecida con pasta de quinua (25%) en la presentación de 240g de 6 unidades es de \$ 0.69 USD y el precio de venta al público de \$ 0.93 USD, considerando una utilidad del 30%.

### RECOMENDACIONES

Evaluar la calidad de proteína, en términos de aminoácidos, de las tortillas de papa nativa enriquecida con pasta de quinua.

Realizar una caracterización física, química, morfológica y sensorial de las variedades de papa nativa cultivadas en la Sierra ecuatoriana, como fundamento para la creación de una norma técnica.

### BIBLIOGRAFÍA

- BORBA N. (2008). "La papa un alimento básico", RAP – AL, Uruguay, fecha de publicación: Agosto 2008, fecha de consulta: 17/03/2011, Disponible en la página de Red de Acción en Plaguicidas y sus Alternativas para América Latina: [www.rapaluruaguay.org/transgenicos/Papa/Papa.pdf](http://www.rapaluruaguay.org/transgenicos/Papa/Papa.pdf)
- CAYCHO J., ARIAS A., OSWALD A., ESPRELLA R., RIVERA A., YUMISACA F. y ANDRADE J. (2009). "Tecnologías sostenibles y su uso en la producción de papa en la región Altoandina", Revista Latinoamericana de la papa, Fecha de Consulta: 16/03/2011, Disponible en: <http://www.bvcooperacion.pe/biblioteca/bitstream/123456789/7686/1/BVCI0006769.pdf>
- CAZAR P., ALAVA H. y ROMERO M., (2004). "Producción y comercialización de quinua en el Ecuador" Fecha de consulta: 10/03/2011. Disponible en la página web del Repositorio de la Escuela Superior Politécnica del Litoral: <http://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/712/1/1312.pdf>
- CRS, CIP y FAO (2003). "Estudio de quinua", Catholic Relief Services - CRS, el Centro Internacional de la Papa CIP y la FAO. Cproandinos. Fecha de consulta: 10/03/2011. Disponible en la página de Infoagro IICA: <http://infoagro.net/shared/docs/a5/cproandinos5.PDF>
- EL CIUDADANO (2010). "Importancia de las papas nativas". Fecha de publicación: 17/03/2010, Fecha de consulta 09/03/2011. Disponible en la página web del Ciudadano: [http://www.elciudadano.gov.ec/index.php?option=com\\_content&view=article&id=10519:importancia-de-las-papas-nativas-se-tratará-en-congreso-internacional&catid=1:actualidad&Itemid=42](http://www.elciudadano.gov.ec/index.php?option=com_content&view=article&id=10519:importancia-de-las-papas-nativas-se-tratará-en-congreso-internacional&catid=1:actualidad&Itemid=42)
- MARTÍNEZ F. (2009). "Caracterización morfológica e inventario de conocimientos colectivos de variedades de papas nativas (*Solanum Tuberosum*) en la provincia de Chimborazo", Fecha de consulta: 17/03/2011. Disponible en la página del repositorio de datos de la Escuela Superior Politécnica del Chimborazo: <http://dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/337/1/13T0630MARTINEZ%20FRE-DY.pdf>
- MONTEROS, C., CUESTA, X., JIMÉNEZ J., LÓPEZ, G. (2005). "Las papas nativas en el Ecuador". Quito- Ecuador, Primera Edición, Programa Nacional de Raíces y Tubérculo Rubro Papa/FORTIPAPA. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), 32 p.
- PEÑA D. (2002). "Análisis de datos multivariantes". Madrid - España, Primera Edición, McGraw Hill, 515 p.

**ESTUDIO DEL EFECTO DE UN RECUBRIMIENTO COMESTIBLE  
Y SU INCIDENCIA EN EL TIEMPO DE VIDA ÚTIL DE “UVILLA”  
(*Physalis peruviana L.*)**

**STUDY OF THE EFFECT OF A EDIBLE COATING AND ITS  
INCIDENCE IN THE TIME OF SHELF-LIFE OF “UVILLA”  
(*Physalis peruviana L.*)**

Villacís Jhullana; Alvarez Fernando; Alvarez Mario; Silva Mónica

Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos. Unidad Operativa de Investigación en Tecnología de Alimentos. Campus Académico Huachi, Av. Los Chasquis y Río Payamino, Ambato – Ecuador. Casilla 18-01-0334  
e-mail: julyf\_va@hotmail.es

**RESUMEN**

La investigación consistió en evaluar el efecto del tratamiento UV-C y el recubrimiento comestible en uvillas (*Physalis peruviana L.*) cultivadas orgánicamente. Las frutas fueron retiradas su cáliz, lavadas, expuesta a radiación UV-C durante 7.50 minutos y recubiertas por películas comestibles en base a dos formulaciones: 1) glicerol, gelatina, ácido cítrico, tween 20; 2) glucosa, sacarosa, gelatina, ácido cítrico con dos tiempos de inmersión 5 y 10 min, respectivamente. Se realizaron los siguientes análisis en las uvillas sin y con tratamiento: sólidos solubles, acidez, pH, textura, humedad, vitamina C, aerobios mesófilos, coliformes totales, mohos - levaduras y análisis sensorial. Los resultados determinaron que el proceso de radiación y recubrimiento no afecta el porcentaje de acidez, pero si la reducción de microorganismos, encontrándose en los tratamientos ausencia de mohos-levaduras y coliformes excepto en las uvillas sin tratamiento, denominado control; existe diferencia significativa en color y aroma en lo referente a análisis sensorial. Los mejores tratamientos fueron: A<sub>1</sub> (3% de gelatina + 0.25% de ácido cítrico +0.6% tween +1% de glicerol; 5 min) y A<sub>1</sub> (3% de gelatina+0.25% de ácido cítrico+30% de glucosa+ 70% de sacarosa; 10 min). Las uvillas de los dos mejores tratamientos fueron almacenados en envases perforados de polietileno tereftalato a temperatura de 4°C, en los cuales se determinó que el tiempo de vida útil fue 25 días de acuerdo a aerobios mesófilos y textura para el tratamiento A<sub>1</sub> en relación con el tratamiento control que fue 14 días.

Palabras Claves: Uvilla, tratamiento UV-C, recubrimiento comestible, tiempo de vida útil.

