

Aprovechamiento biotecnológico de productos agropecuarios III



María Guadalupe Bustos Vázquez
Gonzalo Velazquez de la Cruz

Aprovechamiento biotecnológico de productos agropecuarios III

**Ma. Guadalupe Bustos Vázquez
Gonzalo Velázquez de la Cruz**



Primera edición: agosto 2012

D.R. © Consejo Tamaulipeco

© Fondo Mixto de Fomento a la Investigación Científica y Tecnológica

© CICATA-IPN

Cerro Blanco, núm. 141, Col. Colinas del Cimatario
76090 Querétaro, Qro.

© Universidad Autónoma de Tamaulipas

© Ma. Guadalupe Bustos Vázquez y Gonzalo Velázquez de la Cruz

© Plaza y Valdés S. A. de C. V.

Manuel María Contreras 73. Colonia San Rafael

México, D. F. 06470. Teléfono: 5097 20 70

editorial@plazayvaldes.com

www.plazayvaldes.com

Plaza y Valdés Editores

Calle Murcia, 2. Colonia de los Ángeles

Pozuelo de Alarcón 28223, Madrid, España

Teléfono: 91 862 52 89

madrid@plazayvaldes.com

www.plazayvaldes.es

ISBN: PENDIENTE

Impreso en México / *Printed in Mexico*

Contenido

Efecto del etanol en la pared celular de <i>S. cerevisiae</i> ITV01 y su deficiente respiratoria (DR).....	11
<i>B. Ortiz Muñiz; B. Aguilar; M.G. Aguilar Uscanga</i>	
Aditivos alimentarios a partir de residuos agroindustriales	23
<i>M.G. Bustos Vázquez; E. Cervantes Martínez; M.A. García Delgado; N.A. Rodríguez Durán; G. Velázquez de la Cruz</i>	
La biotecnología moderna, herramienta complementaria al mejoramiento genético convencional de cultivos agrícolas; análisis actual y perspectiva.....	47
<i>J.E. Cervantes Martínez; M.G. Bustos Vázquez; M.A. García Delgado; H. Mata Vázquez</i>	
Evaluación de cuatro genotipos de chile serrano en hidroponía	69
<i>M.A. García Delgado; G. Bustos Vázquez; G. Martínez Balderas; R. Uresti Pesina; J.E. Cervantes Martínez; H. Mata Vázquez</i>	
Evaluación de la asimilación de bióxido de carbono de un cultivo de caña de azúcar en Xicoténcatl, Tamaulipas	81
<i>A. Zermeño González; E. Catalán Valencia; M.A. García Delgado; B. Canales López; M. Cantú Sifuentes; S. Villatoro Moreno; E.E. Olivar Rodríguez</i>	
Extractos metanólicos de plantas silvestres con actividad antirradical	91
<i>R.G. Rodríguez Garza; R.A. Garza Padrón; N.S. Martínez Cruz; M.E. Morales Rubio; J.F. Treviño Neávez; M.P. Barrón González</i>	

Producción de bioplaguicidas por fermentación sumergida para el control de hongos fitopatógenos y malezas.....	101
<i>M.E. Díaz de Villegas; P. Villa Gómez; A. Bell García; E. Torres Castañeda; J. Martínez Valdivieso</i>	
Tolerancia a inhibidores del hidrolizado de bagazo de caña por <i>S. cerevisiae</i> ITV-01 y <i>P. stipitis</i> NRRL Y-7124.....	111
<i>B. Gutiérrez; M.A. Aguilar Uscanga</i>	
Utilización de carbón activo inmovilizado para la recuperación de productos o eliminación de sustancias contaminantes	121
<i>A.B. Moldes; X. Vecino; R. Devesa Rey; M.G. Bustos; J.M. Cruz</i>	
Producción de xilitol por células inmovilizadas de <i>Candida tropicalis</i> IEC5-ITV: efecto del tiempo de curado y concentración de esferas de alginato de calcio.....	129
<i>Y. Cocotle Ronzón; A.I. Peña Cardeña; T. Hernández Quiroz; M.G. Aguilar Uscanga; M. López del Castillo Lozano</i>	
Bioproductos de la fermentación láctica de los residuos del camarón	141
<i>J. López Cervantes; D.I. Sánchez Machado; N.P. Adan Bante; C. Bueno Solano; O.N. Campas Baypoli</i>	
Producción de perlas de quitosano por hidrólisis alcalina de la quitina como bio-adsorbentes.....	153
<i>D.I. Sánchez Machado; J. López Cervantes; J.R. Rodríguez Núñez</i>	
Impacto ambiental de la producción de agrocombustibles.....	165
<i>M.A. Otero Rambla</i>	
Producción biotecnológica de ácido láctico	181
<i>N.R. Rodríguez Durán; M.G. Bustos Vázquez; N.A. Rodríguez Durán; J.A. del Ángel</i>	
Evaluación de un proceso de inversión en melaza de caña de azúcar para la obtención de ácido láctico utilizando <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	195
<i>E. Vizcaino Guerrero; G. Bustos Vázquez;</i>	

Evaluación de la melaza de caña y destilado de maíz para la obtención de ácido láctico a partir de <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	207
<i>O. Bustos Vázquez; G. Bustos Vázquez; S.J. Téllez Luis; J.A. Ramírez de León; N.A. Rodríguez Durán</i>	
Selección e identificación de levaduras de interés industrial	221
<i>J.A. del Ángel del Ángel; M.G. Bustos Vázquez; P. López González</i>	
Obtención de ácido láctico a partir de jugo de caña utilizando diferentes especies de <i>Lactobacillus</i>	231
<i>J. González Ramírez; K.S. Estrada Ortiz; N. Rodríguez Durán; G. Bustos Vázquez</i>	
Aditivos como mejoradores de la alimentación de pollos de engorda.....	239
<i>S. Castillo Camacho; J.C. Martínez González; E.G. Cienfuegos Rivas; J.J. Soto Castillo; S.P. Castillo Rodríguez</i>	
Parasitoides nativos: la mejor opción para el control de la mosca del cuerno en Tamaulipas, México	251
<i>Juan Fidencio Luna Salas; Jesús Loera Gallardo; Gary A. P. Gibson; Enrique Ruíz Cancino</i>	
Desafíos en la utilización de residuos lignocelulósicos para la obtención de productos biotecnológicos (<i>Parte I: pre-tratamiento de biomasa</i>)	261
<i>Rafael Rodríguez Philippini; Sabrina Evelin Martiniano; Silvio Silverio da Silva; Guadalupe Bustos Vázquez</i>	

**Efecto del etanol en la pared celular de *S. cerevisiae*
ITV01 y su deficiente respiratoria (DR)**
*Effect of ethanol on cell wall of *S. cerevisiae*
ITV01 and its respiratory deficient (DR)*

B. Ortiz Muñiz;¹ B. Aguilar;² M.G. Aguilar Uscanga³

Resumen

El efecto inhibitorio del etanol (sobre el crecimiento, la fermentación y la viabilidad) es debido a su acción sobre el sistema de membranas (mitocondrial y plasmática), asociándose a ácidos grasos de fosfolípidos, alterando la permeabilidad y fluidez de estas, ocasionando la muerte de la levadura, siendo la pared celular la estructura estrechamente relacionada con la tolerancia a etanol. Debido a que la mutación DR confiere una mayor resistencia a compuestos tóxicos, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del etanol sobre el metabolismo y la pared celular de *S. cerevisiae* ITV01 y su mutante DR. El etanol causó en *S. cerevisiae* ITV01 una fuerte inhibición de la producción de biomasa (de 5.2 a 0.9 g cel/L para 0 y 9.7% v/v etanol inicial). A su vez, se presentó una disminución en el consumo de glucosa, lo cual es debido a la desnaturalización de enzimas glicolíticas. El mismo comportamiento fue obtenido para la levadura DR con una disminución del crecimiento de 3.3 a 1.1 g cel/L para 0 y 9.5% v/v etanol inicial, respectivamente. Las concentraciones críticas de etanol (Pc), calculadas mediante regresión lineal de la gráfica biomasa (g cel/L)

¹ Instituto Tecnológico Superior de Tierra Blanca.

² Universidad de Guadalajara.

³ UNIDA, Instituto Tecnológico de Veracruz, av. Miguel Ángel de Quevedo, núm. 2779, col. Formando Hogar, c.p. 91870, Veracruz, México, tel: 229-934-15-00; correo electrónico: gaguilar@itver.edu.mx

contra % v/v etanol inicial, fueron: 12.1 y 13.5% v/v para *S. cerevisiae* ITV01 y DR, respectivamente. La diferencia en la Pc en ambas cepas está relacionada a un mayor contenido de polisacáridos de pared para la cepa DR y a una estructura de pared celular más tortuosa (mayor contenido de β 1-6 glucanos). *S. cerevisiae* ITV01-DR es más resistente a etanol que la levadura competente en respiración que le dio origen, sugiriendo que la mutación DR induce cambios importantes, no sólo afectando el transporte electrónico mitocondrial sino también a un nivel fisiológico modificando la estructura y composición de la pared celular.

Abstract

The inhibitory effect of ethanol on the growth and metabolism in yeast strains is due to its action on the membrane system (mitochondrial and plasma). It is associated with phospholipid fatty acids, altering their permeability and fluidity, and consequently killing the yeast, the cell wall structure being closely related to ethanol tolerance. The respiratory deficient mutation (DR) confers increased resistance to toxic compounds. The aim of this study was to evaluate the effect of ethanol concentration on cell wall metabolism and composition in *S. cerevisiae* ITV01 and its DR mutant. The results obtained showed that ethanol concentration exerted a strong inhibition on biomass production (5.2 to 0.9 g cells/L for 0 and 9.7% v/v initial ethanol concentration, respectively). Also, we observed a decrease in glucose uptake. The same behavior was obtained for DR yeast with a decrease in growth from 3.3 to 1.1 g cells/L for 0 and 9.5% v/v initial ethanol concentration, respectively. The critical concentrations of ethanol (Pc) calculated by linear regression from a biomass (g cell/L) versus initial ethanol (%v/v) plot were 12.1 and 13.5% v/v for *S. cerevisiae* ITV01 and DR, respectively. The difference in Pc in both strains is related to a higher wall polysaccharide content in the DR strain and a more tortuous cell wall structure (higher 1.6 b glucans content). *S. cerevisiae* ITV01-DR is more resistant to ethanol than the respiratory competent yeast that gave birth to it, suggesting that the DR mutation induces significant changes, not only affecting mitochondrial electron transport but also at the physiological level through the modification of cell wall structure and composition.

Introducción

Generalmente se reconoce que el etanol tiene tres efectos inhibitorios: inhibición a la multiplicación de células, inhibición de la fermentación, y un efecto letal en las células. *S. cerevisiae* detuvo su crecimiento en un medio de jugo de uva cuando el

contenido de etanol alcanzó 68.5 g/L, sin embargo continuó fermentando hasta que la concentración final de etanol fue de 108 g/L (Holzberg y otros, 1967). Rose (1980) demostró que para cinco diferentes cepas de *S. cerevisiae*, el crecimiento celular fue detenido cuando la concentración de etanol alcanzó de 55 a 103 g/L dependiendo de la cepa. Benitez y otros (1983) aislaron 632 cepas de vino, de las cuales 35 fueron capaces de crecer en presencia de etanol a 118 g/L. Varios autores han demostrado que el crecimiento de las levaduras disminuye a concentraciones más altas de etanol. Novak y otros (1981) encontraron que la acumulación del etanol al interior de la célula es un problema de difusión del interior hacia el exterior. Posteriormente, Charpentier (1993) propuso que el sitio de acción del etanol sobre la célula es esencialmente en el sistema de membranas (mitocondrial y plasmática) y menciona que las moléculas de etanol penetran al interior de la membrana citoplasmática y que se asocian a moléculas de ácidos grasos de fosfolípidos y de agua; de esta forma se altera la permeabilidad y fluidez de la membrana, ocasionando la muerte de la levadura. El etanol causa un efecto de inhibición importante en las levaduras, tales como: desnaturalización de proteínas y enzimas glicolíticas, inhibición en el transporte de nutrientes, incremento de la permeabilidad de la membrana, inducción de la lipólisis, alteración la composición de ácidos grasos (aumentando insaturados y disminuyendo saturados), aumento del contenido de esteroides (escualeno y ergosterol), inhibición de la ATPasa disipando la fuerza protón motriz (Petrov y Okorokov, 1990). Como mecanismo de defensa, las levaduras modifican la composición de su pared celular, principalmente polisacáridos, tales como glucanos y mananos (Walker, 1998; Aguilar y François, 2003).

La pared celular, generalmente con un grosor de 100-200 nm, es una estructura que comprende del 10 al 25% del total del peso seco de la célula. Los principales constituyentes de la pared celular son polisacáridos, representando de 80 a 90%, siendo principalmente glucanos y mananos, con una menor proporción de quitina (Walker, 1998). La fuerza de la pared deriva del contenido de glucanos, los cuales se encuentran parcialmente arreglados en forma de una red de microfibras, estando presentes tanto el β 1-6 y β 1-3 glucanos, distinguiéndose por sus propiedades de solubilidad en ácido y alcali. Los mananos están presentes con enlaces a 1-6 en el esqueleto interno y a 1-2 y a 1-3 en las cadenas laterales. La quitina, un polímero de N-acetilglucosamina, se encuentra presente en pequeñas cantidades en *S. cerevisiae* (del 2 al 4%), principalmente en las cicatrices causadas por la gemación. Los otros constituyentes de la pared celular incluyen proteínas, lípidos y fosfato inorgánico. La proporción precisa de los constituyentes químicos de paredes celulares varían de acuerdo a la cepa, la edad del cultivo, y las condiciones de crecimiento (Aguilar y François, 2003). Dentro de las funciones fisiológicas de la pared celular se encuentra:

la protección física, manteniendo la forma de la célula; la estabilidad osmótica; ser una barrera permeable; soporte para enzimas; enlace a cationes metálicos (Mg^{+2}); reconocimiento célula a célula, adhesión entre ellas y la resistencia a etanol (Walker, 1998). El fenotipo deficiente respiratorio (DR), debido a la predominancia del metabolismo fermentativo sobre el respiratorio, incapacidad de consumir etanol y un mayor rendimiento de etanol, resulta de interés para la producción de etanol (Ooi y Lankford, 2009; Chmielewska y Dziuba, 2003). Además se ha sugerido que el fenotipo DR está relacionado con una mayor resistencia a compuestos tóxicos (Öner y otros, 2005). Por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del etanol sobre el metabolismo y la pared celular de *S. cerevisiae* ITV01 y su deficiente respiratoria.

Materiales y Métodos

Material biológico

La cepa de *S. cerevisiae* ITV01 fue aislada de melazas de caña de azúcar por Ortiz-Zamora y otros (2009) y *S. cerevisiae* ITV01-DR fue obtenida mediante mutación con bromuro de etidio.

Medios de cultivo (medio de conservación)

Las cepas fueron conservadas en refrigeración a 4°C, resembradas cada mes en el siguiente medio de conservación (g/L): glucosa, 150; extracto de levadura, 20 y agar, 20.

Fermentaciones

Las fermentaciones se realizaron utilizando un medio de cultivo con la siguiente composición (g/L): glucosa, 150; KH_2PO_4 , 8; $(NH_4)_2SO_4$, 5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 y extracto de levadura, 2. El pH fue ajustado a 3.5 con ácido ortofosfórico al 80 por ciento. El medio fue esterilizado en autoclave a 121°C durante 15 minutos. El etanol se añadió al medio en condiciones asépticas después de esterilizarlo. Tres asadas de cada levadura fueron inoculadas en un matraz erlenmayer de 250 mL con 100 mL de medio de cultivo por 12 h a 30 °C y 150 rpm. Posteriormente, 6×10^6 cel viables / mL (Lange y otros, 1993) fueron inoculadas en un segundo matraz bajo las mismas condiciones. Finalmente, del segundo matraz se tomaron 6×10^6 cel viables /mL para las fermentaciones en las concentraciones iniciales de etanol evaluadas. Las fermentaciones fueron realizadas por duplicado.

Métodos analíticos

Análisis de biomasa

La densidad óptica (DO) fue medida a 620 nm empleando un espectrofotómetro Cintra 10, en celdas de metacrilato con una trayectoria óptica de 10 mm, se realizaron las diluciones adecuadas para tener valores de absorbencia menores a 0.8. El peso seco se obtuvo mediante filtración y secado de un volumen conocido de muestra (15 mL) sobre una membrana de porosidad determinada (Waters, acetato de celulosa 0.45 μ m).

Análisis de glucosa, glicerol, ácido acético y etanol

Las muestras fueron centrifugadas a 10 mil rpm por 10 minutos a 4°C y congeladas, y posteriormente fueron analizadas por cromatografía de líquidos de alta resolución. La concentración de glucosa, etanol, glicerol y ácido acético fue determinada mediante HPLC utilizando una columna Aminex HPX-87H de Biorad, empleando como fase móvil H₂SO₄ 5 mM, 0.4mL/min., 40°C, empleando un detector de índice de refracción.