**ABSTRACT**

The purpose of this research is to evaluate the effect of radiation shortwave UV-C and edible coating in golden berries (*Physalis peruviana L.*) organically grown. Fruits were removed calyx, washed, exposed to UV-C radiation for 7.50 minutes and coated with edible films based on two formulations: 1) glycerol, jelly, citric acid, tween 20, 2) glucose, sucrose, jelly, citric acid, with two times of 5 and 10 min immersion respectively. Analysis was performed with and without the treatment golden berries: soluble solids, acidity, pH, texture, moisture, vitamin C, mesophilic aerobic, coliforms, yeast-mold and sensory tests. The results determined that the process of radiation and coating does not affect the percentage of acidity, but if reducing microorganisms, found in the absence of treatment yeast-mold and coliforms except in golden berries untreated, called control, there is significant difference color and aroma with respect to sensory analysis. The best results were: A<sub>1</sub> (3% de jelly + 0.25% de citric acid + 0.6% tween + 1% de glycerol; 5 min) and A<sub>1</sub> (3% de jelly + 0.25% de citric acid + 30% de glucose + 70% de sucrose; 10 min). Golden berries of the best two treatments were stored in perforated containers of polyethylene terephthalate at temperature of 4°C, where it was determined that the shelf life was 25 days according to aerobic mesophilic and texture for treatment A<sub>1</sub> relative to the control treatment was 14 days.

Keywords: Golden berry, treatment UV-C, edible coating, shelf life.

## INTRODUCCION

La uvilla también conocida como uchuva (*Physalis peruviana* L.); pertenece a la familia de las Solanáceas y al género *Physalis*. Se caracterizan porque sus frutos están encerrados dentro de un cáliz o capacho; es originaria de los Andes suramericanos y se caracteriza por tener un fruto azucarado con un alto contenido de vitaminas A y de ácido ascórbico, además de hierro y fósforo. (Perfetti et al., 2000)

El cultivo de la uvilla se ha extendido en la sierra como consecuencia de las oportunidades de exportación existentes, principalmente en Pichincha y Tungurahua. (Ordóñez, 2013)

Tras la recolección las frutas sufren un proceso acelerado de envejecimiento y degradación, caracterizado por un empeoramiento del estado físico (deshidratación, arrugamiento, cambio de color) unido a una pérdida de propiedades sensoriales y nutricionales, debido al metabolismo del propio organismo. El problema del deterioro se debe a que las frutas son tejidos vivos que están sujetos a continuos cambios después de ser cosechados.

En efecto las frutas de IV gama surgen como respuesta a la demanda del consumidor de productos frescos, sanos, de calidad y fácil preparación, conservando sus características originales y sensoriales. La corta vida útil de las frutas frescas pre envasadas ha conducido a la búsqueda de alternativas que mantenga la calidad del producto durante más tiempo (Nanesmy, 2005).

Las películas comestibles cuando recubren las frutas crean una atmósfera modificada en el interior de ellas que reduce la velocidad de respiración y por tanto retrasa el proceso de senescencia del producto. Así, la barrera artificial semipermeable que constituye una cobertura polimérica, contribuye a la extensión de la vida útil del producto al reducir la migración de humedad y de solutos, el intercambio de gases, la respiración, y otras reacciones oxidativas, disminuyendo así los desórdenes fisiológicos. (Rojas et al., 2007)

La irradiación ultravioleta de onda corta (UV-C), es una tecnología alternativa a la esterilización química utilizada para reducir el crecimiento de microorganismos en alimentos (González et al, 2004). Al aplicar radiación UV en frutas y vegetales, adicionalmente a la reducción de la carga microbiana inicial en la superficie, se produce un fenómeno denominado efecto hormético (Stevens et al., 1997, 1999). Dicho efecto puede mejorar la resistencia al ataque de ciertos microorganismos como mohos y levaduras, ya que puede estimular a producción de fenilalanina amoniaco-liase que induce la formación de compuestos enólicos (fitoalexinas) y tóxicos para ellos. (Domínguez y Parzanese, 2012)

La investigación establecerá el efecto en la aplicación de los diferentes niveles de recubrimientos comestibles previa radiación de onda corta UV-C en la conservación de la calidad nutritiva, sensorial y vida útil de frutos de uvilla, mediante la evaluación físico-química, microbiológica y sensorial.

## METODOLOGÍA Y MATERIALES

Las uvillas orgánicas (*Physalis peruviana* L.) procedieron de un cultivo tecnificado ubicado en el cantón Pillaro en la provincia de Tungurahua con un nivel de madurez seis de acuerdo a la Norma Técnica ICONTEC 4580. Se procedió a retirar el cáliz y seleccionar las frutas bajo determinadas condiciones: uvilla entera, fresca, sana, en buen estado y exentos de materiales extraños.

Seguidamente se pesó y lavó la uvilla con agua durante 1 minuto con la finalidad de eliminar posibles restos de tierra, fitosanitarios, abonos, bacterias o virus e, incluso, insectos.

### Desinfección de uvilla con UV-C

Se empleó un equipo de radiación ultravioleta de onda corta UV-C, el cual consiste en una cámara de madera de 60 \* 60 \* 30 cm, recubierta con paredes de aluminio. En su interior se encuentra dos lámparas de UV-C de mercurio de 40 cm y de 15 W de potencia cada una; con bandejas de 60 \* 30 cm ubicadas a 30cm de las lámparas. La uvilla fue expuesta a radiación durante 7.50 minutos.

### Recubrimiento comestible

#### Formulación 1:

Se elaboró un recubrimiento a base de gelatina en diferentes porcentajes (3 y 5% en una solución de ácido cítrico 0.25%), se adicionó tween 20 (polisorbato) al 0.6% de uso en alimentos y 1% de glicerol.

#### Formulación 2:

Se elaboró un recubrimiento a base de gelatina en diferentes porcentajes (3 y 5 % en una solución de ácido cítrico 0.25%), se adicionó 30% de glucosa y 70% de sacarosa.

La hidratación de la gelatina se realizó a una temperatura de 40°C con agitación constante, para obtener un recubrimiento homogéneo y transparente.

La fruta fue recubierta con las películas comestibles por técnica de inmersión a una temperatura de 25°C por tiempos de 5 y 10 minutos.

Tabla 1. Tratamientos aplicados con recubrimiento comestible en uvilla orgánica (*Physalis peruviana* L.).

Tratamiento	Cód.	Descripción
Sin Tratamiento	A <sub>0</sub>	Sin Recubrimiento comestible (Control)
Tratamiento 1	A <sub>1</sub>	3% de gelatina+0.25% de ácido cítrico+0.6% tween +1% de glicerol; 5 min
Tratamiento 2	A <sub>2</sub>	3% de gelatina+0.25% de ácido cítrico+0.6% tween +1% de glicerol; 10 min
Tratamiento 3	A <sub>3</sub>	5% de gelatina+0.25% de ácido cítrico+0.6% tween +1% de glicerol; 5 min
Tratamiento 4	A <sub>4</sub>	5% de gelatina+0.25% de ácido cítrico+0.6% tween +1% de glicerol; 10 min
Tratamiento 5	A <sub>5</sub>	3% de gelatina+0.25% de ácido cítrico+30% de glucosa+ 70% de sacarosa; 5 min
Tratamiento 6	A <sub>6</sub>	3% de gelatina+0.25% de ácido cítrico+30% de glucosa+ 70% de sacarosa; 10 min
Tratamiento 7	A <sub>7</sub>	5% de gelatina+0.25% de ácido cítrico+30% de glucosa+ 70% de sacarosa; 5 min
Tratamiento 8	A <sub>8</sub>	5% de gelatina+0.25% de ácido cítrico+30% de glucosa+ 70% de sacarosa; 10 min

Elaborado por: Jhullana Villacis A., 2014

En la Tabla 1, se indica los diferentes tratamientos de las uvillas: A<sub>0</sub> fueron aquellas frutas que no estuvieron expuestas a la radiación UV-C, ni recubiertas con películas comestibles, denominado control y los tratamientos A<sub>1</sub> hasta A<sub>8</sub> fueron las frutas que tuvieron la exposición con radiación UV-C y recubrimiento comestible.

El secado de las uvillas recubiertas con películas comestibles se efectuó en una estufa con ventilación, a una temperatura de 20°C por 40 minutos, para posteriormente envasar el producto en empaques plásticos perforados de polietileno tereftalato y almacenar a 4°C.

#### Análisis físico-químicos

En las uvillas con tratamiento y el control se realizaron análisis: sólidos solubles (INEN 380), pH (INEN 389), acidez titulable (INEN 381), vitamina C (Método AOAC 923.09 1980), índice de madurez, humedad (NCh 841 of 71) y textura (Texturómetro Brookfield ProCT3) sonda TA39.

#### Análisis microbiológicos

Se determinaron los siguientes análisis microbiológicos: aerobios mesófilos (INEN 1529-5:06), mohos y levaduras (INEN 1529-10:98), coliformes totales (INEN 1529-7:90), *Staphylococcus aureus* (Método AOAC 987.09).

#### Análisis sensorial

Los atributos analizados en uvilla tratada y el control fueron: color, aroma, sabor, textura y aceptabilidad.

#### Tiempo de vida útil

Se determinó el tiempo de vida útil de los mejores tratamientos en base a: textura, aerobios mesófilos, aplicando cinética de primer orden, ecuación 1.

#### Ecuación de cinética de primer orden

$$\ln C = Kt + \ln C_0 \quad (1)$$

Donde:

C= Parámetro microbiológico escogido como límite de tiempo de vida útil.

C<sub>0</sub>= Concentración inicial

k = Constante de crecimiento microbiano

t = Tiempo de reacción

Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente en Statgraphics plus; bajo el diseño experimental de un solo factor que corresponden a recubrimiento comestible a un nivel de significancia de 5%.

## RESULTADOS Y DISCUSION

#### Análisis Físico-químicos

Sólidos Solubles (°Brix).- La uvilla sin tratamiento presentó un valor de 15°Brix, la tecnología utilizada incrementó hasta 16.2°Brix en el tratamiento A<sub>8</sub> (5% de gelatina+0.25% de ácido cítrico+30% de glucosa+70% de sacarosa; 10 min), además el análisis de varianza demostró diferencia significativa entre las formulaciones del recubrimiento comestible.

pH.- Se determinó que el pH más bajo se presenta en

el tratamiento A<sub>1</sub> con un valor 3.91 y el tratamiento con pH más alto es A<sub>5</sub> con un valor 4.1.

**Acidez titulable.-** El análisis de varianza reporta que no existe diferencia significativa en la acidez de la uvilla recubierta con películas comestibles, y el rango de acidez oscila entre 1.56 a 1.91 % de ácido cítrico.

**Vitamina C.-** La uvilla sin tratamiento tuvo 53.53 mg de vitamina C/100g fruta, la tecnología utilizada disminuyó la cantidad de vitamina C, el tratamiento A<sub>3</sub> reporta 52.81 mg de Vitamina C/100g y el tratamiento A<sub>4</sub> reporta 48.91mg de vitamina C, sin embargo existe diferencia significativamente en relación a este parámetro.

**Índice de madurez.-** En el tratamiento control el índice de madurez de la fruta fue 8.75 °Brix / % ácido cítrico. Acorde a la Norma ICONTEC el índice de madurez obtenido se encuentra dentro del límite del nivel de madurez seis. Existe una variación desde 8.56 en el tratamiento A<sub>8</sub> hasta 10.56 °Brix / % ácido cítrico en el tratamiento A<sub>5</sub>.

El análisis de varianza indica que existe diferencia significativa entre los tratamientos.

**Humedad.-** El porcentaje de humedad de la uvilla sin tratamiento fue 81.25 %. Los tratamientos con menor porcentaje de humedad fueron A<sub>5</sub> con 79.73% y tratamiento A<sub>1</sub> con 80.33%, debido al secado durante 40 min, existiendo diferencia significativa entre los tratamientos.

**Textura.-** Los valores reportados del tratamiento A<sub>8</sub> y tratamiento A<sub>6</sub> son 476 y 453gf respectivamente, se observa que las uvillas tratadas tienen una disminución de dureza en comparación a las uvillas no tratadas 492gf, esto puede deberse a la radiación UV-C y al recubrimiento.

#### Análisis microbiológico

Según la norma microbiológica para alimentos listos para consumir (RD 72/1998, BOE 4/2/98) la presencia máxima de aerobios mesófilos es de 10<sup>4</sup>, la máxima para coliformes es 20, para mohos y levaduras 300 UFC/g. Las uvillas con recubrimientos comestibles se encuentran dentro de los parámetros microbiológicos.

Tabla 2. Valores promedios de porcentaje de reducción de microorganismos del mejor tratamiento A<sub>1</sub>

Parámetro microbiológico	Lavada	UV-C	Película comestible A1
Aerobios mesófilos	89	97	96
Mohos y levaduras	89	100	100
Coliformes	84	100	100
<i>Staphylococcus aureus</i>	95	100	100

Elaborado por: Jhullana Villacís A., 2014

En la Tabla 2 se observa que la carga microbiana luego de la aplicación de radiación UV-C y recubrimiento



disminuye en comparación con el lavado. Las uvillas con recubrimiento comestible en el mejor tratamiento A1 tiene una reducción de 96% en aerobios mesófilos, 100% en mohos y levaduras, coliformes totales y *Staphylococcus aureus*.