Caracterización de la pared celular

Extracción y cuantificación de glucanos y mananos

Las células fueron tomadas durante la fase exponencial y fase estacionaria. 50 mL de cultivo fueron centrifugados por cinco minutos a 4500 g y lavados dos veces con agua helada. El paquete celular final fue resuspendido en 0.5 mL de Tris HCl 10 mM / EDTA 1mM pH 7.5. La preparación, hidrólisis de la pared celular y la cuantificación de glucosa y manosa liberada por la hidrólisis con ácido sulfúrico de los glucanos y mananos fue determinada por HPLC (Aguilar y François, 2003).

Susceptibilidad a la acción lítica de la beta 1-3 glucanasa

La susceptibilidad de *S. cerevisiae* a la lisis por la beta 1-3 glucanasa fue determinada por el procedimiento propuesto por Ovalle y otros (1998) con algunas modificaciones.

El ensayo fue realizado ajustando la DO a 620 nm de una suspensión de células en una solución de Tris-HCl 10mM / 1 mM de EDTA pH 7.5 a 30 °C. Se agregaron 0.4 U de la beta 1-3 glucanasa de *Arthrobacter luteus*. El cambio de la densidad óptica a 660 nm fue monitoreado cada 2 minutos por los primeros 30 minutos; posteriormente cada 5 minutos. La susceptibilidad de la acción lítica fue determinada mediante la velocidad de la lisis de la levadura.

Resultados y discusión

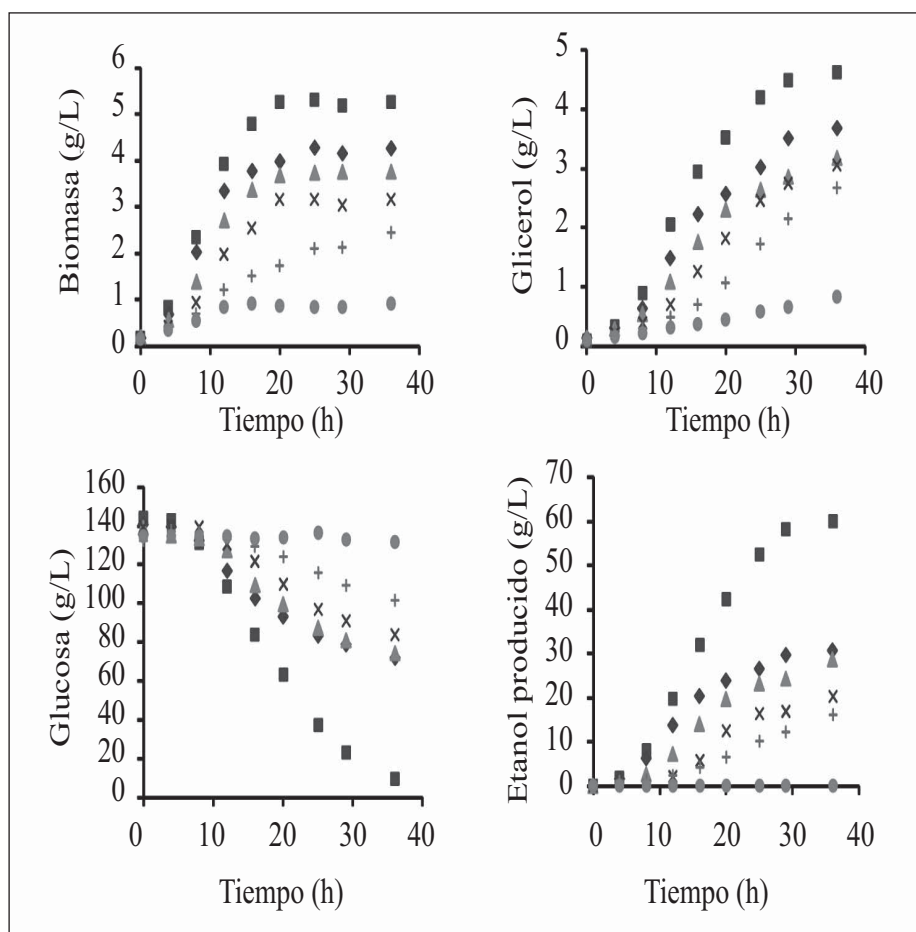
Efecto del etanol en S. cerevisiae ITV01 y su deficiente respiratoria

Para evaluar el efecto del etanol en *S. cerevisiae* ITV01 y en su deficiente respiratoria se varió la concentración inicial de etanol en el medio de cultivo hasta 9.7% v/v. En el crecimiento de *S. cerevisiae* ITV01 no se presentó un aumento en el tiempo de latencia, observándose el efecto inhibitor del etanol sobre la producción de biomasa de 5.2 a 0.9 g cel/L para 0 y 9.7% v/v, respectivamente (figura 1); de manera análoga, se presentó el mismo efecto sobre la producción de glicerol relacionado a la disminución de la producción de biomasa.

El consumo de glucosa fue severamente afectado, al igual que la producción de etanol, debido a la desnaturalización de las enzimas glicolíticas.

Para *S. cerevisiae* ITV01 DR se obtuvo un comportamiento similar al obtenido para la cepa parental, dado por una disminución de la producción de biomasa de 3.3 a 1.1 g cel/L para 0 y 9.5% v/v, respectivamente. Con los resultados anteriores fue posible corroborar el efecto inhibitor del etanol sobre el crecimiento y la fermentación, los cuales concuerdan con lo previamente reportado (Novak y otros, 1981; Benítez y otros, 1983; Charpentier, 1993; Walker, 1998). Para determinar el efecto tóxico del etanol sobre ambas levaduras se determinó la concentración crítica de etanol, la cual puede ser definida como la concentración inicial de etanol a la que no se presenta crecimiento de la levadura, para ello de la gráfica de biomasa producida (g/L) contra etanol inicial (%v/v), véase figura 2; de donde es posible determinar que la Pc para *S. cerevisiae* ITV01 y su DR son 12.1 y 13.5% v/v, respectivamente; destacándose la diferencia en las pendientes de ambas líneas. La concentración crítica de etanol de *S. cerevisiae* ITV01 DR es comparable con las levaduras de la fermentación del vino, 13% v/v, y otras levaduras altamente resistentes a etanol, 14.9% v/v (Rose, 1980; Benitez y otros, 1983).

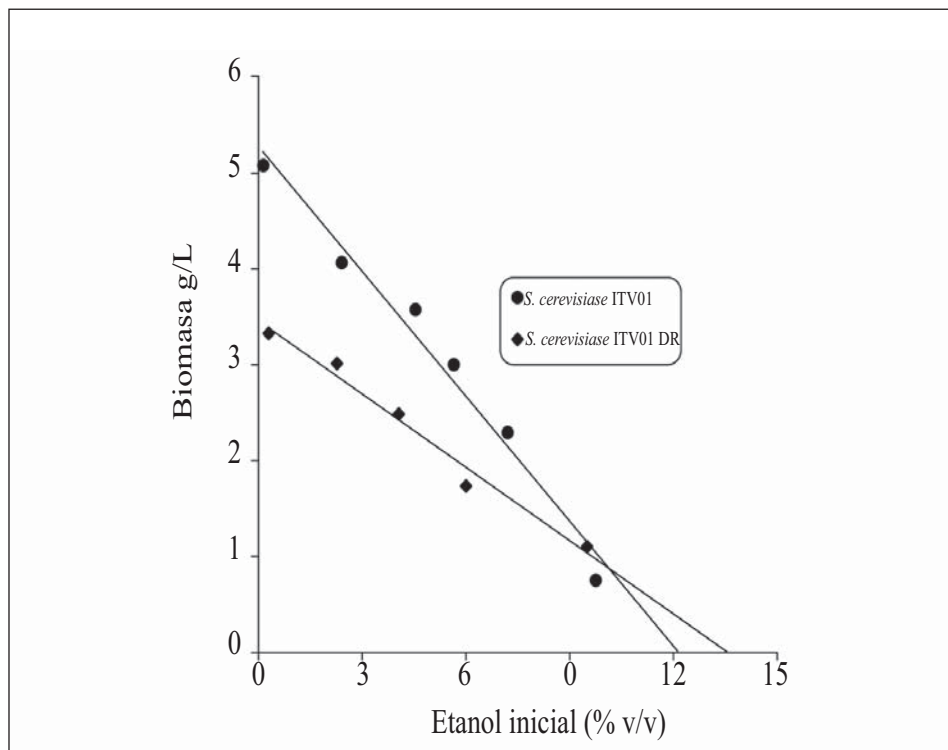
Figura 1. Efecto del etanol sobre la cinética de *S. cerevisiae* ITV01 en medio con glucosa a 150 rpm, 30 °C y pH 3.5.
Etanol inicial (%v/v): 0, (■); 2.3, (◆); 4.7, (▲); 5.8, (x); 7.2, (+) y 9.7, (●)



Fuente: elaboración propia.

Los resultados anteriores señalan una mayor tolerancia de etanol para la cepa deficiente respiratoria en comparación con la cepa parental, lo cual está relacionado a la predominancia del metabolismo fermentativo sobre el respiratorio, causando cambios en la pared celular.

Figura 2. Efecto de la concentración inicial de etanol sobre la producción de biomasa en *S. cerevisiae* ITV01 y *S. cerevisiae* ITV01 DR. *S. cerevisiae* ITV01 (●), *S. cerevisiae* ITV01 DR (◊)



Fuente: elaboración propia.

Efecto del etanol en la pared celular

Para evaluar los cambios en la pared celular en *S. cerevisiae* ITV01 y su deficiente respiratoria fueron seleccionadas arbitrariamente tres condiciones iniciales de etanol (0, 3 y 6% v/v), dos fases de crecimiento (exponencial y estacionaria). Los resultados muestran que *S. cerevisiae* ITV01 en la fase estacionaria tiene un menor contenido de glucanos (%G) y mananos (%M) que en la fase exponencial, mientras que para la cepa ITV01 DR no se presentó un cambio en el contenido de los polisacáridos de pared dependiente de la fase de crecimiento (tabla 1).

Tabla 1. Contenido de polisacáridos de pared y parámetros cinéticos de la formación de esferoplastos en *S. cerevisiae* ITV01 e ITV01 DR en fase exponencial y estacionaria bajo diferentes concentraciones iniciales de etanol inicial

Cepa	Fase de Crecimiento	Etanol (%v/v)	% G	% M	% G+M	LT (min)	MLR (10^{-2} min)	IR (10^{-3})
<i>S. cerevisiae</i> ITV01	Exponencial	0	7.81	7.87	15.68	2.23	2.24	9.96
		3	7.81	7.00	14.80	3.57	1.40	25.51
		6	7.96	7.22	15.69	1.44	3.47	4.15
	Estacionaria	0	5.11	4.82	9.93	3.28	1.52	21.64
		3	4.91	4.15	9.06	4.42	1.13	39.16
		6	4.86	3.80	8.66	2.45	2.04	12.01
<i>S. cerevisiae</i> ITV01 DR	Exponencial	0	7.55	6.91	14.46	2.19	2.28	9.61
		3	7.17	6.30	13.47	2.76	1.81	15.26
		6	5.24	6.20	11.44	2.45	2.04	12.01
	Estacionaria	0	11.58	4.25	15.83	4.76	1.05	45.35
		3	7.10	6.73	13.83	4.71	1.06	44.50
		6	5.02	5.12	10.14	4.09	1.22	33.59

Fuente: elaboración propia.

Contenido de glucanos, % G; mananos, % M; suma de glucanos y mananos, % G+M; fase de latencia, LT; máxima velocidad de lisis, MLR e índice de velocidad, IR.

Los resultados de la susceptibilidad a la acción lítica de la pared celular con la β 1-3 glucanasa de *A. luteus* demuestra que los tiempos de latencia fueron mayores para la deficiente respiratoria en comparación con la parental, causado por una menor disponibilidad de enlaces β 1-3, sugiriendo una mayor contenido de β 1-6 glucanos (estructura ramificada) que de β 1-3 glucanos (estructura plana). Además, menores valores de la máxima velocidad de lisis (MLR) en *S. cerevisiae* ITV01 DR señalan una mayor resistencia de la pared celular a la acción lítica por la β 1-3 glucanasa. Finalmente, el que el valor del índice de velocidad (IR), definido como la relación LT/MLR, sea mayor para la levadura DR sugieren una mayor relación β 1-6: β 1-3 glucanos en la deficiente respiratoria. De lo anterior, es posible inferir que la resistencia a etanol está directamente relacionada con el contenido de β 1-6 glucanos, corroborando que *S. cerevisiae* ITV01 DR es más resistente a etanol que *S. cerevisiae* ITV01, resultados que concuerdan con lo reportado previamente para otras levaduras (Aguilar y François, 2003).

Conclusiones

S. cerevisiae ITV01 DR es más resistente a etanol que la cepa competente en respiración que le dio origen. La mayor resistencia a etanol es debida a un mayor contenido de β 1-6 glucanos, sugiriendo que la deficiente respiratoria tiene una estructura de pared celular más tortuosa que la competente en respiración. Los resultados anteriores ayudan a confirmar la hipótesis de que el fenotipo deficiente respiratorio confiere una mayor resistencia a compuestos tóxicos, no únicamente a los que intervienen directamente con el transporte electrónico mitocondrial (andramicina, cianuro, entre otros) sino con aquellos, como el etanol, relacionados directamente con la predominancia del metabolismo fermentativo sobre el respiratorio. El fenotipo deficiente respiratorio confiere una mayor resistencia a etanol en *S. cerevisiae* ITV01.

Referencias

- Aguilar B. and J.M. François (2003), "A Study of the Yeast Cell Wall Composition and Structure in Response to Growth Conditions and Mode of Cultivation", *Microbiol*, 37, pp. 268-274.
- Benitez, T.; R.L. Castillo; A. Aguilera; J. Conde and E. Cerda Olmedo (1983), "Selection of Wine Yeasts for Growth and Fermentation in the Presence of Ethanol and Sucrose", *Environ, Microbiol*, 45, pp. 1429-1436.
- Charpentier C. (1993) "Les Arrêts de Fermentation: Rôle del'éthanol, Résistance de la Levure", *R.F. Œnologie*, 140, pp. 49-52.
- Chmielewska J. and E. Dziuba (2003), "Respiratory Deficient Mutants of xylose-fermenting yeast –Obtainment and features", *EJPAU*, 6(2), núm 01.
- Holzberg, I.; R.W. Finn and K.H. Steinkrauss (1967), "A Kinetic Study of the Alcoholic Fermentation of Grape Juice", *Biotechnol, Bioeng*, 9, pp. 413-423.
- Lange, H.; J.M. Bavouzet; P. Taillandier and C. Delorme (1993), "Systematic Error and Comparison of Four Methods for Assessing the Viability of *Saccharomyces cerevisiae* Suspensions", *Biotechnol, Tech*, 7, pp. 223-228.
- Novak, M.; P. Strehaiano; M. Moreno and G. Goma (1981), "Alcoholic Fermentation: on the Inhibition Effect of Ethanol", *Biotechnol, Bioeng*, 23, pp. 201-211.
- Öner, E.T.; S.G. Oliver and B. Kirdar (2005), "Production of Ethanol from Starch by Respiration-Deficient Recombinant *Saccharomyces cerevisiae*", *Environment, Microbiol*, 71, pp. 6443-6445.
- Ooi B.G. and K.R. Lankford (2009), "Strategy for Adapting Wine Yeasts for Bioethanol Production", *J. Mol. Sc.*, 10(1), pp. 385-394.

- Ortiz Zamora, O.; R. Cortés García; M. Ramírez Lepe; J. Gómez Rodríguez and M.G. Aguilar Uscanga (2009), "Isolation and Selection of Ethanol-Resistant and Osmotolerant Yeasts from Regional Agricultural Sources in Mexico", *J. Food Proc, England*, 32(5), pp. 775-786.
- Ovalle, R.; S.T. Lim; B. Holder; C.H. Jue; C. Wood More and P.N. Lipke (1998), "A Spheroplast Rate Assay for Determination of Cell Wall Integrity in Yeast", *Yeast*, 4, pp. 1159-1166.
- Petrov V.V. and L.A. Okorokov (1990), "Increase of the Anion and Proton Permeability of *Saccharomyces carlsbergensis* plasmalemma by n-alcohols as a Possible Cause for De-Energization", *Yeast*, 6, pp. 311-318.
- Rose, A.H. (1980), "Recent Research on Industrially Important Strains of *Saccharomyces cerevisiae*, Biological Activity of Yeasts" in *The Yeasts*, S.M. Passmore and R.R. Davenport (eds.), New York, F.A. Skinner, Academic Press, pp. 103-121.
- Walker, M.G. (1998), *Yeast Physiology and Biotechnology*, England, John Wiley & Sons.

Aditivos alimentarios a partir de residuos agroindustriales

Food additives from agroindustrial wastes

M.G. Bustos Vázquez,^{1} E. Cervantes Martínez,¹*

M.A. García Delgado,¹ N.A. Rodríguez Durán,¹ G. Velázquez de la Cruz²

Resumen

Los aditivos alimentarios son utilizados como sustancias que por sí mismas no se consumen normalmente como alimento, ni tampoco se usa como ingrediente básico en alimentos sino que son agregadas a estos a fin de preservar o intensificar sus cualidades, ya sea conservándolas de la acción de microorganismos, realzando su gusto, su color o mejorando su textura, estos pueden ser naturales o artificiales. Actualmente, los aditivos alimentarios desempeñan un papel importante en el complejo abastecimiento alimenticio; muchos de estos aditivos además de ser sustancias naturales son incluso nutrientes esenciales, lo que hace que se les clasifique como tales. Los aditivos alimentarios tienen un papel fundamental a la hora de mantener las cualidades y características de los alimentos que exigen los consumidores (Saltmarsh, 2000) y hacen que los alimentos continúen siendo seguros, nutritivos y apetecibles en su proceso ya que se añaden intencionadamente con el fin de modificar sus propiedades, técnicas de elaboración, facilitar su conservación, mejorar su apariencia, darle sabor o color al alimento y en ningún caso tienen un papel enriquecedor del alimento (European Parliament and Council Directive, 1988). Por esto en este capítulo se exponen las diferentes funciones, su clasificación y usos de los aditivos alimentarios obtenidos a partir de los diferentes residuos agroindustriales.

¹ Unidad Académica Multidisciplinaria Mante, Universidad Autónoma de Tamaulipas, Blvd. Enrique Cárdenas González, núm. 1201, col. Jardín, c.p. 89840, Ciudad Mante, Tamaulipas, México.

² Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada (CICATA-IPN) Unidad Querétaro.

Abstract

Food additives are used as substances which by themselves are not normally consumed as food, nor used as an ingredient of the food but are added to these in order to preserve or enhance their qualities, either preserving them from the action of microorganisms, enhancing its taste, color or improving texture, these can be natural or artificial. Currently, food additives play an important role in the complex food supply, many of these additives in addition to being natural substances are even essential nutrients, which makes being classified as such. Food additives have a key role in maintaining the qualities and characteristics of food that consumers demand, (Saltmarsh, 2000) and cause food to remain safe, nutritious and appealing in its process as it is intentionally added to modify its properties, processing techniques, to facilitate their conservation, improve appearance, flavor or color to food and never have a role of food enrichment (European Parliament and Council Directive, 1988). That is why in this chapter describes the different functions, their classification and uses of food additives obtained from different agro-industrial waste are described.

Introducción

Los aditivos alimentarios son sustancias puras que se adicionan intencionalmente a los alimentos para realizar una o varias funciones específicas. El término *aditivo alimentario* puede incluir todos los compuestos químicos inertes o activos, naturales o sintéticos, nutritivos o no que son directamente agregados a los alimentos (Carrillo y otros, 2000). La clasificación de aditivos alimentarios está basada de acuerdo a su función (González, 1983). Aunque su uso se asocia a los tiempos modernos, los aditivos alimentarios se emplean desde que el hombre aprendió a conservar los alimentos de la cosecha para el año siguiente y a conservar la carne y el pescado con técnicas de salazón y ahumado. Los egipcios utilizaban colorantes y aromas para realzar el atractivo de algunos alimentos, y los romanos empleaban salmuera (nitrato potásico), especias y colorantes para conservar y mejorar la apariencia de los alimentos. Aunque los aditivos alimentarios no plantean ningún problema para la mayoría de la gente, un reducido número de personas con determinadas alergias puede ser sensible a ciertos aditivos. Parece que en los casos en los que los aditivos alimentarios tienen un efecto adverso, simplemente agravan una condición que ya existía, más que producirla (World Health Organisation, 1987).

Residuos agroindustriales

La actividad agroindustrial es de gran importancia para la economía de un país por sus repercusiones en el sector agropecuario y en la actividad industrial. El desarrollo y fortalecimiento de las empresas agroindustriales depende de factores legales, administrativos, de mercado, técnicos y financieros y del soporte que a través del Estado y sector privado, pueda tener la actividad, particularmente en la generación de materia prima que satisfaga los requisitos de cantidad y calidad. Durante algunos procesos agroindustriales, se generan subproductos o residuos, que cuando no son convenientemente reciclados o procesados, causan diversos problemas ambientales. Su eliminación suele suponer un problema de gestión para las empresas productoras. Sin embargo estos materiales son fuentes especialmente atractivas por su contenido en compuestos de diferente naturaleza (como azúcares, pigmentos, fibra alimentaria, proteína, polifenoles, lignina...) y pueden ser potencialmente útiles cuando se les transforma mediante las reacciones apropiadas en productos de elevado valor añadido (Sreenath y otros, 2001a; Moldes y otros, 2002). La obtención de estos compuestos revalorizaría así una fracción de desecho, y originaría compuestos útiles en el campo alimentario, médico, o en el sector químico.

Diariamente se genera gran cantidad de residuos agroindustriales que son cada vez más difíciles de recoger y tratar. Algunos autores han propuesto la utilización de estos residuos para la producción de determinados aditivos alimentarios como el xilitol o ácido láctico. Cuando se quieren utilizar residuos agroindustriales para la producción biotecnológica de diferentes aditivos alimentarios, se tienen que llevar a cabo una serie de etapas de fraccionamiento que van a variar en función del producto de interés.

Una mayoría de residuos agroindustriales presentan naturaleza lignocelulósica, cuyo fraccionamiento está condicionado por el hecho de que la celulosa, las hemicelulosas y la lignina son de naturaleza polimérica y se hallan interpenetradas entre sí, existiendo entre ellas uniones físicas y químicas, de tal modo que los procedimientos clásicos de fraccionamiento (cristalización, precipitación, extracción) no son satisfactorios para su separación individual, ya que el aislamiento de uno de los polímeros implica la degradación de la estructura de los otros (Patel y otros, 1992; Hofvendalh y Hahn-Hägerdal, 1999).

La tabla 1 recoge algunos residuos agroindustriales, así como los microorganismos utilizados para obtener diferentes aditivos alimentarios. Cada microorganismo va a condicionar las etapas de fraccionamiento de los diferentes residuos. Así por ejemplo cuando se utiliza *Aspergillus niger* para la producción de biotecnológica de ácido

láctico se puede obviar la etapa de sacarificación de la celulosa ya que el propio hongo bajo determinadas condiciones es capaz de producir enzimas de forma endógena. Estas enzimas permiten romper las cadenas de celulosa en monómeros de glucosa. Por el contrario cuando el ácido láctico se produce utilizando bacterias lácticas se necesitará siempre una etapa de hidrólisis de la celulosa ya sea vía enzimática o a través de hidrólisis ácida (Parajó y otros, 1997; Moldes y otros, 1999; Bustos y otros, 2005).

El utilizar un microorganismo u otro depende básicamente del producto que se quiera obtener así como de las condiciones de operación que se pretendan utilizar. En general para la producción biotecnológica de ácido láctico se emplean bacterias por ser estas más rápidas que los hongos, mientras que para la producción de xilitol se utilizan levaduras ya que las bacterias por lo general no tienen la capacidad de fermentar los azúcares a xilitol.

Aditivos alimentarios

Existe mucha controversia sobre el uso de aditivos alimentarios, sobre todo entre la gente que desconoce los aspectos legales que involucran su adecuada aplicación. Los aditivos se deben emplear como una ayuda en la fabricación de los alimentos, pero nunca para enmascarar materias primas o productos finales de mala calidad, en este sentido, es importante conocer sus características para no engañar al consumidor mediante un abuso indiscriminado en su empleo.

Cada país tiene sus propias leyes al respecto y algunos de ellos (principalmente los desarrollados, como Estados Unidos, Japón, Inglaterra, Alemania, Francia) llevan a cabo análisis toxicológicos para demostrar la seguridad o la inocuidad de cada alimento. En general, las leyes sanitarias permiten usar los aditivos en determinadas concentraciones máximas que previamente se establecen, según los resultados de los análisis toxicológicos; dichos máximos son muchas veces menores (100 o más) que las dosis que llegan a causar daños a los animales. En otras palabras, sólo consumiendo una excesiva cantidad de aditivo (lo cual es difícil que suceda en condiciones normales de fabricación y de consumo del alimento) puede presentarse algún problema de toxicidad en el humano. Su empleo aumenta a medida que los países adquieren un grado tecnológico y económico más avanzado, ya que este nivel de vida requiere de un mayor número de alimentos preparados y listos para servirse; esto ha ocasionado que en muchos casos la función de los aditivos utilizados sea sólo para facilitar la preparación del alimento en el hogar. Contrariamente, en los países en vías de desarrollo donde aún se consiguen fácilmente muchos productos frescos y hay tradición en la preparación hogareña, el uso de estos compuestos es más reducido.

Tabla 1. Producción biotecnológica de aditivos alimentarios a partir de diferentes residuos agroindustriales

<i>Residuo</i>	<i>Microorganismo</i>	<i>Aditivo alimentario</i>	<i>Referencias</i>
Madera de eucalipto	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Ácido láctico	Moldes y otros, 2001
	<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	Astaxantina	Cruz y Parajó, 1998
Alfalfa	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Ácido láctico	Sreenath y otros, 2001b
Zeros de maíz	<i>Lactobacillus delbriium</i>	Ácido láctico	Luo y otros, 1997
	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Ácido láctico	Shen XL y Xia LM 2006
	<i>Debaryomyces hansenii</i>	Xilitol	Cruz y otros, 2000b
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Ácido láctico	Rivas y otros, 2004
Celulosa pura	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Ácido láctico	Venkatesh, 1997
Celulosa pura	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Ácido láctico	Abe y Takagi, 1991
Papel de periódico	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Ácido láctico	Abe y Takagi, 1991
Residuos papel	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Ácido láctico	Schmidt y Padukone, 1997
Sarmiento	<i>Lactobacillus pentosus</i>	Ácido láctico	Bustos y otros, (2004-2005)
Hierba	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Ácido láctico	Chen y Lee, 1997
Cascarilla de cebada	<i>Debaryomyces hansenii</i>	Xilitol	Cruz y otros, 2000a, 2000b
	<i>Lactobacillus pentosus</i>	Ácido láctico	J.M. Cruz y otros, 2007
Hojas de maíz	<i>Debaryomyces hansenii</i>	Xilitol	Cruz y otros, 2000b
Bagazo de caña de azúcar	<i>Candida guilliermondii</i>	Xilitol	Silva, S. y otros, 2006
Madera de pino	<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	Astaxantina	Parajó y otros, 1997
Hemicelulosas	<i>Propionobacterium acidipropionici</i>	Ácido propiónico	Ramsay y otros, 1998
	<i>Lactobacillus pentosus</i>	Ácido láctico	Bustos G. y otros, 2005
Piña	<i>Aspergillus niger</i>	Ácido cítrico	Tran y otros, 1998
	<i>Lactococcus lactis</i>	Ácido láctico	Takashi Ueno y otros, 2003
Maíz	<i>Aspergillus niger</i>	Ácido cítrico	Xie y West, 2004
Melaza de caña de azúcar	<i>Enterococcus faecalis, Lactobacillus delbrueckii</i>	Ácido láctico	Young-Jung Wee y otros, 2005; Arti Dumbrepatil y otros, 2008
		Ácido láctico	

Fuente: elaboración propia.

Entre la enorme lista de aditivos, existen algunos muy conocidos como la sacarosa, el cloruro de sodio y el ácido acético, que se han empleado desde hace varios siglos con la finalidad de conservar los alimentos y mejorar sus propiedades sensoriales. Además, estos también se encuentran en forma natural en muchos productos comestibles, por lo que a través de los años se ha comprobado la seguridad en su consumo. En este caso, la mayoría de los países no restringen el uso de estos aditivos tan conocidos y la única limitante que existe se relaciona con aspectos de aceptación de los productos que los contengan (Badui, 1999).

Producción de aditivos alimentarios

Los aditivos alimentarios son otro de los grandes descubrimientos que han posibilitado no sólo avanzar en la conservación, sino conseguir mejoras en el proceso de elaboración de los alimentos, modificar sus características organolépticas (las que se aprecian mediante los sentidos) y realizar mezclas (de grasa en agua, etc.) para crear nuevos productos que de forma natural no podrían obtenerse. Algunos aditivos son naturales y otros, de síntesis, elaborados en laboratorios. Muchos alimentos que consumimos hoy no podrían existir sin el empleo de aditivos alimentarios: más de dos terceras partes de los productos que consumimos los contienen. Los aditivos alimentarios son un recurso más de la tecnología alimentaria, y hay que recurrir a ellos cuando su utilización es estrictamente necesaria. Estas sustancias facilitan la disponibilidad de productos alimentarios durante cualquier época del año para un gran número de consumidores y en muchas ocasiones a bajo coste. Los aditivos alimentarios que normalmente se añaden a los alimentos son diversos.

Aditivos que mantienen la frescura e impiden el deterioro

Algunos aditivos alimentarios ayudan a mantener los alimentos frescos y saludables. Contribuyen a que dichos alimentos se puedan conservar durante más tiempo, protegiéndolos contra el deterioro provocado por la oxidación o los microorganismos. Se pueden dividir en dos categorías según cuál sea su función principal:

Antioxidantes

Evitan la oxidación de los alimentos e impiden el enranciamiento y la decoloración. Se utilizan en productos horneados, cereales, grasas y aceites, y en adere-

zos para ensaladas. Las industrias alimentarias intentan evitar la oxidación de los alimentos mediante diferentes técnicas, como el envasado al vacío o en recipientes opacos, pero también utilizando antioxidantes. Los antioxidantes pueden actuar por medio de diferentes mecanismos como: deteniendo la reacción en cadena de oxidación de las grasas; eliminando el oxígeno atrapado o disuelto en el producto o en el espacio que queda sin llenar en los envases, el denominado espacio de cabeza; eliminando las trazas de ciertos metales, como el cobre o el hierro, que facilitan la oxidación. Algunos antioxidantes importantes son:

- a) *E 300 Ácido ascórbico; E 301 Ascorbato sódico; E 302 Ascorbato cálcico; E 304 Palmitato de ascorbilo.* El ácido L-ascórbico es la vitamina C. El acetato y palmitato de ascorbilo se hidrolizan fácilmente en el organismo, dando ácido ascórbico y ácido acético o palmítico, respectivamente. En algunos países, entre ellos Estados Unidos, se utilizan como aditivos alimentarios sustancias semejantes al ácido ascórbico (ácido eritórbico), pero que no tienen actividad vitamínica.
- b) *E 306 Extractos de origen natural ricos en tocoferoles; E 307 Alfa-tocoferol; E 308 Gamma-tocoferol; E 309 Delta-tocoferol.* El conjunto de tocoferoles se llama también vitamina E. No obstante, el uso de tocoferoles como antioxidantes en un alimento no autoriza a indicar en su publicidad que ha sido enriquecido con dicha vitamina. El más activo como vitamina es el alfa, pero también el gamma tiene cierto valor. El menos activo es el delta, que tiene una actividad biológica como vitamina de sólo alrededor del 1% de la del alfa, aunque esta depende mucho también del método utilizado en su medida. Los tocoferoles sintéticos tienen una actividad vitamínica algo menor que los naturales, al ser mezclas de los dos isómeros posibles.
- c) *E 310 Galato de propilo; E 311 Galato de octilo; E 312 Galato de dodecilo.* Se usan como antioxidantes alimentarios desde los años cuarenta. Su desventaja tecnológica más importante es su poca resistencia al calentamiento, por lo que son poco útiles para proteger aceites de fritura o alimentos sometidos a un calor fuerte durante su fabricación, como las galletas o los productos de repostería. Por su parte, el galato de propilo es algo soluble en agua, y, en presencia de trazas de hierro, procedentes del alimento o del equipo utilizado en el procesado, da lugar a la aparición de colores azul oscuro poco atractivos.
- d) *E 320 Butil-hidroxi-anisol.* Este antioxidante sintético se utilizó inicialmente en la industria petrolífera. Desde los años cuarenta se utiliza como aditivo alimentario. Solamente es soluble en grasas y no en agua. Resulta muy eficaz en las grasas de fritura, ya que no se descompone o evapora, como hacen los

galatos o el BHT, pasando al producto frito y protegiéndolo. Se utiliza para proteger las grasas utilizadas en repostería, fabricación de galletas, sopas deshidratadas, etc., su seguridad ha sido discutida extensamente. No tiene acción mutagénica, pero es capaz de modular el efecto de ciertos carcinógenos sobre animales de experimentación, potenciando o inhibiendo su acción, en función del carcinógeno de que se trate.

- e) *E 321 Butil-hidroxi-tolueno (BHT)*. Es otro antioxidante sintético procedente de la industria petrolífera reciclado su uso como aditivo alimentario. Se utiliza prácticamente siempre mezclado con el BHA (E-320), tiene sus mismas aplicaciones y, en general, las mismas limitaciones legales.
- f) *E 512 Cloruro estannoso*. Puede utilizarse como aditivo exclusivamente para espárragos enlatados, aunque prácticamente no se utiliza. El estaño se absorbe muy poco en el tubo digestivo, lo que contribuye a su escasa toxicidad.