En mohos-levaduras y en coliformes totales se encontró 100% de inactivación de microorganismos, esto se debe al tratamiento UV-C que se aplicó a la fruta. Alzamora (2007), señala que la irradiación ultravioleta de onda corta UV-C es una tecnología alternativa para inactivar microorganismos en la superficie de los alimentos, causando daño al ADN de los mismos, generando así mutaciones que bloquean la replicación celular provocando la muerte microbiana.

### Análisis sensorial

De acuerdo al análisis sensorial realizado en consumidores de uvilla, los catadores no identificaron dife-

rencias en sabor, textura, y aceptabilidad. En cuanto a color y aroma los mejores tratamientos se asemejan al control. Las uvillas con recubrimientos comestibles dan mayor brillo, buen aroma, mayor dulzor, sabor y textura. La mayor aceptabilidad por parte de los catadores fue para los tratamiento A<sub>1</sub> (3% gelatina + 0.25% ácido cítrico + 0.6% tween + 1% glicerol por un tiempo de 5 minutos.) y tratamiento A<sub>6</sub> (3% gelatina + 0.25% ácido cítrico + 30% glucosa + 70% sacarosa por un tiempo de 10 min).

En la Tabla 3 se presenta un resumen de los parámetros analizados en uvilla durante la investigación, y se determinó que existe diferencia con una probabilidad del 5%.

### Tiempo de vida útil

Se empleó la ecuación 1 de cinética de primer orden en lo referente a aerobios mesófilos Gráfico 1.

Tabla 3. Análisis físico-químicos, microbiológicos y sensoriales en uvilla sin y con recubrimiento.

Parámetros	Control	Tratamientos							
		A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	A <sub>4</sub>	A <sub>5</sub>	A <sub>6</sub>	A <sub>7</sub>	A <sub>8</sub>
°Brix	15,04d	15,17d	14,83d	15,64bc	15,22cd	15,64bc	16,13a	16,00ab	16,22a
pH	4,01ab	3,91a	3,95ab	4,00ab	4,02ab	4,11b	4,03ab	3,95ab	3,99ab
Porcentaje de acidez (% ácido cítrico)	1,77a	1,77a	1,72a	1,69a	1,75a	1,55a	1,75a	1,87a	1,90a
Vitamina C (mg Vitamina C/100g)	53,53a	51,21bcde	51,89abcd	52,81ab	48,91f	51,35abc	50,75cde	50,29def	49,60ef
Índice de madurez (°Brix / % ácido cítrico)	8,53a	8,59a	8,70ab	9,35ab	8,78ab	10,57b	9,35ab	8,81ab	8,55a
Porcentaje de Humedad	81,25a	80,33ab	80,34ab	81,14ab	80,78ab	79,73b	81,13ab	80,83ab	80,64ab
Textura (dureza, gf)	492a	476a	369b	418ab	468a	459a	453a	442ab	430ab
Porcentaje de reducción de aerobios mesófilos	0b	95,66a	92,44a	88,00a	91,33a	92,33a	96,77a	98,99a	96,66a
Mohos y levaduras (UFC/g)	20	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Coliformes (UFC/g)	20	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Atributo Color	2,5b	2,61ab	2,64ab	2,80ab	3,02ab	3,19ab	3,67a	3,48ab	3,70a
Atributo Aroma	3,71a	3,67a	3,60a	2,28b	3,70a	3,86a	3,86a	3,93a	3,35a
Atributo Sabor	3,64a	4,04a	4,04a	4,01a	3,56a	4,33a	4,07a	4,17a	4,04a
Atributo Textura	3,21a	3,24a	3,17a	3,37a	3,37a	3,66a	3,3a	3,85a	4,01a
Aceptabilidad	3,85a	4,30a	4,21a	3,63a	3,66a	4,50a	4,08a	4,11a	4,34a

\*Letras diferentes en una misma fila indica diferencia significativa ( $\alpha < 0.05$ )

Elaborado por: Jhullana Villacís A., 2014

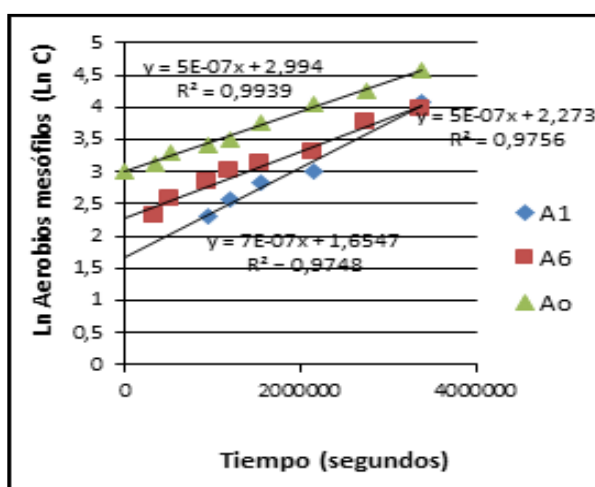


Gráfico 1. Cinética de desarrollo de aerobios mesófilos de uvillas recubiertas con películas comestibles.

Elaborado por: Jhullana Villacís A., 2014

Para el tiempo de vida útil se trabajó con los tratamientos: A<sub>1</sub> (3% gelatina + 0.25% ácido cítrico + 0.6% tween + 1% glicerol por un tiempo de 5 minutos.) y tratamiento A<sub>6</sub> (3% gelatina + 0.25% ácido cítrico + 30% glucosa + 70% sacarosa por un tiempo de 10 min.), de acuerdo a los siguientes parámetros:

Textura.- Uno de los aspectos que identifican la frescura de los alimentos es la textura. Cabe mencionar que la uvilla sin tratamiento presentó pérdida de dureza y ablandamiento en un tiempo de 14 días, siendo su tiempo de vida útil.

En la Tabla 4 se reporta la variación de la textura de las uvillas durante el tiempo de almacenamiento, observándose que la textura disminuye conforme pasa el tiempo.

Tabla 4. Dureza de uvillas recubiertas con películas comestibles du-



rante el almacenamiento en refrigeración.

Tiempo (s)	Tiempo (días)	Dureza (gf)		
		A <sub>0</sub>	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>
0	0	527	501	561
345600	4	365	495	502
518400	6	415	493	467
950400	11	503	488	429
1209600	14	409	475	409
1555200	18	453	470	385
2160000	25	309	423	328
2764800	32	333	281	264

Elaborado por: Jhullana Villacís A., 2014

La vida útil de los tratamientos: control, A<sub>0</sub>, A<sub>1</sub> y A<sub>6</sub> almacenados en refrigeración a 4°C, se la determinó mediante aerobios mesófilos según la ecuación (1) de cinética de primer orden con un tiempo de 23, 38 y 39 días, respectivamente.