Conservantes

Las alteraciones de los alimentos por microorganismos es una de las causas más preocupantes en la industria alimentaria porque, además de descomponer grandes cantidades de nutrientes, pueden dar lugar a intoxicaciones graves. Por esta razón es muy importante el control del crecimiento microbiano de un alimento. Existen una serie de factores que influyen en el desarrollo de una alteración microbiana: tiempo, temperatura, pH, potencial redox, presión osmótica, contenido en “agua libre” (la fracción del agua total en la que tienen oportunidad de crecer los microorganismos), etc., conocer los límites de viabilidad de los microorganismos ha ayudado a establecer diferentes sistemas y condiciones que, aplicados al alimento, aseguran razonablemente su conservación. Se conocen como tratamientos físicos de conservación del alimento:

- a) *Tratamientos térmicos*: como pasteurización o esterilización. Persiguen la destrucción parcial o total de los microorganismos y enzimas que contiene un alimento, mediante altas temperaturas (80-115°C). Refrigeración y congelación: Estabilización del crecimiento y velocidades de reacción de algunos microorganismos, mediante bajas temperaturas.
- b) *Control del agua libre del medio*: Mediante métodos de concentración y desecación, se reduce el agua útil para el crecimiento microbiano.
- c) *Control de presión osmótica*: Operaciones como salados y confitados consiguen reducir el agua libre y la presión osmótica del medio limitando el crecimiento microbiano.

En algunos casos, la eliminación de microorganismos no puede hacerse por métodos físicos, lo que motiva el empleo de sustancias conservantes que actúan, química o bioquímicamente, sobre la célula del microorganismo, destruyendo su membrana, bloqueando su actividad enzimática o afectando su estructura genética. Los conservantes alimentarios, a las concentraciones autorizadas, no matan en general a los microorganismos, sino que solamente evitan su proliferación. Por lo tanto, sólo son útiles con materias primas de buena calidad.

Aditivos que aumentan o potencian cualidades sensoriales

Estos aditivos potencian el sabor y normalmente sólo se usan en productos de sabores fuertes y concentrados. El más común es el glutamato monosódico (E621), muy empleado en la cocina oriental. Algunas personas presentan intolerancia a este aditivo y desarrollan el “síndrome del restaurante chino”, que causa malas digestiones e incluso dolor de cabeza. También se usa en especias y en los cubitos de caldo. Los aditivos también se utilizan para conferir ciertas características a los alimentos, que mejoran su textura y facilitan su procesamiento, por ejemplo:

Modificadores de sabor y textura

- a) *Emulsionantes*: Se emplean para mantener la consistencia de la textura y evitar que se disgreguen los ingredientes en productos como la margarina. Algunos de estos aditivos son los biosurfactantes, obtenidos a partir de algunos microorganismos como bacterias lácticas (Sheppard y otros, 1987; Koch y otros, 1988; Daniel y otros, 1998; Fox y otros, 2000; Haba y otros, 2000, Abalos y otros, 2001).
- b) *Gelificantes*. Las sustancias capaces de formar geles se han utilizado en la producción de alimentos elaborados desde hace mucho tiempo. Entre las sustancias capaces de formar geles está el almidón y la gelatina. La gelatina, obtenida de subproductos animales, solamente forma geles a temperaturas bajas, por lo que cuando se desea que el gel se mantenga a temperatura ambiente, o incluso más elevada, debe recurrirse a otras sustancias. Los gelificantes de origen natural, poseen una gran fuerza de atracción con el agua, por lo que aumentan la viscosidad o espesan los alimentos. Algunos gelificantes usados en la industria alimentaria son: E-400 Ácido algínico; E-401 Alginato

sódico; E-402 Alginato potásico; E-403 Alginato amónico; E-404 Alginato cálcico; E-405 Alginato de propilenglicol. El ácido algínico se obtiene a partir de diferentes tipos de algas (*Macrocystis*, *Fucus*, *Laminaria*, etc.) extrayéndolo con carbonato sódico y precipitándolo mediante tratamiento con ácido.

Los geles que forman los alginatos son de tipo químico, y no son reversibles al calentarlos. Los geles se forman en presencia de calcio, que debe añadirse de forma controlada para lograr la formación de asociaciones moleculares ordenadas. Esta propiedad hace a los alginatos únicos entre todos los agentes gelificantes, y muy útiles para la fabricación de piezas preformadas con aspecto de gambas, trozos de fruta, rodajas de cebolla o manzana, etc., se pueden utilizar en conservas vegetales y mermeladas, en confitería, repostería y elaboración de galletas y en nata montada y helados. También se utiliza en la elaboración de fiambres, patés, sopas deshidratadas, para mantener en suspensión la pulpa de frutas en los néctares y en las bebidas refrescantes que la contienen, en salsas y como estabilizante de la espuma de la cerveza. El E-405 no está autorizado en muchas de estas aplicaciones. No se absorbe en el tubo digestivo, y tampoco se ve muy afectado por la flora bacteriana presente. Se ha acusado a los alginatos, así como a otros gelificantes, de disminuir la absorción de ciertos nutrientes, especialmente metales esenciales para el organismo como hierro o calcio. Esto sólo es cierto a concentraciones de alginato mayores del 4%, no utilizadas nunca en un alimento. Los alginatos no producen, que se sepa, ningún otro efecto potencialmente perjudicial.

- c) *Estabilizantes*. Se emplean para mantener la consistencia de la textura y evitar que se disgreguen los ingredientes en productos como la margarina. Se utilizan también otras sustancias, bastante complejas, obtenidas de vegetales o microorganismos indigeribles por el organismo humano. Por esta última razón, al no aportar nutrientes, se utilizan ampliamente en los alimentos bajos en calorías. Las gomas vegetales son productos obtenidos de exudados (resinas) y de semillas de vegetales, o producidas por microorganismos. Al contrario que las del grupo anterior, no suelen formar geles sólidos sino soluciones más o menos viscosas. Se utilizan, por su gran capacidad de retención de agua, para favorecer el hinchamiento de diversos productos alimentarios, para estabilizar suspensiones de pulpa de frutas en bebidas o postres, para estabilizar la espuma de cerveza o la nata montada, etc., en general son indigeribles por el organismo humano, aunque una parte es degradada por los microorganismos presentes en el intestino. Asimilables metabólicamente a la fibra dietética,

pueden producir efectos beneficiosos reduciendo los niveles de colesterol del organismo.

- d) *Espesantes*. Ayudan a incrementar la viscosidad de los alimentos. Se añaden a alimentos como los aderezos de ensaladas y los batidos de leche. Frecuentemente se utilizan como espesantes sustancias naturales como la gelatina o la pectina. El almidón actúa muy bien como espesante en condiciones normales, pero tiene tendencia a perder líquido cuando el alimento se congela y se descongela. Algunos derivados del almidón tienen mejores propiedades que este, y son también muy utilizados. Los derivados del almidón son nutricionalmente semejantes a él, aportando casi las mismas calorías. Algunos de estos productos no están bien definidos químicamente, al ser exudados de plantas, pero todos tienen en común el tratarse de cadenas muy largas formadas por la unión de muchas moléculas de azúcares más o menos modificados. Tienen propiedades comunes con el componente de la dieta conocido como “fibra”, aumentando el volumen del contenido intestinal y su velocidad de tránsito.
- e) *Edulcorantes*. Confieren un sabor dulce a los alimentos y se utilizan en productos bajos en calorías, como los productos para diabéticos. Los edulcorantes no calóricos, artificiales o naturales, son en este momento una de las áreas más dinámicas dentro del campo de los aditivos alimentarios, por la gran expansión que está experimentando actualmente el mercado de las bebidas bajas en calorías.

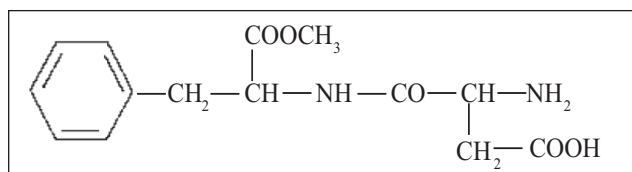
Para que un edulcorante natural o artificial sea utilizable por la industria alimentaria, además de ser inocuo, tiene que cumplir otros requisitos: el sabor dulce debe percibirse rápidamente y desaparecer también rápidamente además tiene que ser lo más parecido posible al del azúcar común, sin sabor. También tiene que resistir las condiciones del alimento en el que se va a utilizar, así como los tratamientos a los que se vaya a someter. El uso de edulcorantes artificiales ha sido objeto de múltiples polémicas por lo que respecta a su seguridad a largo plazo. La forma más adecuada de enfocar esta polémica es desde la perspectiva del balance riesgo-beneficio. El consumidor tiene que decidir si asume en algunos casos un riesgo muy remoto como contrapartida de las ventajas que le reporta el uso de determinados productos, ventajas que en este caso serían la reducción de las calorías ingeridas sin renunciar a determinados alimentos o sabores. También deben tenerse en cuenta los efectos beneficiosos sobre el organismo de la limitación de la ingesta calórica, especialmente en la prevención de los trastornos cardiovasculares y de ciertos procesos tumorales. Aunque el

efecto preventivo se produce fundamentalmente con la reducción del contenido de la grasa de la dieta, también puede contribuir la reducción del contenido energético global, y en este caso los edulcorantes artificiales serían una cierta ayuda. Por supuesto, son de gran interés para el mantenimiento de la calidad de vida de aquellas personas que por razones médicas tienen que controlar su ingestión de azúcares. Algunos edulcorantes importantes son:

1. *Ciclamato y sus sales*. Esta sustancia fue sintetizada por primera vez en 1937 y se utiliza como edulcorante artificial desde 1950. Es unas 50 veces más dulce que la sacarosa, y tiene un cierto sabor desagradable, que desaparece cuando se utiliza mezclado con la sacarina. Es muy estable y no le afecta la acidez ni el calentamiento. Su utilización fundamental está en las bebidas carbónicas. También se puede utilizar en yogures edulcorados y como edulcorante de mesa. El ciclamato como tal es menos soluble en agua que sus sales, que son las que se utilizan habitualmente.
2. *E 954. Sacarina y sus sales*. La sacarina fue sintetizada en 1878, descubriéndose accidentalmente su sabor dulce. Se utiliza como edulcorante desde principios del presente siglo. Es varios cientos de veces más dulce que la sacarosa. La forma más utilizada es la sal sódica, ya que la forma ácida es muy poco soluble en agua. Tiene un sabor amargo, sobre todo cuando se utiliza a concentraciones altas, pero este sabor puede minimizarse mezclándola con otras sustancias. Es un edulcorante resistente al calentamiento y a los medios ácidos, por lo que es muy útil en muchos procesos de elaboración de alimentos. En muchos países se utiliza en bebidas refrescantes, en yogures edulcorados y en productos dietéticos para diabéticos.
3. *E 951 Aspartamo*. Es el más importante de los nuevos edulcorantes artificiales. Fue sintetizado dentro de un programa de investigación sobre péptidos para uso farmacéutico, descubriéndose su sabor dulce de forma accidental en 1965. Después de un estudio exhaustivo acerca de su seguridad, se autorizó su uso inicialmente en Estados Unidos como edulcorante de mesa, aunque desde 1983 se autorizó en ese país como aditivo en una amplia serie de productos. En la figura 1 se aprecia la fórmula química del aspartamo.
 - Químicamente está formado por la unión de dos aminoácidos (fenilalanina y ácido aspártico), uno de ellos modificado por la unión de

una molécula de metanol. Aunque como tal no existe en la naturaleza, sí existen sus componentes, en los que se transforma durante la digestión. Es cientos de veces más dulce que el azúcar. Por esta razón, aunque a igualdad de peso aporta las mismas calorías aproximadamente que el azúcar, en las concentraciones utilizadas habitualmente este aporte energético resulta despreciable. El aspartamo no tiene ningún sabor, al contrario que los otros edulcorantes, y es relativamente estable en medio ácido, pero resiste mal el calentamiento fuerte, por lo que presenta problemas para usarse en repostería. El aspartamo se transforma inmediatamente en el organismo en fenilalanina, ácido aspártico y metanol.

Figura 1. Fórmula química del aspartamo



Fuente: elaboración propia.

- f) *Otros.* Además de los mencionados, este grupo incluye: *acidulantes, correctores de la acidez, antiaglomerantes, antiespumantes*, etcétera. Los acidulantes modifican la acidez de los alimentos retrasando el desarrollo de hongos y bacterias (ácido cítrico, ácido succínico, etc.), aumentan la vida útil de los alimentos. Gracias a ellos, no necesitamos realizar la compra tan a menudo y el precio de algunos alimentos es más barato, ya que se pueden producir a mayor escala (European Parliament and Council Directive, 1995).

Colorantes

El color es la primera sensación que se percibe de un alimento y la que determina el primer juicio sobre su calidad. Es también un factor importante dentro del conjunto de sensaciones que aporta el alimento y tiende a veces a modificar subjetivamente otras sensaciones como el sabor y el olor. Los alimentos naturales tienen su propio color, por lo que en principio parecería como ideal su mantenimiento a lo largo del proceso de transformación. Sin embargo, los consumidores prefieren en determinados alimentos un color constante, que no varíe entre los diferentes lotes de fabricación

de un producto. El coloreado también contribuye a la identificación visual del producto por parte del consumidor, y en muchos casos un buen proceso de coloreado puede condicionar el éxito o fracaso comercial de un producto (Klauri, 1981).

Por otra parte, existe una cierta tendencia a utilizar cuando es posible colorantes naturales en lugar de colorantes sintéticos, motivada por la presión de un sector importante de los consumidores. Analizado objetivamente, el coloreado de los alimentos es una actividad “cosmética”, que no contribuye a mejorar su conservación o calidad nutritiva, por lo que el nivel de riesgo aceptable para un beneficio pequeño ha de ser forzosamente muy bajo (Calvo Rebollar, 1991). No hay duda de que el color es importante en la percepción que el consumidor tiene de los alimentos, y frecuentemente se asocia a un sabor específico o a la intensidad de dicho sabor, (European Parliament and Council Directive, 1995; Saltmarsh, 2000).

- a) *Colorantes naturales*. La búsqueda de nuevos colorantes va encaminada a la aplicación de pigmentos de origen natural, ya que cada vez más el consumidor se fija en la composición de aquello que forma parte de su alimentación y reclama productos naturales (Cubero y otros, 2002). Los colorantes naturales son considerados en general como inocuos y consecuentemente las limitaciones específicas en su utilización son menores que las que afectan a los colorantes artificiales. Principales colorantes naturales:
 1. *E-100 Curcumina*, especia obtenida del rizoma de la planta del mismo nombre cultivada en la India. En tecnología de alimentos se utiliza, además del colorante parcialmente purificado, la especia completa y la oleorresina; en estos casos su efecto es también el de aromatizante. La especia es un componente fundamental del curry, al que confiere su color amarillo intenso característico. Se utiliza también como colorante de mostazas, en preparados para sopas y caldos y en algunos productos cárnicos. Es también un colorante tradicional de derivados lácteos. Se puede utilizar sin más límite que la buena práctica de fabricación en muchas aplicaciones, con excepciones como las conservas de pescado, en las que el máximo legal es 200 mg/kg, las conservas vegetales y el yogur, en las que es 100 mg/kg, y en el queso fresco, en el que este máximo es sólo 27 mg/Kg. El colorante de la curcuma se absorbe relativamente poco en el intestino, y aquel que es absorbido se elimina rápidamente por vía biliar. Tiene una toxicidad muy pequeña.
 2. *E-101 Riboflavina*. La riboflavina es una vitamina del grupo B, concretamente la denominada B2. Es la sustancia que da color amarillo al

suelo de la leche, alimento que es la principal fuente de aporte, junto con el hígado. Industrialmente la riboflavina se obtiene por síntesis química o por métodos biotecnológicos. Este aditivo es relativamente poco utilizado. Cuando se emplea como colorante no pueden hacerse indicaciones acerca del enriquecimiento vitamínico en la publicidad del alimento. Aunque es una vitamina, y por tanto esencial para el organismo, su deficiencia no produce una enfermedad específica, sino solamente una serie de alteraciones en la mucosa bucal que no suelen ser graves. Las necesidades de riboflavina para una persona normal se sitúan en torno a los 2 mg/día.

3. *E-120, Cochinilla, ácido carmínico.* El ácido carmínico, una sustancia química compleja, se encuentra presente en las hembras con crías de ciertos insectos de la familia *Coccidae*, parásitos de algunas especies de cactus. Los insectos que producen esta sustancia son muy pequeños hasta tal punto que hacen falta unos 100 mil para obtener 1 kg de producto, pero son muy ricos en colorante, alcanzando hasta 20% de su peso seco. El colorante se forma en realidad al unirse la sustancia extraída con agua caliente de los insectos, que por sí misma no tiene color, con un metal como el aluminio, o el calcio y para algunas aplicaciones (bebidas especialmente) con el amoníaco. Es probablemente el colorante con mejores características tecnológicas de entre los naturales, pero se utiliza cada vez menos debido a su alto precio.
4. *E-140 Clorofilas y E-141 Complejos cúpricos de clorofilas y clorofilinas.* Las clorofilas se utilizan poco como aditivos alimentarios, solo ocasionalmente en aceites, chicle, helados y bebidas refrescantes, en sopas preparadas y en productos lácteos. Su empleo está limitado, en el queso a 600 mg/Kg, solo el E-140, y en algunas conservas vegetales y yogures a 100 mg/kg. Estos colorantes se absorben muy poco en el tubo digestivo. No se ha establecido un límite máximo a la ingestión diaria de la clorofila utilizada como aditivo, ya que esta cantidad es despreciable frente a la ingerida a partir de fuentes naturales.
5. *E-150 Caramelo.* El caramelo es un material colorante de composición compleja y químicamente no bien definido, obtenido por calentamiento de un azúcar comestible (sacarosa y otros) bien sólo o bien mezclado con determinadas sustancias químicas.
6. *E-153 Carbón medicinal vegetal.* Este producto se obtiene, como su nombre indica, por la carbonización de materias vegetales en condiciones controladas. El proceso de fabricación debe garantizar la ausencia de ciertos hidrocarburos que podrían formarse durante el proceso de carbo-

nización y que son cancerígenos. Por ello debe cumplir unas normas de calidad muy estrictas, las que exige su uso para aplicaciones farmacéuticas. Como colorante tiene muy poca importancia, pero un producto semejante, el carbón activo, es fundamental como auxiliar tecnológico para decolorar parcialmente mostos, vinos y vinagres, desodorizar aceites y otros, usos. Este producto se elimina por filtración en la industria después de su actuación, y no se encuentra en el producto que llega al consumidor.

7. *E-160 Carotenoides.* (E-160 a Alfa, beta y gamma caroteno, E-160 b Bixina, norbixina (Rocou, Annato), E-160 c Capsantina, capsorrubina, E-160 d Licopeno, E-160 e Beta-apo-8'-carotenal, E-160 f Ester etílico del ácido beta-apo-8'-carotenoico). Los carotenoides y las xantofilas (E-161) son un amplio grupo de pigmentos vegetales y animales, del que forman parte más de 450 sustancias diferentes, descubriéndose otras nuevas con cierta frecuencia. Los carotenoides utilizados en la fabricación de alimentos se pueden obtener de residuos de cáscaras o por extracción de los vegetales que los contienen (el aceite de palma, por ejemplo, contiene un 0.1%, que puede recuperarse en el refinado) o, en el caso del beta-caroteno, beta-apo-8'-carotenal y ester etílico al ácido beta-apo-8'-carotenoico, por síntesis química. Los dos últimos no existen en la naturaleza.
 8. *E-162 Rojo de remolacha, betanina, betalaina.* Este colorante consiste en el extracto acuoso de la raíz de la remolacha roja (*Beta vulgaris*). Como tal extracto, es una mezcla muy compleja de la que aún no se conocen todos sus componentes. A veces se deja fermentar el zumo de la remolacha para eliminar el azúcar presente, pero también se utiliza sin más modificación, simplemente desecado. Aunque este colorante resiste bien las condiciones ácidas, se altera fácilmente con el calentamiento, especialmente en presencia de aire, pasando su color a marrón. El mecanismo de este fenómeno, que es parcialmente reversible, no se conoce con precisión. Se absorbe poco en el tubo digestivo. La mayor parte del colorante absorbido se destruye en el organismo, aunque en un cierto porcentaje de las personas se elimina sin cambios en la orina. Ante la preocupación del público por el uso de colorantes artificiales, el rojo de remolacha está ganando aceptación, especialmente en productos de repostería, helados y derivados lácteos dirigidos al público infantil.
- b) *Colorantes artificiales.* En los últimos años la preocupación por la seguridad de los alimentos, y la presión del público, ha llevado a muchas empresas a revisar la formulación de sus productos y sustituir cuando es tecnológicamente

factible los colorantes artificiales por otros naturales. Además, son más resistentes que los colorantes naturales. Precisamente la preocupación por su seguridad ha hecho que los colorantes artificiales hayan sido estudiados en forma exhaustiva por lo que respecta a su efecto sobre la salud, mucho más que la mayoría de los colorantes naturales. Ello ha llevado a reducir cada vez más el número de colorantes utilizables, aunque al contrario de lo que sucede en los otros grupos de aditivos, existan grandes variaciones de un país a otro. Por ejemplo, en los Países Nórdicos están prohibidos prácticamente todos los artificiales, mientras que en Estados Unidos no están autorizados algunos de los que se usan en Europa. Además cada colorante tiene por sí mismo un límite que varía según la sustancia de que se trate y del alimento en el que se utilice. La tendencia actual es a limitar más aún tanto los productos utilizables como las cantidades que pueden añadirse, (Calvo Rebollar, 1991).

- c) *Colorantes para superficies*. Estos colorantes se utilizan fundamentalmente para el recubrimiento de gageas y confites, de chicle y de las bolitas y otras piezas empleadas en la decoración de productos de pastelería, mezclados con azúcar o con otros aglutinantes como la goma arábica.

Aditivos alimentarios estimuladores del crecimiento

Los aditivos alimentarios son sustancias puras o mezclas que se adicionan intencionalmente a los alimentos para realizar una o varias funciones específicas. El término aditivo alimentario puede incluir todos los compuestos químicos inertes o activos, naturales o sintéticos, nutritivos o no que son directamente agregados a los alimentos (Carrillo y otros, 2000). El crecimiento de los organismos vivos es un fenómeno altamente complejo que envuelve una multitud de diferentes procesos que trabajan en armonía y participan en los momentos oportunos. El crecimiento es el incremento en sus medidas corporales que muestran todos los individuos durante su vida. Es el resultado de la incorporación de moléculas estructurales a una velocidad más rápida que la de degradación. Generalmente es el resultado de un aumento en el tamaño de las células individuales y un aumento en el número de células o ambos. En el campo de la nutrición está considerado como un factor de crecimiento o promotor del crecimiento, cualquier elemento que al ser incorporado a la dieta en pequeñas cantidades, sin variar considerablemente su composición, logra una aceleración del crecimiento que se refleja en aumento de talla y peso corporal. Para ser efectivas estas sustancias deben tener la condición de mantener su integridad durante el proceso de digestión y lograr ser absorbidas de forma eficaz para ejercer su función en los tejidos blancos (Carrillo y otros, 2000).

Mecanismos posibles de estimulación del crecimiento mediante el uso de aditivos alimentarios

Se conoce comparativamente poco sobre la forma en que el crecimiento de células y órganos se regula en los organismos multicelulares. La regulación del crecimiento parece estar controlada primeramente por la coordinación entre la progresión del ciclo celular y la sobrevivencia de la célula (Conlon y Raff, 1999). El crecimiento total y en algunos casos el tamaño de las células está también afectado por la disponibilidad de nutrientes. Muchos organismos han desarrollado estrategias especiales de sobrevivencia en periodos de deficiencias alimentarias (Bohni y otros, 1999). Existen algunos aditivos alimentarios que estimulan el crecimiento: 1) Los que actúan directamente en los mecanismos fisiológicos del proceso (hormonas) (Conlon y Raff, 1999). Aminoácidos, péptidos (Cancre y otros, 1995) y compuestos nitrogenados de bajo peso molecular y 2) Los que estimulan el crecimiento de forma indirecta (antibióticos, inmunomoduladores, probióticos, antioxidantes, enzimas digestivas (Maugle y otros, 1982; Forrellat, 1998), atractantes y estimuladores del apetito). Por ejemplo: en los camarones al igual que en todos los crustáceos, el proceso de crecimiento se produce de forma discontinua y cíclica debido al fenómeno de la muda o ecdisis. Cada vez que el organismo está preparado para aumentar de talla y peso, el viejo exoesqueleto es liberado rápidamente y es producida una nueva capa quitinosa que tenderá a endurecerse hasta adquirir la consistencia y dureza del exoesqueleto anterior. Durante este proceso el cuerpo del camarón ha absorbido agua y la división celular se ve favorecida provocando el incremento de volumen y peso del animal (Van Wormhoudt y Bellon-Humbert, 1995). El crecimiento está determinado por factores intrínsecos y extrínsecos. Las medidas corporales para los camarones están genéticamente determinadas (Browdy, 1998) pero lograrlas depende del aporte de alimento y de la capacidad del animal para hacer un uso eficiente del mismo. En los animales sometidos a cultivo artificial influyen además factores ambientales y de manipulación.

Entre los métodos empleados para estudiar los potenciales estimuladores de crecimiento han estado los de cultivos celulares. Los métodos de disociación tisular se han utilizado para investigar los efectos *in vitro* de factores de crecimiento y de factores de diferenciación. Así Giard y otros (1998) estudiaron la insulina, el factor de crecimiento tipo insulina I, el factor básico de crecimiento de fibroblastos y el factor de crecimiento epidérmico en células de la glándula digestiva del *Pecten maximus*. Estos péptidos indujeron un aumento en la incorporación de ³H-leucina y ¹⁴C-uridina en las suspensiones celulares. Los resultados indicaron que los péptidos relacionados con la insulina podían actuar como factores de crecimiento en moluscos.

Referencias

- Abalos, A.; A. Pinazo; M.R. Infante; M. Casals; F. García and A. Manresa (2001), "Physicochemical and Antimicrobial Properties of New Rhamnolipids Produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from Soybean Oil Refinery Wastes", *Langmuir*, 17, pp. 1367-1371.
- Abe, S. and M. Takagi (1991). "Simultaneous Saccharification and Fermentation of Cellulose to Lactic Acid, *Biotechnol, Bioeng*, 37, pp. 93-96.
- Arti Dumbrepatil, Mukund Adsul, Shivani Chaudhari, Jayant Khire and Digambar Gokhale (2008), "Utilization of Molasses Sugar for Lactic Acid Production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* Mutant Uc-3 in Batch Fermentation", *Appl, Environ, Microbiol*, vol 74(1), pp. 333-335.
- Badui, S. (1999), *Química de los alimentos*, México, Pearson Educación, p. 138.
- Böhni, R.; J. Riesgo Escobar; S. Oldham; W. Brogiolo; H. Stocker; B.F. Andruss; Beckingham and E. Hafen (1999), "Autonomous Control of Cell and Organ Size by CHICO, a Drosophila Homolog of Vertebrate", *IRSI-4, Cell* 97, pp. 865-875.
- Browdy, C.L. (1998), "Recent Developments in Penaeid Broodstock and Seed Production Technologies: Improving the Outlook for Superior Captive Stocks", *Aquaculture*, 64, pp. 3-21.
- Bustos, G.; A.B. Moldes; J.L. Alonso and M. Vazquez (2004), "Optimization of D-lactic Acid Production by *Lactobacillus coryniformis* Using Response Surface Methodology", *Food Microbiol.* 21(2), pp. 143-148.
- Bustos, G.; A.B. Moldes; J.M Cruz and J.M. Dominguez (2005), "Evaluation of Hemicellulosic Sugars from Vine-Trimming Wastes and Vinification Lees as a Nutritional Medium for Lactic Acid Production by *Lactobacillus pentosus*", *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 4(4), pp. 283-291.
- Calvo Rebollar Miguel (1991), *Aditivos alimentarios. Propiedades, aplicaciones y efectos sobre la salud*, Zaragoza, Mira Editores, 155 pp.
- Cancre, I.; A. Van Wormhoudt and Y. Le Gal (1995), "Effects of Cellular Growth Factors on Crustacean Hepatopancreas Cell Suspensions", *Biotechnol, J. Mar*, 2, pp. 83-87.
- Carrillo, O., F. Vega Villasante; H. Nolasco y N. Gallardo (2000), "Aditivos alimentarios como estimuladores del crecimiento de camarón. Avances en Nutrición Acuícola V", *Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*, Mérida, noviembre, 2000.
- Chen, R. and Y.Y. Lee (1997), "Membrane-Mediated Extractive Fermentation for Lactic Acid Production from Cellulosic Biomass", *Appl. Biochem. Biotechnol*, 63 (65), pp. 435-448.

- Conlon, I. and M. Raff (1999), "Size Control in Animal Development", *Cell*, 96, pp. 235-244.
- Cruz, J.M. and J.C. Parajó (1998), "Improved Astaxanthin Production by *Xanthophyllomyces dendrorhous* Growing on Enzymatic Wood Hydrolysates Containing Glucose and Cellobiose", *Food Chem*, 4 (63), pp. 479-484.
- Cruz, J.M.; J.M. Domínguez; H. Domínguez and J.C. Parajó (2000 a), "Xylitol Production from Barley Bran Hydrolysates by Continuous Fermentation with *Debaryomyces hansenii*", *Biotechnol., Lett*, 22, pp. 1895-1898.
- _____ (2000 b), "Preparation of Fermentation Media from Agricultural Wastes and their Bioconversion Into Xylitol", *Food Biotechnol*, 14, pp. 79-97.
- Cruz, J.M., A.B. Moldes, G. Bustos, A. Torrado, J.M. Domínguez (2007), "Integral Utilization of Barley Husk for the Production of Food Additives", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87, pp. 1000-1008.
- Cubero Nuria; Albert Monferrer y Jordi Villalta (2002), *Aditivos alimentarios*, Madrid, Ediciones Mundi-Prensa, A. Madrid Vicente, pp. 49, 53, 67.
- Daniel, H.J.; M. Reuss and C. Sylatk (1998), "Production of Sphorolipids in High Concentration from Deproteinized Whey and Rapeseed Oil in a Two Stage Fed Batch Process Using *Candida bombicola* ATCC 22214 and *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509", *Biotechnol*, 20, pp. 1153-1156.
- European Parliament and Council Directive 87/107/EEC (1988), "On the Approximation of the Laws of the Member States Concerning Food Additives Authorized for Use in Foodstuffs Intended for Human Consumption", *Official Journal of the European Communities*, L40, 11.2.89, 27-33.
- European Parliament and Council Directive 95/2/EC (1995), "On Food Additives Other than Colours or Sweeteners", *Official J. European Communities*, L61, 18/3/95, pp. 1-40.
- Forrellat, A. (1998), "El hepatopáncreas de camarón: fuente de enzimas digestivas para la camaronicultura", Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas, Cuba, Universidad de La Habana.
- Fox, S.L. and G.A. Bala (2000), "Production of Surfactant from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 Using Potato Substrates", *Biores. Technol*, 75, pp. 235-240.
- Giard, W., J.M. Lebel, E. BoucaudCamou and P. Favrel (1998), "Effect of Vertebrado Growth Factors on Digestive Gland Cells From the Mollusc *Pecten maximus* L. an *in vitro* study", *Physiol., B*, 168, pp. 81-6.
- González Infantino, C.A. (1983), *Aditivos alimentarios*, Buenos Aires, Bol. Acad. Nac. Medicina, (supl.), pp. 13-32.

- Haba, E.; M.J. Espuny; M. Busquets and A. Manresa (2000), "Screening and Production of Rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBI40044 From Waste Frying Oils", *Appl. Microbiol*, 88, pp. 379-387.
- Hofvendahl, K.; C. Akerberg and G. Zacchi (1999 a), "Simultaneous Enzymatic Wheat Starch Saccharification and Fermentation to Lactic Acid by *Lactococcus lactis*", *Appl. Biochem. Biotechnol*, 52, pp. 163-169.
- Klauri, K. (1981), "Some Aspects of Colour in Man", in *Criteria of Food Acceptance: How Man Chooses What He Eats*, Solms (ed.), Zurich, J. and Hall, R. L. Forster Verlag AG Publishing.
- Koch, A.; K.J. Reiser; O. Kapelli and A. Fiechter (1988), "Genetic Construction of Lactose-Utilizing Strains of *P. aeruginosa* and Their Application in Biosurfactant Production", *Biotechnol*. 6, pp. 1335-1339.
- Luo, J; L. Xia; J. Lin and P. Cen (1997), "Kinetics of Simultaneous Saccharification and Lactic Acid Fermentation Processes", *Biotechnol. Progress*, 13, pp. 762-767.
- Maugle, R.D.; O. Deshimaru; T. Katayama and K.L. Simpson (1982), "Characteristics of Amylase and Protease of the Shrimp *Penaeus japonicus*", *Bull Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 48, pp. 1753-1757.
- Moldes, A.B.; J.L. Alonso; J.C. Parajó (1999), "Cogeneration of Cellobiose and Glucose From Pretreated Wood and Bioconversion to Lactic Acid: a Kinetic Study", *J. Bioscience Bioengin*, 87, pp. 787-792.
- Moldes, A.B.; J.L. Alonso and J.C. Parajó (2001), "Strategies to Improve the Bioconversion of Processed Wood Into Lactic Acid by Simultaneous Saccharification and Fermentation", *J. Chem. Technol. Biotechnol*, 76(3), pp. 279-284.
- Moldes, A.B.; J.M. Cruz; J.M. Domínguez and J.C. Parajó (2002), "Production of a Cellulosic Substrate Susceptible to Enzymatic Hydrolysis from Prehidrolized Barley Husks", *Agr. Food Sci. Finland*, 11(1), pp. 51-58.
- Parajó, J.C.; J.L. Alonso; A.B. Moldes (1997) "Production of Lactic Acid From Lignocellulose in a Single Stage of Hydrolysis and Fermentation", *Food Biotechnol*, 11, pp. 45-58.
- Patel, M.M. and R.M. Bhatt (1992), "Optimisation of the Alkaline Peroxide Pretreatment for the Delignification of Wheat Straw and its Applications", *J. Chem. Technol. Biotechnol*, 53, pp. 253-263.
- Ramsay, J.A.; M.C. Hassan and B.A. Ramsay (1998), "Biological Conversion of Hemicellulose to Propionic Acid", *Enzyme Microbiol. Biotechnol*, 22(4), pp. 292-295.
- Rivas B; A.B. Moldes; J.M. Dominguez and J.C. Parajo (2004), "Lactic Acid Production from Corn Cobs by Simultaneous Saccharification and Fermentation: a Mathematical Interpretation", *Enzyme And Microbial Technology*, vol. 34 (7), pp. 627-634.