Sin embargo este parámetro no es suficiente pues la textura es un indicador de finalización de la vida útil del producto. El valor de textura aceptable (dureza) es 410gf, donde el producto almacenado aún conservaba características sensoriales aceptables. La uvilla sin tratamiento presentó pérdida de dureza y ablandamiento en un tiempo de 14 días. Para el tratamiento A<sub>1</sub> el tiempo de vida útil fue 25 días, en los cuales comenzaron a presentar defectos en textura; en el tratamiento A<sub>6</sub> fue 14 días, tiempo que presentó pérdida de dureza, lo cual significa que el producto sensorialmente está deteriorado.

## CONCLUSIONES

La desinfección con radiación de onda corta UV-C, reduce el crecimiento de microorganismos hasta un 96% en la superficie de la uvilla del mejor tratamiento A1 sin alterar su calidad sensorial: sabor, textura y aceptabilidad.

En el tratamiento control durante el almacenamiento se reduce la vitamina C de 53.73 a 43.4 mg de vitamina C / 100g. Al aplicar UV-C más recubrimiento comestibles en el tratamiento A1 disminuye la vitamina C desde 51.67 a 35.13 mg de vitamina C/ 100 g.

En la evaluación sensorial del mejor tratamiento A<sub>1</sub>: gelatina 3%, glicerol 1%, tween 20 0.6%, ácido cítrico 0.25%, durante un tiempo de inmersión de 5 minutos,

se evidenció la aceptabilidad del producto en color: anaranjado; aroma: agrada; sabor: gusta; textura: ni dura ni suave y aceptabilidad: gusta; actuando el glicerol como plastificante, y aportando brillo a la fruta.

El empleo de recubrimiento comestible a base de gelatina, glicerol, ácido cítrico y tween 20, evita la pérdida de textura y reduce el deterioro por la presencia de microorganismos.

En los tratamientos de uvilla orgánica con UV-C más recubrimientos comestibles se reduce hasta el 99% de aerobios mesófilos; y ausencia de mohos-levaduras, coliformes y *Staphylococcus aureus*.

Se determinó el tiempo de vida útil de la uvilla en el mejor tratamiento A<sub>1</sub> (3% de gelatina+0.25% de ácido cítrico+0.6% tween+1% de glicerol; 5 min) de 25 días de acuerdo a textura, y para el tratamiento control 14 días, refrigerados a 4°C en envases de polietileno tereftalato con perforaciones.

## REFERENCIAS

- Alzamora, S. 2007. Aplicaciones de la luz ultravioleta en la conservación de alimentos. Universidad de Buenos Aires, Tercer Simposio Internacional de Innovación y Desarrollo de Alimentos, Argentina.
- Domínguez L. y Parzanese M. 2012. Tecnologías para la Industria Alimentaria - Luz Ultravioleta en la Conservación De Alimentos. Disponible en: [http://www.alimentosargentinos.gov.ar/contenido/sectores/tecnologia/Ficha\\_02\\_Ultravioleta.pdf](http://www.alimentosargentinos.gov.ar/contenido/sectores/tecnologia/Ficha_02_Ultravioleta.pdf)
- González, Wang C. y Buta G. (2004). UV-C irradiation reduces breakdown and chilling injury of peaches during cold storage. *J SciFoodAgric.* 84: 415-422.
- Nanesmy, A. 2005. Actualidad de Frutas De IV Gama. Disponible en: [http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf\\_Hort%5CHort\\_2005\\_188\\_41\\_53.pdf](http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf_Hort%5CHort_2005_188_41_53.pdf)
- Ordoñez, A. 2013. Boletín Mensual de Comercio Exterior - Ministerio de Comercio Exterior. Instituto de promoción de exportaciones e inversiones – PRO ECUADOR. Código ISSN 1390-812X.
- Perfetti, Fonseca, Rubio y Alvarez et al. 2000. Perfil del producto Uchuva N° 13. Editor Corporación Colombia Internacional. Disponible en: <http://conectarural.org/sitio/sites/default/files/documentos/UCHUVA-13.pdf>
- Rojas Graü M., Tapia M., Rodríguez F., Carmona A., Martín Belloso O. 2006. Alginate and gellan based edible coatings as support of antibrowning agents applied on fresh-cut Fuji apple. *Food Hydrocolloids*, in press.

# EVALUACIÓN DEL SELLADO AL VACÍO EN FUNDAS DE POLIETILENO DE ALTA DENSIDAD SOBRE LA VIDA DE ANAQUEL DE QUESOS FRESCOS Y SEMIDUROS

## EVALUATION OF VACUUM SEALED IN HIGH DENSITY POLYETHYLENE BAGS ON SHELF LIFE OF FRESH AND SEMI-HARD CHEESES

German, María Fernanda y Alvarado, Juan de Dios

Cooperativa de Producción Agropecuaria “El Salinerito”, Salinas de Guaranda-Ecuador  
Calle José Dubachs S/N y Samilahua, Telefax ++593 03 2390009, E-Mail: cooperativa@salinerito.com  
Universidad Técnica de Ambato (Uta). Facultad De Ciencia e Ingeniería en Alimentos (Fcial)  
Ambato-Ecuador, Ciudadela Huachi, Casilla 18-01-0334. e-mail: fcial@uta.edu.ec

### RESUMEN

El presente trabajo tiene como propósito la evaluación del efecto del empaqueo y sellado al vacío en fundas de polietileno de alta densidad sobre la vida de anaquel de quesos frescos y semiduros elaborados en la quesera “El Salinerito”. Se planteó un diseño experimental A\*B\*C cuyos factores de estudio fueron la variedad de queso (fresco y semiduro), tipo de empaqueo (empaqueo con polietileno de alta densidad sellado con y sin vacío) y la temperatura de almacenamiento (5°C, 12°C y 20°C). La experimentación se llevó a cabo durante 22 días; se trabajó con un tratamiento original y una réplica por duplicado para cada muestra. Se determinó valores de pH, pérdida de peso, porcentaje de humedad y análisis microbiológico para recuento de aerobios totales utilizando una dilución  $10^{-3}$ , los análisis se realizaron cada 48 horas.

Para los cálculos de vida útil, se utilizaron ecuaciones lineales que relacionan el porcentaje de la pérdida de peso y humedad con el tiempo de almacenamiento en el cual los quesos conservan sus características físicas y sensoriales. Para el caso del recuento total de aerobios se utilizaron ecuaciones de tipo polinómica.