- Saltmarsh Mike (2000), *Essential Guide to Aditivos Alimentarios*, Leatherhead Food RA Publishing (ed.), England, Randalls Road, Leatherhead, Surrey KT22 7RY, pp. 1-322.
- Schmidt, S. and N. Padukone (1997), "Production of Lactic Acid from Wastepaper as a Cellulosic Feedstock", *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 18, pp. 10-14.
- Shen X.L. and L.M. Xia (2006), "Lactic Acid Production From Cellulosic Waste by Immobilized Cells of *Lactobacillus delbrueckii*", *World Journal Of Microbiology & Biotechnology*, vol. 22(11), pp. 1109-1114.
- Sheppard, J.D.; C.N. Mulligan (1987), "The Production of Surfactin by *Bacillus subtilis* Grown on Peat Hydrolysate", *Appl. Microb. Biotechnol.*, 27, pp. 110-116.
- Silva, Silvio S.; Solange I. Mussatto; Júlio C. Santos, Diego T. Santos and Juliana Polizel (2006), "Cell Immobilization and Xylitol Production Using Sugarcane Bagasse as Raw Material", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 141, pp. 215-228.
- Sreenath, H.K.; A.B. Moldes; R.G. Koegel and R.J. Straub (2001a), "Lactic Acid Production by Simultaneous Saccharification and Fermentation of Alfalfa Fiber", *J. Bioscience Bioengin.*, 92(6), pp. 518-523.
- Sreenath, H.K.; A.B. Moldes; R.G. Koegel and R.J. Straub (2001 b), "Lactic Acid Production From Agriculture Residues", *Biotechnol. Lett.*, 23(3), pp. 179-184.
- Takashi Ueno, Yasuhiro Ozawa, Masaki Ishikawa, Kotoyoshi Nakanishi and Toshinori Kimura (2003), "Lactic Acid Production Using Two Food Processing Wastes, Canned Pineapple Syrup and Grape Invertase, as Substrate and Enzyme", *Biotechnology Letters*, 25, pp. 573-577.
- Tran, C.T.; L.I. Sly and D.A. Mitchel (1998), "Selection of a Strain of *Aspergillus* for the Production of Citric Acid from Pineapple Waste in Solid-State Fermentation", *World J. Microbiol. Biotechnol.* 14, pp. 399-404.
- Xie, G. and T.P. West (2004), "Fungal Citric Acid Production by *Aspergillus niger* ATCC 26550", *Abstract*, 39th Midwest Regional Meeting of the American Chemical Society, Manhattan.
- Young Jung, Wee, Kim Jin-Nam and Ryu Hwa Won (2005), "Utilization of Sugar Molasses for Economical L(+)-lactic Acid Production by Batch Fermentation of *Enterococcus faecalis*", *Enzyme and Microbial Technology*, Manhattan, vol. 35, (6-7), pp. 568-573.
- Van Wormhoudt, A. y C. Bellon Humbert (1995), "Bases biológicas del cultivo de crustáceos: Muda", en *Bases biológicas y ecológicas de la acuicultura*, Barnabé, G. (ed.), Acribia, pp. 237-249.
- Venkatesh, K.V. (1997), "Simultaneous Saccharification and Fermentation of Cellulose to Lactic Acid", *Biores. Technol.*, 62(3), pp. 91-98.

World Health Organisation (1987), “Principles for the Safety Assessment of Food Aditives and Contaminants in Food, Environmental Health Criteria 70”, International Programme on Chemical Safety (IPCS) in cooperation with the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Aditives (JECFA). World Health Organisation, Geneva.

**La biotecnología moderna, herramienta
complementaria al mejoramiento
genético convencional de cultivos agrícolas;
análisis actual y perspectiva**

*Modern biotechnology, complementary tool
to conventional breeding of cultivated; crops current
analysis and perspective*

*J.E. Cervantes Martínez;¹ M.G. Bustos Vázquez;¹
M.A. García Delgado;¹ H. Mata Vázquez¹*

Resumen

El arte del fitomejoramiento fue desarrollado mucho antes de que se descubrieran las leyes de la herencia. La llegada de los principios de la genética a comienzos del siglo pasado capitalizó el crecimiento del mejoramiento genético, convirtiéndolo en una tecnología basada en la ciencia que ha sido muy sustancial en las mejoras de plantas cultivadas. En gran medida y a través de la explotación de vigor híbrido, el rendimiento de grano de varios cultivos de cereales aumentó sustancialmente. Hibridaciones intervarietales e interespecíficas, junto con manipulaciones citogenéticas apropiadas, han sido útiles en la transferencia de genes de resistencia a las enfermedades y plagas de insectos, de donantes extraños hacia variedades de cultivos. El mejoramiento de plantas se ha acelerado con el uso de herramientas biotecnológicas de transferencia de genes, al “introducir” nuevos rasgos en las plantas que son muy difíciles de fijar por métodos tradicionales.

¹ Unidad Académica Multidisciplinaria Mante. Universidad Autónoma de Tamaulipas. Blvd. E. Cárdenas 1201, Cd. Mante Tamaulipas, e-mail: jecervan@uat.edu.mx

La exitosa implementación de introducir los transgénicos para combatir plagas de insectos y enfermedades de cultivos importantes como introducir el arroz (*Oryza sativa* L.), trigo (*Triticum aestivum* L.), maíz (*Zea mays* L.), cebada (*Hordeum vulgare* L.), soya (*Glycine max* L.) y algodón (*Gossypium hirsutum* L.) son algunos de los ejemplos más importantes. La biofortificación de cultivos constituye otro desarrollo no menos importante en la lucha contra el hambre global y la malnutrición. El arroz dorado, genéticamente enriquecido con vitamina A y hierro, tiene potencial de salvar millones de vidas. Además, otra aplicación importante de la tecnología transgénica es la producción de vacunas comestibles contra enfermedades mortales. Se menciona cómo los nuevos procedimientos para la transferencia de genes pueden complementar efectivamente los programas de mejoramiento convencional. La resistencia actual a la aceptación de esta novedosa tecnología se debe analizar profundamente y tomar conciencia si en verdad puede ser muy útil su uso en el mejoramiento de cultivos con el consecuente beneficio para la alimentación mundial, principalmente para los países pobres.

Abstract

The art of Plant breeding as art was developed before the laws of genetics became known. The advent of the principles of genetics at the beginning of the last century catalyzed the growth of breeding, making it a science-based technology that has been instrumental in substantial improvements in crop plants. Largely through exploitation of hybrid vigor, grain yields of several cereal crops were substantially increased. Intervarietal and interspecific hybridizations, coupled with appropriate cytogenetic manipulations, proved useful in moving genes for resistance to diseases and insect pests from suitable alien donors into crop cultivars. Plant improvement has been further accelerated by biotechnological tools of gene transfer, to incorporate new traits into plants that are very difficult to introduce by traditional breeding. The successful deployment of transgenic approaches to combat insect pests and diseases of important crops like rice (*Oryza sativa* L.), wheat (*Triticum aestivum* L.), maize (*Zea mays* L.), barley (*Hordeum vulgare* L.), soybean (*Glycine max* L.) and cotton (*Gossypium hirsutum* L.) is a remarkable accomplishment. Biofortification of crops constitutes another important development in tackling global hunger and malnutrition. Golden Rice, genetically enriched with vitamin A and iron, has, for example, the real potential of saving millions of humans. Yet another important application of transgenic technology is in the production of edible vaccines

against deadly diseases. How these novel approaches to gene transfer can effectively supplement the conventional breeding programs is described. The current resistance to acceptance of this novel technology should be assessed and overcome so that its full potential in crop improvement can be realized, having as a consequence a great food benefit to the world population, mainly for these of poor countries.

Introducción

Un factor clave en la evolución de las civilizaciones humanas fue el suministro constante de alimentos, ya que la producción de alimentos es, por lo tanto, la profesión más antigua de la humanidad. Los procesos de cultivo y de la selección eran parte integral de la actividad humana. Aunque el fitomejoramiento practicado por los primeros pobladores se desarrolló esencialmente como un arte, su base científica se estableció con el redescubrimiento de las leyes de la genética a comienzos del siglo pasado. De esta forma con la aplicación de los principios de la genética a la mejora de los cultivos, el periodo de 1930 a 1970 fue testigo de un aumento fenomenal en los rendimientos de los cultivos, especialmente de granos de cereales (Khush, 1999). En gran medida a través de la explotación del vigor híbrido, el maíz (*Zea mays* L.), mijo perla [*Pennisetum glaucum* L. y el sorgo [*sorgo bicolor* (L.) Moench] registraron un aumento considerable en los rendimientos de grano durante 1965 a 1990 (Jauhar y otros, 2006). Las variedades mejoradas de trigo y arroz con menor altura de planta desarrollados mediante la incorporación de genes de enanismo en la década de 1960 y 1970, lanzaron la famosa revolución verde en Asia (Khush, 1999). Alrededor del mismo periodo, el advenimiento de las herramientas de citogenética facilitó en gran medida la hibridación y transferencias de genes mediante la incorporación de cromosomas de especies silvestres en cultivos agrícolas (Jiang y otros, 1994; Fedak, 1999).

El desarrollo en las últimas dos décadas de herramientas innovadoras de transferencia de genes, denominadas colectivamente “ingeniería genética”, agregó nuevas dimensiones a los esfuerzos de los fitomejoradores. La ingeniería genética se define como cualquier herramienta no convencional encaminada a movilizar información genética específica de uno de los miembros del reino vegetal o dicho sea de paso de, cualquier organismo a otro. Cabe agregar que cualquier herramienta no convencional hoy en día puede por supuesto ser convencional en el futuro. Estas técnicas asexuales de la biotecnología ayudan a “incorporar” en plantas nuevos caracteres que son muy difíciles de introducir por mejoramiento convencional. Las técnicas moleculares, incluyendo los métodos de ADN recombinante, implican la introducción de un ADN extraño bien caracterizado en las células de la planta receptora por medio de callos

embriogénicos regenerables para transformar permanentemente la composición genética de la planta. La ingeniería genética tiene el potencial para acelerar el mejoramiento de cultivos, dando resultados alentadores (Sharma y otros, 2004). El Valor agregado de características incorporadas en plantas cultivadas incluye la resistencia a enfermedades fungosas, virales y biofortificación del estado nutricional (Bajaj y Mohanty, 2005). Sin embargo, como en cualquier nueva tecnología, la ingeniería genética está encontrando resistencia de algunos sectores de la opinión pública. Hay preocupaciones sobre los posibles efectos adversos de organismos genéticamente modificados (GM) en alimentos u organismos sobre la salud humana y el medio ambiente. A pesar de que algunas de las preocupaciones públicas pueden no estar bien fundadas, es necesario abordarlo correctamente. Para aliviar algunos de estos temores, percibidos o reales, se requiere realizar un mejor trabajo para informar al público, esta es la razón del porqué, algunas de estas cuestiones se plantean en el presente documento. El objetivo principal de esta revisión es destacar los logros obtenidos y el potencial de la tecnología transgénica en la producción de alimentos así como una herramienta biotecnológica complementaria para el fitomejoramiento y discutir sus perspectivas y los retos que se avecinan.

El fitomejoramiento como arte y ciencia

El mejoramiento de plantas tiene como objetivo la explotación de la variabilidad genética existente y la generación, manipulación y combinación de nueva variabilidad en las plantas de formas más útiles para los seres humanos. Aunque hoy en día se entiende bien la base genética y citogenética del fitomejoramiento, debemos recordar sin embargo, que el arte del fitomejoramiento se desarrolló mucho antes de que se conocieran los principios de la genética y la citogenética definidas por Mendel (1822-1884). Así, el mejoramiento de plantas fue y sigue siendo esencialmente un ejercicio en la manipulación de material genético vegetal para provecho de la humanidad. Con el descubrimiento (o redescubrimiento) de las leyes de la genética a comienzos del siglo XX, el proceso de fitomejoramiento se aceleró considerablemente y se convirtió en una tecnología basada en la ciencia. Los principios de la genética encuentran aplicación inmediata en el mejoramiento de cultivos, como se ilustra en unos pocos ejemplos descritos a continuación.

Vigor híbrido

El rendimiento de grano de los cultivos de cereales principales, es decir, trigo, maíz, sorgo y arroz, aumentaron constantemente desde 1930, principalmente debido

a la mejora genética de estos cultivos (Duvick, 1984; Fehr, 1984). En gran parte debido a la explotación del vigor híbrido, los rendimientos de maíz en Estados Unidos registraron un aumento fenomenal desde 1966 kg ha⁻¹ de 1930 a 4841 kg en 1982 (del USDA “estadística agrícola”). Como consecuencia el rendimiento mundial del maíz aumentó a una tasa de 0.7% anual durante el periodo de 1982 a 1990 (Duvick, 1992). La explotación de vigor híbrido sigue siendo el medio más adecuado para aumentar el rendimiento de grano relativamente rápido (Vasal y otros, 2006).

La revolución verde

El mejoramiento para alto rendimiento de variedades de trigo y arroz, desarrollado en la década de 1960 y 1970 inició la revolución verde en Asia. Un producto del esfuerzo internacional sin precedentes, la revolución verde es sin duda uno de los logros más importantes del siglo xx. Se lograron avances en las cosechas de trigo y el arroz con el desarrollo de variedades de enanismo, caracterizado por la resistencia al acame y de la capacidad de respuesta a N (Swaminathan, 1993; Borlaug, 1998). Por lo tanto, la introducción de genes de enanismo por mejora convencional revolucionó la producción de trigo y el arroz en Asia, evitando la muerte por inanición a escala masiva.

Mejoramiento nutricional

Además de los rendimientos de grano, mejorar la calidad nutricional de los cultivos de alimentos tales como cereales es un objetivo importante porque 900 millones de personas en todo el mundo están desnutridas de acuerdo con los informes más recientes de la FAO (información disponible en www.fao.org/english/newsroom/news). El incremento nutricional del maíz se logró principalmente por mejora convencional, y la utilización de híbridos resultó ser extremadamente importante para el desarrollo exitoso de maíz de calidad proteínica (MCP) (Vasal y otros, 2006). El desarrollo del maíz MCP fue un importante avance científico, cuyos frutos están siendo cosechados por varios países en desarrollo. Variedades de sorgo con proteína de alta digestibilidad, así como alto contenido de lisina se están desarrollando y ofrecen perspectivas para la combinación de alta calidad nutricional y rendimiento de grano (Reddy y otros, 2006).

Aplicaciones generales en la mejora de plantas

Las herramientas de la citogenética han desempeñado un papel fundamental para acelerar el mejoramiento de cultivos. Por lo tanto, la comprensión del apareamiento de los cromosomas y la manipulación del genoma y sus relaciones entre y dentro de las especies de plantas, como la poliploidía, aneuploidía y haploidía, por nombrar algunos, han ayudado enormemente al fitomejoramiento. Las líneas homocigóticas derivadas de haploides proporcionan un medio rápido para lograr homocigosidad, lo cual permite acelerar los programas de mejoramiento. La comprensión de las afinidades genómicas facilita la planificación de programas de hibridación eficaces diseñados para transferir genes deseados o agrupar genes de especies exóticas para desarrollar variedades superiores de plantas cultivadas. La ingeniería de cromosomas, que impliquen la manipulación del apareamiento de cromosoma en plantas cultivadas poliploides, conduce a la recombinación fructífera de genomas enteros, partes de genomas o segmentos de cromosoma, resultando en variedades superiores. Esta forma de fitomejoramiento implica, en esencia, reconstrucciones genómicas para satisfacer necesidades humanas.