Se determinó como mejor tratamiento T7 (queso semiduro empacado con polietileno de alta densidad sellado al vacío a refrigeración 5°C), obteniendo un tiempo de vida de anaquel de 114 días para porcentaje de pérdida de peso; 36 días para porcentaje de humedad y 5 días para recuento total de aerobios con un coeficiente de correlación de ( $r = 0,93$ ), ( $r = 0,99$ ), ( $r = 0,99$ ), respectivamente. Mediante un análisis crítico se concluye que los valores obtenidos con porcentaje de pérdida de peso son los más significativos debido a que este análisis permite identificar de mejor manera la funcionalidad que el empaque tiene en los quesos.

Palabras clave: Vida de anaquel, queso, polietileno de alta densidad, vacío, almacenamiento.

### SUMMARY

This paper aims to evaluate the effect of vacuum packed and sealed in bags of HDPE in the shelf life of fresh cheeses and semi-hard cheese produced in the “El Salinerito”. Experimental design A \* B \* C was used the study factors were the variety of cheese (fresh and semi-hard), type of packaging (packed with high-density polyethylene with and without vacuum sealed) and storage temperature (5°C , 12°C and 20°C). The experimentation was carried out for 22 days, we worked with an original treatment and a replica in duplicate for each sample, was determined pH values, weight loss, moisture and microbiological analysis for total aerobic count using a dilution  $10^{-3}$ , analyzes were performed every 48 hours.

To calculate life-time, we used linear equations relating the percentage weight loss of moisture over time and storage in which the cheese retain their physical and sensory characteristics. In the case of the total count of aerobic type used polynomial equations.

Was determined as best treatment T7 (semi-hard cheese packed with high density polyethylene to vacuum sealed cooling 5°C), obtaining a long shelf life of 114 days to percentage of weight loss, 36 days and 5 percent moisture days for total aerobic count a correlation coefficient ( $r = 0,93$ ), ( $r = 0,99$ ), ( $r = 0,99$ ), respectively. Through a critical analysis it is concluded that the values obtained with percentage weight loss are the most significant because this analysis allows better identify the functionality that the package is in cheese.

Keywords: shelf life, cheese, HDPE, vacuum, storage

## INTRODUCCIÓN

El queso es el producto que resulta de la coagulación (ácida, enzimática o mixta) de la leche cruda o pasteurizada y que, en general, se somete posteriormente a maduración. Es un alimento de gran valor nutritivo, no sólo por el elevado contenido en proteína y grasa, sino también por ser una fuente importante de elementos minerales, principalmente calcio y fósforo.

Las distintas variedades de queso son el resultado de la composición de la leche utilizada, sustancias añadidas, el conjunto de procesos físicos y mecánicos que inciden en la elaboración y los factores microbiológicos y bioquímicos del período de maduración (1).

La calidad de los alimentos es una característica compleja que determina su valor o aceptabilidad para el consumidor. Abarca atributos negativos como el estado de descomposición, contaminación con suciedad, decoloración y olores desagradables, y atributos positivos, como origen, color, aroma, textura y métodos de elaboración de los alimentos.

El objetivo más importante en la fabricación de cualquier tipo de queso es obtener un producto de calidad, tanto desde el punto de vista físico (textura), como desde un punto de vista organoléptico (aroma y sabor) (2).

Asegurar alimentos sanos e inocuos, en el marco de sistemas alimentarios cada vez más complejos e interrelacionados con otros a través del comercio mundial de alimentos, requiere en la actualidad de grandes esfuerzos, coordinaciones y transformaciones significativas en la manera como tradicionalmente se ha abordado el aseguramiento de la calidad y la inocuidad alimentaria (3).

La búsqueda de envases que permitan ofertar productos higiénicamente frescos ha llevado a la diversificación de los métodos de envasado, los materiales y los tipos de tratamientos de conservación. A esto se le une el interés de los consumidores por la seguridad alimentaria, lo que ha hecho que en el momento actual, este tema sea centro de atención de todos los agentes que intervienen en la industria alimentaria (4).

Los estudios de vida útil para definir la duración de los alimentos son necesarios para no sub o sobre dimensionar el tiempo que realmente dura el producto. La vida útil de un alimento comprende el tiempo transcurrido entre la fabricación y el momento en que se presentan cambios significativos en él, que puedan generar rechazo en el consumidor final. Puede variar según el proceso de producción, la naturaleza del producto y el tiempo de almacenamiento, obteniéndose cambios a nivel microbiológicos, sensoriales y/o físico-químicos (5, 6).

Es importante identificar los factores específicos que afectan la vida útil y evaluar sus efectos individuales y en combinación. Estos se pueden dividir en: a) factores intrínsecos: materia prima (composición, estructura, naturaleza), actividad de agua, pH, acidez, disponibili-

dad de oxígeno y potencial Redox(Eh), y b) factores extrínsecos: procesamiento, higiene y manipulación, materiales y sistemas de empaques, almacenamiento, distribución y lugares de venta. (7)

El presente trabajo tuvo por objetivo evaluar el empaque y sellado al vacío en fundas de polietileno de alta densidad en la vida de anaquel de quesos frescos y semiduros.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Materiales

#### Materia Prima

Se utilizó queso fresco de 500 gramos y queso andino de 1000 gramos.

#### Material de Empaque

Se utilizó fundas de polietileno de alta densidad.

#### Equipo y material de laboratorio

### Equipo

Refrigeradora. Balanza. Balanza infrarroja. Incubadora a 37°C. Estufa a 20°C. Destilador. Autoclave. Cámara de flujo laminar. pH-metro. Envasadora.

### Material de laboratorio

Probetas de 10 ml y 100ml. Vasos de precipitación de 50ml y 250ml. Pipetas de 10ml y 1ml. Picetas. Matraz Erlenmeyers de 250ml. Tubos microbiológicos. Placas petrifilm para aerobios totales. Espátula. Utensilios (cuchillos, platos, tijeras). Reactivos (agua destilada, agar peptona).

### Métodos

#### Pérdida de peso

Se mantuvo los quesos almacenados a temperaturas de 5°C, 12°C y 20°C. Cada 48 horas se les quitaba el empaque y procedía a pesar. Luego de conseguir un peso constante se los volvía a empaque en fundas de polietileno de alta densidad y a sellarlos con y sin vacío de acuerdo al tratamiento.

#### Determinación del % de pérdida de peso

El porcentaje de pérdida de peso (%PP) se da, principalmente, por la eliminación de agua durante el período de almacenamiento.

Para la determinación del % de pérdida de peso se utilizó la siguiente fórmula:

$$\%PP = ((W_0 - W_f) / W_0) 100$$

Donde:

%PP = Porcentaje de pérdida de peso

W<sub>0</sub> = peso inicial

W<sub>f</sub> = peso final

#### Porcentaje de humedad

Se colocaron muestras de queso en la charola de la balanza, hasta alcanzar un peso de 3 gramos. Para obtener muestras muy delgadas y pequeñas es recomendable rallar el queso. Una vez colocada la muestra en la balanza, se cierra y se inicia la operación para la determinación

del contenido de humedad, el cual se muestra en porcentaje de humedad relativa (%HR). Las condiciones a las que se programa la balanza son: 78°C de temperatura por un tiempo de 70 min aproximadamente.

### Determinación de pH

Se utilizó un pH-metro con un electrodo de vidrio, una balanza analítica, vasos de precipitación de 100 y 250 cm<sup>3</sup>. La calibración del pH-metro se lo realizó con un una solución buffer de pH 7, donde se realizó una dilución de la muestra (1:1) con agua destilada.

### Determinación de microorganismos

Las muestras fueron preparadas en un cuarto aislado, limpio y desinfectado. Se preparó agua peptonada (250 ml de agua más 0,25 gramos de agar); se esterilizó en una autoclave durante 30 minutos a una temperatura de 121°C; posteriormente en tubos bacteriológicos se colocó 9 ml de agua peptonada más un gramo de la muestra y se prosiguió hacer diluciones hasta 10<sup>-3</sup>. Las siembras se realizaron en placas petrifilm para aerobios totales.

### Determinación de Unidades Formadoras de Colonias

Se calculó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) mediante la aplicación de la siguiente fórmula.

$$(UFC)/ml = (\# \text{ colonias}) (1/F\text{dilución})/ml$$

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Pérdida de peso

La pérdida de peso es el resultado de procesos químicos que están dados por reacciones como la oxidación de las grasas que provocan rancidez en los productos así como también por la evaporación del agua que tiene lugar rápidamente con la circulación del aire, este último ejerce influencia sobre la calidad y conservación en la refrigeración y almacenamiento.

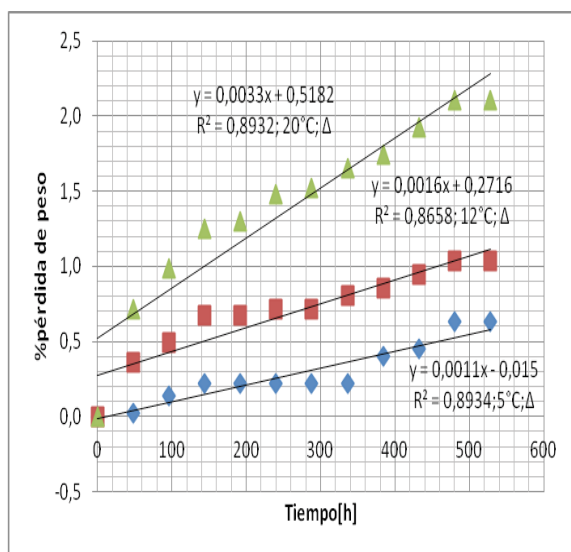


Figura 1. Relación entre porcentaje de pérdida de peso y tiempo de conservación [h] a temperaturas de 5, 12 y 20°C para queso fresco empacado con polietileno de alta densidad sellado con vacío.

En las Figuras 1 y 2, se presentan los resultados de la pérdida de peso de los quesos fresco y semiduros res-

pectivamente, empacados y sellados al vacío expresados como porcentaje. Los quesos frescos y semiduros almacenados a 20°C presentaron mayor pérdida de peso con relación al resto de temperaturas de almacenamiento, a esta temperatura también se observó rancidez y pérdida total en la forma y características sensoriales.

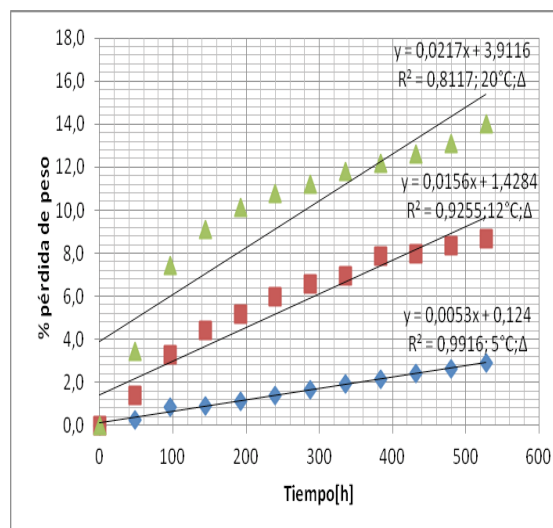


Figura 2. Relación entre porcentaje de pérdida de peso y tiempo de conservación [h] a temperaturas de 5, 12 y 20°C para queso semiduro empacado con polietileno de alta densidad sellado con vacío.

### Porcentaje de humedad

Durante el período de almacenamiento se observó que el queso fresco sufre fluctuaciones con los valores al inicio de la experimentación, pero posteriormente los valores van ascendiendo, es así que para los tratamientos T1, T2 y T4 los valores alcanzados a los 22 días son 56,5 58,5 y 56,9 respectivamente, mientras que para T3, T5 y T6 alcanzan valores de 61,8; 62,4; 65,0; estos últimos si bien es cierto se encuentran dentro del valor máximo que indica la NTE INEN 1528 que es de 65, pero están muy cercanos lo que indica que las temperaturas de 12 y especialmente de 20°C no son adecuadas para una buena conservación del queso.

El queso semiduro presentó un incremento en sus valores es así que los tratamientos T9, T11 y T12 alcanzan valores que superan el valor máximo que indica la NTE INEN 1528 que es de 55, mientras que para T7, T8 y T10 los valores alcanzados son de 52,0; 53,4 y 53,5 los cuales se encuentran dentro de NTE INEN 1528

### pH

Las temperaturas de conservación influyen significativamente en el pH del queso, teniéndose mejores resultados con una temperatura de conservación de 5°C.

La relación existente entre la actividad de agua *a<sub>w</sub>* y pH en los quesos frescos y semiduros es proporcional; es decir conforme mayor cantidad de agua exista en el interior del producto mayor será el valor del pH. Esta singular relación se debe a que en el momento en que el agua sale del interior del producto hacia el ambiente, también salen los hidrogeniones que se encuentran en el queso como resultado de la degradación proteolítica que ocurre durante los procesos posteriores a su

fabricación como manipulación, transporte y vida de anaquel. Por esta razón, se observaron que los valores obtenidos durante la experimentación no variaron significativamente debido a que una de las características del empaque utilizado es la de ser impermeable y al no permitir la salida ni entrada de sustancias permite mantener algunas de las características sensoriales del queso hasta culminar el período de estudio.