Especies silvestres como fuentes de genes

Los cultivos de cereales (trigo, arroz, maíz, cebada, avena, centeno, sorgo y mijo perla) representan dos tercios de la oferta mundial de alimentos (Borlaug, 1998). La domesticación y mejora de los cereales han sido principalmente por selección junto con el mejoramiento convencional, y variedades mejoradas de estos cultivos se han producido principalmente por la reorganización y combinación de genes desde dentro de la función principal del gene. Parientes silvestres de cultivos también son depósitos de genes para rasgos superiores, que pueden ser incorporados en especies de cultivos a través de la hibridación amplia. Técnicas citogenéticas son útiles en cuanto a tales transferencias de genes extraños. Así por ejemplo en 1956, Ernest Sears logró en trigo la inserción en el cromosoma 6B, de un pequeño segmento de cromosoma de *Aegilops umbellulata* Zhuk, el cual contenía un gene de resistencia a la roya de la hoja (causada por *Puccinia tritici* Eriks.) (Sears, 1956). Este trabajo pionero anunció una era de utilización, por manipulación de cromosoma, de recursos silvestres con genes para la mejora de las plantas cultivadas. Durante las últimas décadas, hibridaciones interespecíficas e intergenéricas se han usado ampliamente para desarrollar variedades de trigo con mejor rendimiento agronómico, tolerancia a plagas y altos rendimientos (Friebe y otros, 1996).

Ingeniería de cromosomas

Maíz, cebada, sorgo y arroz se encuentran entre los cereales importantes. Son esencialmente diploides (o diploidizados) en su comportamiento citogenético y se prestan a la manipulación por herramientas citogenéticas y mejora tradicional. Maíz y mijo, siendo de polinización cruzada y, por tanto, con la enorme diversidad genética, ofrecen enormes posibilidades para la heterosis para rendimientos más altos y calidad nutricional (Vasal y otros, 2006; Jauhar y otros, 2006). Así, la producción de MCO (maíz de alta calidad proteica) con alta lisina desarrollado hace cinco décadas, tiene el potencial de contribuir a aliviar la malnutrición entre los pobres que tienen al maíz como una fuente primaria de alimento (Vasal, 2002).

Biotecnología moderna

El enriquecimiento de cultivos vegetales por métodos convencionales (Duvick, 1984), a veces asistida por selección usando marcadores genéticos (Dubcovsky, 2004) y la hibridación amplia junto con la manipulación de apareamiento de cromosomas (Friebe y otros, 1996; Fedak, 1999) han sido claramente útiles en la producción de variedades superiores de cultivos; sin embargo, estos procedimientos son lentos, ya que el mejoramiento convencional puede tardar 10 o más años para transferir un rasgo de una especie donante hacia una receptora. La hibridación amplia es sin duda, un medio eficaz para la incorporación de genes extraños deseables en variedades de cultivos, pero tiene varias limitaciones. Por ejemplo la transmisión de los cromosomas extraños con segmentos no deseados y las interacciones genéticas adversas pueden conducir a la esterilidad y al fracaso del esfuerzo. Por lo tanto, se han explorado otros medios eficaces de transferencia de genes.

El amanecer de la ingeniería genética

Recientes herramientas biotecnológicas de la transferencia directa de los genes ayudan a construir en plantas nuevos tipos que son muy difíciles de transferir por programas convencionales de mejoramiento genético. Los principales cultivos del mundo se están transformando por incorporación directa de ADN mediante bombardeo de microproyectiles y otros métodos de transferencia directa de genes (Gelvin, 2003; Altpeter y otros, 2005). Los requisitos principales para las transformaciones genéticas eficaces son: *i*) regeneración *in vitro*; *ii*) sistema de inserción de ADN y *iii*) introducción de ADN funcional.

Regeneración *in vitro*

Un sistema de regeneración *in vitro* eficiente debe normalizarse antes de introducir el ADN exógeno en células individuales. Una limitación importante para la transformación genética en cereales ha sido la falta de una eficaz regeneración *in vitro* por la embriogénesis somática. Protoplastos preparados a partir de cultivos en suspensión derivados de embrión de inmaduros de mijo perla, por ejemplo, estuvieron entre las primeras células de cereales que mostraron poseer totipotencia (Vasil y Vasil, 1980). Más tarde, se desarrollaron procedimientos de regeneración para embriones inmaduros, inflorescencias jóvenes y anteras (Vasil, 1987), y hoy en día la mayoría de estos explantes de tejidos o células se utilizan para la transformación (Repellin y otros, 2001; Cho y otros, 2004). Con base en ello, la normalización de un protocolo de regeneración adecuado de trigo duro de células (Bommineni y Jauhar, 1996) facilitó la producción de un transgénico de trigo duro (Bommineni y otros, 1997). Desde entonces varios trabajos se han realizado de transformación de trigo duro (Pellegrineschi y otros, 2002) que permitió la incorporación de este cereal importante de rasgos de valor agregado. Por tanto, la eficacia de la regeneración varía entre especies y a menudo entre cultivares de la misma especie, razón por la cual la regeneración de cultivos específicos y sus protocolos de transformación tendrán que establecerse para obtener mejores resultados (Machii y otros, 1998).

Introducción y distribución de ADN funcional

La transferencia de genes en plantas se ha logrado a través de electroporación (Shillito, 1999), tratamiento de polietilenglicol (Funatsuki y otros, 1995), bombardeo de partículas (Altpeter y otros, 2005) y por medio de *Agrobacterium* (Komari y Kubo, 1999; Gelvin, 2003), entre otros. Los primeros cereales transgénicos de arroz y maíz se produjeron por medio protoplastos cultivados en los que el ADN exógeno fue introducido por electroporación (Shimamoto y otros, 1989) o por el tratamiento de polietilenglicol (Zhang y Wu, 1988). El método más usado de inserción de ADN en tejidos de la planta es el bombardeo de partículas o biolística, que facilita la introducción simultánea de varios genes (Vasil y otros, 1992). Chen y otros, (1998), por ejemplo, logró la co-introducción de 13 de los genes en el arroz. La técnica de microproyectiles se ha convertido en un método importante para la transformación de cereales y para el estudio de la expresión génica y regulación (Klein y Jones, 1999). Para la exitosa comercialización de cultivos transgénicos, es necesaria una expresión estable y consistente del o los gene(s) de interés (Kathuria y otros, 2003).

Se han reportado varios casos de silenciamiento de transgenes en plantas (Yu y Kumar, 2003), tanto de monocotiledóneas (Lyer y otros, 2000) como de dicotiledóneas (Fu y otros, 2005). Mecanismos de genes silenciadores están ahora bajo estudio para aprender a evitar este fenómeno.

Transformación genética

En el mejoramiento genético tradicional es notoriamente lenta la transferencia de un rasgo deseado a una planta de cultivo ya que depende de la fuente del gene y la distancia evolutiva de ese origen a la planta del cultivo destinado. Si el origen del gene es una variedad criolla o una especie relacionada, la transferencia de genes puede tomar de cinco a ocho años si no es que más. Barreras post-fertilización pueden impedir la hibridación sexual entre el donante y las especies de cultivos y agravar el problema de las transferencias de genes extraños. En algunos casos, no puede incluso ser posible incorporar un cierto rasgo por medios convencionales, porque un donante adecuado puede no estar disponible o, si lo está, puede ser imposible la hibridación entre la especie donante y la receptora. La ingeniería genética ofrece una excelente herramienta para insertar asexualmente uno o varios genes bien caracterizados de organismos no relacionados en las células de la planta, que, en la regeneración, producen plantas completas con el gene(s) insertado que se integra en su genoma. Este proceso puede tardar menos de un año a unos 18 meses en algunos casos, por lo tanto permite acelerar el proceso de mejora genética de las plantas cultivadas. Además, esta tecnología permite el acceso a un grupo de genes ilimitado sin la restricción de compatibilidad sexual. Por ejemplo, se ha demostrado la transformación genética por bombardeo de microproyectiles en trigo y otros cereales (Dahleen y otros, 2001; Altpeter y otros, 2005). A continuación se describen algunas instancias de esta forma de mejorar rápidamente los cultivos.

Resistencia a plagas de insectos

Numerosas plagas de insectos atacan a las plantas cultivadas y causan enormes pérdidas, amenazando la seguridad alimentaria mundial. El barrenador Europeo del maíz BEM, *Ostrinia nubilalis* (Hübner)] por ejemplo, provoca una pérdida de hasta 2000 millones de dólares anualmente en Estados Unidos (Hyde y otros, 1999.) El mejoramiento genético para resistencia por medios convencionales es complejo y lleno de incertidumbre. Para mejorar una variedad de maíz con resistencia al BEM puede

también tomar 10 a 15 años por mejoramiento tradicional, siempre y cuando esté disponible un donante adecuado de resistencia. Así, a través de 12 años de mejoramiento, Syngenta, una empresa Sueca de productos agroquímicos, era capaz de producir una variedad de maíz con sólo 10% de resistencia a la BEM; sin embargo, el gene de una bacteria del suelo, *Bacillus thuringiensis* (Bt), cuando menos en el genoma del maíz, confiere casi completa resistencia al BEM. Se trata de un medio eficaz de eliminar la aplicación de daños y pesticidas de plagas sin afectar al rendimiento de grano. Por lo tanto, el maíz Bt adquirió la capacidad de un pesticida. Esto llevó a Syngenta sólo cinco años para poner a funcionar el gene Bt en maíz.

Los híbridos de maíz Bt habían sido de 4 a 8% superiores en rendimiento de grano en comparación con híbridos estándar cuando eran ambos infestadas con el BEM (Lauer y Wedberg, 1999). Además, el maíz Bt es beneficioso para el medio ambiente y la resistencia de insecto inducida por Bt en maíz es mucho más segura para los agricultores y otros trabajadores de campo, en comparación con el uso de un insecticida químico. Basándose en datos de la seguridad, la U.S. Environmental Protection Agency (EPA) autorizó la siembra comercial de variedades de maíz Bt (Palevitz, 2001). En las regiones templadas del mundo (Sharma y otros, 2004), se han introducido varios cultivos transgénicos con genes de insecticidas. Las variedades de arroz transgénico resistentes al barrenador del tallo amarillo [*Scirpophaga incertulas* (Walker)] se han producido en la India (Ramesh y otros, 2004).

Debido a su mayor productividad y a los efectos positivos en la salud a través de la reducción de pesticidas, el algodón Bt ha sido comercializado agresivamente especialmente en países asiáticos como China (Huang y otros, 2002a) y la India (Whitfield, 2003). Carriere y otros, (2003) encontró supresión regional a largo plazo del gusano rosado del algodón [*Pectinophora gossypiella* (Saunders)] por el algodón Bt. El arroz Bt tiene el potencial para eliminar las pérdidas de rendimiento causadas por insectos lepidópteros, estimados en un 2 a 10% de rendimiento de arroz anual de Asia del total de 523 millones de toneladas anuales producidas.

Resistencia a las enfermedades

Diversas enfermedades micóticas, bacterianas y víricas, plantean una grave amenaza para la seguridad alimentaria mundial. El fitomejoramiento convencional ofrece un medio útil de mejoramiento de variedades resistentes a las enfermedades, siempre y cuando exista un donante confiable de resistencia. La ingeniería de cromosomas a través de la hibridación amplia se ha empleado con éxito para transferir genes de resistencia específica de la enfermedad de los donantes extraños a variedades de trigo (Friebe y

otros, 1996; Jauhar, 2006). Sin embargo, la resistencia a través de estas técnicas de mejoramiento puede ser no muy durable. En estos casos las herramientas biotecnológicas son muy prometedoras para acelerar este proceso y obtener productos estables.

La tecnología transgénica también ofrece una excelente opción para proteger las plantas de cultivo contra patógenos virales devastadores. La transformación de las plantas con secuencias de nucleótidos derivados de genomas virales ha demostrado ser efectiva para proporcionar protección contra diversos virus de plantas cultivadas. Esta novedosa técnica abrió nuevas vías de control de las enfermedades virales (Lomonosoff, 1995) en el cultivo de plantas y árboles frutales. El virus mosaico amarillo de arroz (VMAA) es una enfermedad viral grave, causando enormes pérdidas en las cosechas de arroz. Debido a la falta de una solución a este problema por métodos convencionales, se desarrolló un transgénico que tuvo éxito por producir resistencia a la VMAA. Esta misma técnica ha ayudado a controlar virus anillado de la papaya (VAP) en la papaya (*Carica papaya L.*) en Hawaii (Gonsalves, 1998; Ferreira y otros, 2002) y la industria de papaya se libró de desastre planteado por VAP (Gonsalves, 2003).

Tolerancia a estrés abiótico

El estrés abiótico, incluyendo la sequía y la salinidad, se estiman que causan pérdidas de rendimiento en todo el mundo, de más del 50% (Bray y otros, 2000). Enfoques transgénicos ofrecen una opción para mejorar la sequía (Abebe y otros, 2003) y tolerancia a sales (Flowers, 2004). Aunque varios estreses abióticos plantean una limitación de rendimientos de cultivos como el trigo, la sequía es una de las principales causas de la pérdida de rendimiento y es muy difícil mejorar para tolerancia a la sequía a través del mejoramiento convencional. Abebe y otros, (2003) demostraron que el trigo diseñado con el gene de la *Escherichia coli* había mejorado la tolerancia al estrés hídrico y la salinidad. Garg y otros, (2002) mostró sobreexpresión de trehalosa de *E. coli* con genes biosintéticos (*otsA* y *otsB*) como un gene de fusión proporciona mayor tolerancia al estrés abiótico en arroz, resultando en la elevada capacidad para la fotosíntesis en virtud de la sequía y las condiciones de estrés de baja temperatura. Por lo tanto, la tecnología transgénica tiene la posibilidad de incorporar genes para tolerancia a estrés abiótico, en cultivos de cereales. La ingeniería genética en conjunción con el mejoramiento asistido por marcadores moleculares en el mejoramiento tradicional podría ayudar a la tolerancia de la planta de acumular genes contra los estreses abióticos (Vinocur y Altman, 2005).

Biofortificación de cultivos para combatir la deficiencia nutricional

Alrededor de 842 millones de personas en todo el mundo están desnutridos. La mayoría de estas personas viven en los países pobres de Asia y África. Por lo tanto, la mejora del valor nutritivo de los cultivos de alimentos debe ser una alta prioridad para aliviar las deficiencias de proteínas, minerales y vitaminas, además de aumentar el rendimiento de las cosechas. La deficiencia de hierro, la deficiencia dietética más común entre las naciones pobres, afecta especialmente a los niños y las mujeres en edad reproductiva. En las mujeres embarazadas, la anemia severa puede causar retraso del crecimiento fetal y a gran escala de las defunciones maternas (Gillespie, 1998). Se sabe que casi 400 millones de personas en el mundo pueden estar en riesgo de deficiencia de la vitamina A, lo que conduce a la ceguera y la muerte prematura. Unos 100 a 250 millones de niños menores de cinco años sufren deficiencia de vitamina A, y medio millón de niños sufren ceguera parcial o total cada año (Conway y Toenniessen, 1999; Toenniessen, 2000).

Es muy difícil mejorar la deficiencia nutricional, en particular para el hierro y vitamina A, mediante el mejoramiento de cultivos tradicionales; sin embargo se están haciendo esfuerzos hacia biofortificación de plantas de cultivo mediante herramientas de la biotecnología, y a la fecha se han aumentado los niveles de nutrientes esenciales. La ingeniería genética se ha empleado para aumentar el contenido de micronutrientes en el arroz, el alimento estable de más de un tercio de la población mundial. Los granos de arroz no suelen contener β -caroteno, que es el precursor de la vitamina A sin embargo, contienen geranylgeranyl pirofosfato, que puede ser convertido secuencialmente a β -caroteno por cuatro de las enzimas. Por ingeniería genética se han desarrollado arroces ricos en vitamina A, así como en hierro (Ye y otros, 2000). El arroz resultante, llamado “arroz dorado”, tiene el potencial de salvar millones de vidas y evitar la ceguera entre millones de niños y por lo tanto, se conoce como los “granos de esperanza”. Se han producido otros transgénicos de arroz con la mejora de la calidad nutricional en las especies Japónica e Indica (Datta y otros, 2003), y esta estrategia se aplica a otros cultivos de cereales (Poletti y otros, 2004).

Resistencia a la aceptación de la biotecnología moderna

Tal como se describe anteriormente, las herramientas de la biotecnología moderna ya han producido resultados alentadores en la aceleración del mejoramiento de cultivos en términos de resistencia a las plagas de insectos y enfermedades, tolerancia a los estreses abióticos, y cultivos de mejora nutricional de los alimentos (Cook, 2000). Además, esta tecnología tiene aplicaciones potenciales en la producción de

vacunas de alimentos, en genética, decafeinización de café y podría tener varias otras aplicaciones importantes. Tales modificaciones genéticas o mejoras en las plantas de cultivo serían imposibles de alcanzar por las herramientas convencionales de mejoramiento. Lamentablemente, sin embargo, esta tecnología relativamente nueva enfrenta a la resistencia de algunos sectores. Se han hecho intentos para crear temor acerca de los posibles efectos adversos de los alimentos modificados genéticamente sobre la salud humana y el medio ambiente (Borlaug, 2000; Marris, 2001; Falk y otros, 2002; Jauhar y Khush, 2002) en la medida en que los materiales GM de experimentación se han destruido (Pilcher, 2003b). Aunque las preocupaciones o quizás ideas falsas de ciertos grupos pueden no ser válidos, estas cuestiones deben abordarse adecuadamente para satisfacer al público en general. A continuación se analizan algunas de los peligros de percepción de la tecnología transgénica.