### Evaluación Microbiológica

El crecimiento de los microorganismos fue en mayor cantidad a una temperatura de 20°C y en las muestras que no poseían vacío como se muestra en las Figuras 3 y 4, esto se debe a que la temperatura regula el desarrollo microbiano y la actividad de las enzimas. La temperatura óptima para el desarrollo de la flora superficial del queso es de 20-25°C.

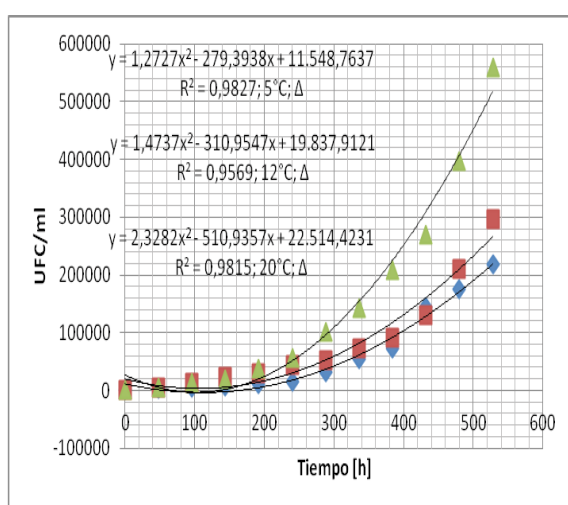


Figura 3. Relación entre unidades formadoras de colonias y tiempo de conservación [h] a temperaturas de 5, 12 y 20°C para queso fresco empacado con polietileno de alta densidad sellado sin vacío.

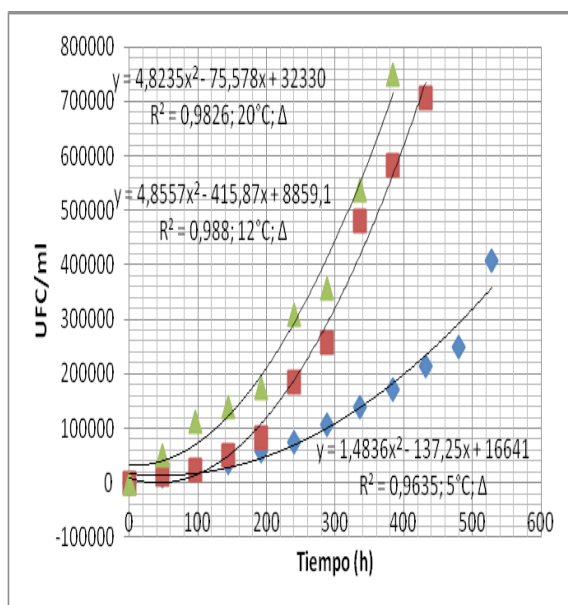


Figura 4. Relación entre unidades formadoras de colonias y tiempo de conservación [h] a temperaturas de 5, 12 y 20°C para queso semiduro empacado con polietileno de alta densidad sellado sin vacío.

### Determinación del Tiempo de Vida de Anaquel

El tiempo de vida de anaquel se calcula mediante el despeje de ecuaciones lineales para porcentaje de pérdida de peso y porcentaje de humedad; mientras que para el recuento de microorganismos (aerobios totales) se utilizó ecuaciones de segundo grado debido a que estas permitieron mostrar un mejor ajuste de los puntos. Se determinó el tiempo de vida útil del tratamiento T7 (queso semiduro empacado con polietileno de alta densidad sellado con vacío a 5°C) y el tratamiento T1 (queso fresco empacado con polietileno de alta densidad sellado con vacío a 5°C).

%Pérdida de peso

Para el caso de queso andino empacado con polietileno de alta densidad sellado al vacío a 5°C y teniendo 3% como condición estándar para porcentaje aceptado de pérdida de peso en un queso andino se obtiene:

$$\%PP = 0,0011 t - 0,015$$

$$t = (3 + 0,015) / 0,0011 = 2.741 \text{ horas} = 114 \text{ días}$$

### % Humedad

Teniendo en cuenta una humedad máxima para queso de 55% para queso semiduro:

$$\ln (\%H) = 0,0002 t + 3,8343$$

$$t = (\ln 55 - 3,8343) / 0,0002 = 865 \text{ horas} = 36 \text{ días}$$

### Aerobios totales (UFC/ml)

$$(UFC) = 0,916 x^2 - 32,024 x + 6562,5$$

Para resolver una ecuación de segundo grado se aplica la fórmula cuadrática, teniendo en cuenta que el total aceptado de (UFC) para un queso semiduro, en cuyo caso el tiempo de vida de anaquel es 120 horas o 5 días. El hecho de hacer las determinaciones rompiendo el empaque y el vacío y nuevamente con empaque al vacío, hace que exista contaminación y no pueda ser utilizado como un indicativo de vida de anaquel.

### CONCLUSIÓN

El uso del polietileno de alta densidad combinado con el vacío influye positivamente en las características físicas y organolépticas del queso fresco y semiduro, durante los 22 días de almacenamiento no se observó cambios en la apariencia de aquellos tratamientos almacenados a 5°C que es la temperatura adecuada para conservar los quesos.

### BIBLIOGRAFÍA Y REFERENCIAS

- Renner, E., (1987), Nutritional aspects of cheese. En: Cheese, Chemistry, Physics and Microbiology. Vol. 1. General Aspects, pp. 345-336 (Ed. P. F. Fox). Elsevier Applied Science Publishers, London, UK.
- FAO-OMS. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación- Organización Mundial de la Salud. (2003). Garantía de la Inocuidad y Calidad de los Alimentos: Directrices para el Fortalecimiento de los Sistemas Nacionales de Control de los Alimentos. Roma: FAO, Estudios Alimentación y Nutrición, 76. [En línea]. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/006/y8705s/y8705s00.htm> [Marzo, 2013].
- Mercado, C. (2007). Los ámbitos normativos, la gestión de la calidad y la inocuidad alimentaria: una visión integral. Agroalim. 12(24): pp. 131.
- López, A., Torres, T. y Antolin, G., (2007). Tecnología de Envasado y Conservación de Alimentos, pp. 1.
- Bolumen, S. (2005). Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia. Vida útil de los alimentos envasados, Colombia, pp. 115
- Labuza, T. (2000). The search for shelf life. Food testing Analysis. Determination of the Shelf life of Foods, pp.32
- Man, D. (2002). Shelf life. Food industry Briefing series, London, pp.112