Cuestiones de salud humana

Una preocupación importante es la posibilidad o la percepción de los riesgos de salud planteados por los alimentos modificados genéticamente. Sin embargo, el registro de seguridad de los cultivos transgénicos y sus productos demuestra su salubridad. No hay ningún informe hasta ahora de cualquier persona enferma por consumir alimentos transgénicos, pues millones de personas los consumen todos los días. En Estados Unidos, más del 60% de todos los alimentos procesados contienen ingredientes transgénicos. Existe evidencia contundente que la bacteria *B. thuringiensis* y los cultivos transgénicos expresando genes no suponen una amenaza para la salud del mamífero (de Maagd y otros, 2005).

Contaminación genética de plantas relacionadas

Otra gran preocupación es el potencial para el movimiento no deseado de un transgene de una planta de cultivos modificados genéticamente a sus parientes, ya sea cultivada o silvestre. Así, un transgene para resistencia a herbicidas podría incorporarse a un pariente silvestre, creando una “súper maleza” que podría ser difícil de controlar. Existe la posibilidad de tal contaminación genética a través de un transgene extraviado en algunos casos (Messeguer, 2003; Stewart y otros, 2003; Armstrong y otros, 2005), pero en la mayoría de los casos, no es probable que ocurra debido a la dificultad de hibridación entre una planta de cultivos transgénicos y sus parientes silvestres y la necesidad de rescate embrionario para obtener un híbrido en

condiciones de laboratorio. Sin embargo, se produce algún flujo de genes de arroz transgénico a sus parientes silvestres o a otros cultivares de arroz (Zhang y otros, 2003; Chen y otros, 2004), pero esto no debería ser un grave motivo de preocupación. Varios genes de resistencia a los insectos plagas y enfermedades por ejemplo, se han transferido al arroz cultivado mediante mejoramiento tradicional. Sin embargo, cabe señalar, que hasta ahora no hay ningún caso conocido donde biotipos de arroz silvestre o malas hierbas de arroz, como el arroz rojo, se hayan convertido en más resistentes por contaminación con arroz cultivado (High y otros, 2004).

Conclusión y perspectivas

De la información y el análisis crítico que se proporciona en este artículo, resalta el papel de la biotecnología moderna en mejoramiento genético de plantas, ambos cultivos de plantas y árboles. La biotecnología ha hecho rápidos progresos desde que entró en vigor hace unos 25 años y ya se han producido las primeras plantas transgénicas. En la actualidad, se cuenta con protocolos de transformación fiable y eficaz para una variedad de plantas, que incluyen cereales, leguminosas de grano, cultivos de forraje, oleaginosas, cultivos de fibra, plantas ornamentales y árboles forestales. La transformación genética ofrece acceso directo a un grupo ilimitado de genes deseables no previamente accesibles a los mejoradores. La correcta implementación de transgénicos enfocados para luchar contra las plagas de insectos y enfermedades de cultivos importantes como arroz, trigo, maíz, cebada soya y algodón, son pruebas de ello. Nuevas variedades resistentes a plagas en cultivos genéticamente modificados pueden contribuir al incremento en los rendimientos y el crecimiento agrícola en muchos países en desarrollo beneficiando a los agricultores en pequeña escala (Qaim y Zilberman, 2003). El Maíz genéticamente modificado se ha sembrado en más de 15 millones de hectáreas. Las pérdidas multimillonarias de las plagas de insectos sufridas por los agricultores de algodón se han reducido por el uso del algodón Bt (Walker Simmons, 2003). Cultivos transgénicos de Bt que producen bio-insecticidas se cultivaron en más de 62 millones de hectáreas en todo el mundo desde 1996 hasta 2002 (Tabashnik y otros, 2003).

La biofortificación de cultivos para reducir o aliviar la malnutrición entre las masas empobrecidas constituye otro aspecto importante. Así, el desarrollo de arroz dorado, que está genéticamente enriquecido con vitamina A y hierro, tiene potencial para salvar millones de vidas en los países empobrecidos, es una realidad importante en la lucha contra el problema del hambre mundial. Mediante el mejoramiento convencional, los rasgos superiores de arroz dorado pueden ser transferidos a otras variedades de arroz adaptadas en los países en desarrollo. Países como la India ya han iniciado

programas para mejorar las cualidades nutricionales en las variedades de arroz popular (Potrykus, 2001; Sharma y otros, 2003). Otra aplicación de la tecnología transgénica es en la producción de vacunas comestibles para la inmunización contra enfermedades mortales como la hepatitis B o la tuberculosis, dos de las enfermedades graves de las masas pobres de África, y América Latina después de Asia.

En 2009, los mil millones de hectáreas de cultivos producto de la biotecnología se han sembrado en todo el mundo y ahora cubren el equivalente del 40% de la superficie de la tierra de Estados Unidos; sin embargo, como en cualquier otra nueva tecnología, la ingeniería genética no está libre de adversarios, algunos de los cuales incluso intentan destruir materiales experimentales. Este fanatismo (Borlaug, 2000) y la hostilidad pública a la biotecnología moderna es atribuida a la “falta de alfabetización científica” (Bucchi y Neresini, 2004) y puede impedir el progreso humano. Los oponentes de la nueva tecnología de trabajan en la premisa de que la biotecnología vegetal es antinatural, insegura, y que resulta en productos nocivos. Sin embargo, queda el hecho indiscutible de que el fitomejoramiento convencional es una forma de ingeniería genética, que se ha practicado durante siglos por la humanidad para la producción de alimentos. En última instancia, cualquier actividad de mejoramiento implica cambios en el nivel de ADN. Por lo tanto, parece ridículo criticar el alterar genéticamente los cultivos con biotecnología actual cuando fundamentalmente lo hemos estado haciendo por tanto tiempo con mejoramiento convencional. No hay evidencia para sugerir que los alimentos modificados genéticamente representen amenaza a la seguridad humana, por tanto el trabajo que debe hacerse es informar y tranquilizar a la opinión pública sobre los beneficios globales de los cultivos transgénicos.

Así, la biotecnología moderna está y va a seguir desempeñando un papel importante en el bienestar humano, en general y en la mejora de la planta, en particular. Ahora la biotecnología y el fitomejoramiento convencional deben ser complementarias y no reemplazadas una por la otra, para acelerar el mejoramiento de cultivos y garantizar la seguridad alimentaria mundial. De esta forma, cuando se implemente cuidadosamente la biotecnología moderna se convertirá en un complemento integral de fitomejoramiento convencional y su enorme potencial deberá aprovecharse para la mejor ventaja de toda la raza humana, rica o pobre.

Referencias

- Abebe, T.; A.C. Guenzi; B. Martin and J.C. Cushman (2003), “Tolerance of Mannitol-Accumulating Transgenic Wheat to Water Stress and Salinity”, *Plant Physiol*, 131, pp. 1748-1755.

- Altpeter, F.; A. Varshney; O. Abderhalden; D. Douchkov; C. Sautter; J. Kimlehn; R. Dudler and P. Schweizer (2005), “Stable Expression of a Defense-Related Gene in Wheat Epidermis Under Transcriptional Control of a Novel Promoter Confers Pathogen Resistance”, *Plant Mol. Biol.*, 52, pp. 271-283.
- Armstrong, T.T.; R.G. Fitzjohn; L.E. Newstrom; A.D. Wilton and W.G. Lee (2005), “Transgene Escape: What Potential for Crop-Wild Hybridization?”, *Mol. Ecol.*, 14, pp. 2111-2132.
- Bajaj S. and A. Mohanty (2005), “Recent Advances in Rice Biotechnology-Towards Genetically Superior Transgenic Rice”, *Plant Biotech. J.*, 3, pp. 275-307.
- Bommineni, V.R. and P.P. Jauhar (1996), “Regeneration of Plantlets through Isolated Scutellum Culture of Durum Wheat”, *Plant Sci.*, 116, pp. 197-203.
- _____ and T.S. Peterson (1997) “Transgenic Durum Wheat by Microprojectile Bombardment of Isolated Scutella”, *J. Hered.*, 88, pp. 475-481.
- Borlaug, N.E. (1998), “Feeding a World of 10 Billion People: The Miracle Ahead”, *Plant Tiss. Cult. Biotech.*, 3, pp. 119-127.
- _____ (2000), “Ending World Hunger. The Promise of Biotechnology and the Threat of Antiscience Zealotry”, *Plant Physiol.*, 124, pp. 487-490.
- Bray, E.A.; J. Bailey Serres and E. Weretilnyk (2000), “Responses to Abiotic Stresses”, in *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, W. Gruissem y otros (ed.), Rockville, Am. Soc. of Plant Physiol., pp. 1158-1249.
- Bucchi, M. and F. Neresini (2004), “Why Are People Hostile to Biotechnologies?”, *Science*, 3004, p. 1749.
- Carrière, Y.; C. Eilers Kirk; M. Sisterson; L. Antilla; M. Whitlow; T.J. Dennehy and B.E. Tabashnik (2003), “Long-Term Regional Suppression of Pink Bollworm by *Bacillus thuringiensis* Cotton”, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, United States, 100, pp. 1519-1523.
- Chen, L.; P. Marmey; N.J. Taylor; J.P. Brizard; C. Espinoza; P. D’Cruz; H. Huet; S. Zhang; A. de Krochko; R.N. Beachy and C.M. Fauquet (1998), “Expression and Inheritance of Multiple Transgenes in Rice Plants”, *Nat. Biotechnol.*, 16, pp. 1060-1064.
- Chen, L.J.; D.S. Lee; Z.P. Song; H.S. Suh and B.R. Lu (2004), “Gene Flow From Cultivated Rice (*Oryza sativa*) to its Weedy and Wild Relatives”, *Ann. Bot.*, London, 93, pp. 67-73.
- Cho, M.J.; H. Yano; D. Okamoto; H.K. Kim; H.R. Jung; K. Newcomb; V.K. Le; H.S. Yoo; R. Langham; B.B. Buchanan and P.G. Lemaux (2004), “Stable Transformation of Rice (*Oryza sativa* L.) via Microprojectile Bombardment of Highly Regenerative, Green Tissue Derived From Mature Seed”, *Plant Cell Rep.*, 22, pp. 483-489.

- Conway, G. and G. Toenniessen (1999), "Feeding the World in the Twenty-First Century", *Nature Suppl.*, 402, pp. C55-C58.
- Cook, R.J. (2000), "Science-Based Risk Assessment for the Approval and Use of Plants in Agricultural and Other Environments", in *Agricultural Biotechnology and the Poor: Proc. of an Int. Conf.*, G.J. Persley and M.M. Lantin (ed.), Washington, pp. 123-130.
- Dahleen, L.S.; P.A. Okubara and A.E. Blechl (2001), "Transgenic Approaches to Combat Fusarium Head Blight in Wheat and Barley", *Crop Sci.*, 42, pp. 628-637.
- Datta, K.; N. Baisakh; N. Oliva; L. Torrizo; E. Abrigo; J. Tan; M. Rai; S. Rehana; S. Al-Babili; P. Beyer; I. Potrykus and S.K. Datta (2003), "Bioengineered 'Golden' Indica Rice Cultivars with β -Carotene Metabolism in the Endosperm with Hygromycin and Mannose Selection Systems", *Plant Biotech. J.*, 1, pp. 81-90.
- De Maagd, R.A., Bravo, and N. Crickmore (2005), Bt Toxin Not Guilty by Association, *Nat. Biotechnol.*, 23, p. 791.
- Dubcovsky, J. (2004), "Marker-Assisted Selection in Public Breeding Programs: The Wheat Experience", *Crop Sci.*, 44, pp. 1895-1898.
- Duvick, D.N. (1984), "Progress in Conventional Plant Breeding", in *Gene Manipulation in Plant Improvement*, J.P. Gustafson (ed.), New York, Plenum Press, pp. 17-31.
- _____ (1992), "Genetic Contributions to Advances in Yield of US Maize", *Maydica*, 37, pp. 69-79.
- Falk, M.C.; B.M. Chassy; S.K. Harlander; T.J. Hoban; M.N. McGloughlin and A.R. Akhlaghi (2002), "Food Biotechnology: Benefits and Concerns", *J. Nutr.*, 132, pp. 1384-1390.
- Fedak, G. (1999), "Molecular Aids for Integration of Alien Chromatin Through Wide Crosses", *Genome*, 42, pp. 584-591.
- Fehr, W.R (ed.) (1984), "Genetic Contributions to Yield Grains of Five Major Crop Plants", *Special Publ.*, Wisconsin, no. 7, CSSA.
- Ferreira, S.A., K.Y. Pitz; R. Manshardt; F. Zee; M. Fitch and D. Gonsalves (2002), "Virus Coat Protein Transgenic Papaya Provides Practical Control of Papaya Ringspot Virus in Hawaii", *Plant Dis.*, 86, pp. 101-105.
- Flowers, T.J. (2004), "Improving Crop Salt Tolerance", *J. Exp. Bot.*, 55, pp. 307-319.
- Friebe, B.; J. Jiang; W.J. Raupp; R.A. McIntosh and B.S. Gill (1996), "Characterization of Wheat-Alien Translocations Conferring Resistance to Diseases and Pests: Current Status", *Euphytica*, 91, pp. 59-87.
- Fu, D.Q.; B.Z. Zhu; H.L. Zhu; W.B. Jiang and Y.B. Luo (2005), "Virus-Induced Gene Silencing in Tomato Fruit", *Plant J.*, 43, pp. 299-308.

- Funatsuki, H.; M. Kuroda; P.A. Lazzeri; E. Muller; H. Lorz and I. Kishinami (1995), "Fertile Transgenic Barley Generated by Direct Transfer to Protoplasts", *Theor. Appl. Genet.*, 91, pp. 707-712.
- Garg, A.K.; J.K. Kim; T.G. Owens; A.P. Ranwala; Y.D. Choi; L.V. Kochain and R.J. Wu (2002), "Trehalose Accumulation in Rice Plants Confers High Tolerance Levels to Different Abiotic Stresses", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, United States, 99, pp. 15898-15903.
- Gelvin, S.B. (2003), "Agrobacterium-Mediated Plant Transformation: The Biology Behind the "Gene-Jockeying" Tool", *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 67, pp. 16-37.
- Gillespie, S. (1998), "Major Issues in the Control of Iron Deficiency. The Micronutrient Initiative and UNICEF", *The Micronutrient Initiative*, Ottawa.
- Gonsalves, D. (1998), "Control of Papaya Ring Spot Virus in Papaya: A Case Study", *Annu. Rev. Phytopathol.*, 36, pp. 412-437.
- _____ (2003), "Transgenic Papaya: A Case Study on the Theoretical and Practical Application of Virus Resistance", in *Plant Biotechnology 2002 and Beyond*, I.K. Vasil (ed.), The Netherlands, Kluwer Academic Publ., p. 115-118.
- High, S.M.; M.B. Cohen; Q.Y. Shu and I. Altosaar (2004), "Achieving Successful Deployment of Bt Rice", *Trends Plant Sci.*, 9, pp. 286-292.
- Huang, J.; S. Rozelle; C. Pray and Q. Wang (2002a), "Plant Biotechnology in China", *Science*, 295, pp. 674-677.
- Hyde, J.; M.A. Martin; P.V. Preckel and C.R. Edwards (1999), "The Economics of Bt Corn: Valuing Protection From the European Corn Borer", *Rev. Agric. Econ.*, 21, pp. 442-454.
- Jauhar, P.P. (2006), "Cytogenetic Architecture of Cereal Crops and their Manipulation to Fit Human Needs: Opportunities and Challenges", in *Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement*, vol. 2, R.J. Singh and P.P. Jauhar (eds.), Boca Raton, CRC Taylor & Francis Press, pp. 1-25.
- Jiang, J.; B. Friebe and B.S. Gill (1994), "Recent Advances in Alien Gene Transfer in Wheat", *Euphytica*, 73, pp. 199-212.
- Kathuria, J.; A. Mohanty and A.K. Tyagi (2003), "Analysis of Inheritability and Expression Profile of Single and Multi-Copy Transgene(s) in Rice Over Generations", *J. Plant Biochem. Biotechnol.*, 12, pp. 103-107.
- Khush, G.S. (1999), "Green Revolution: Preparing for the 21st Century", *Genome*, 42, pp. 646-655.
- Klein, T.M. and T.J. Jones (1999), "Methods of Genetic Transformation: The Gene Gun", in *Molecular Improvement of Cereal Crops*, I.K. Vasil (ed.), London, Kluwer Academic, pp. 21-42.

- Komari, T. and T. Kubo (1999), "Methods of Genetic Transformation: *Agrobacterium tumefaciens*", in *Molecular Improvement of Cereal Crops*, I.K. Vasil (ed.), London, Kluwer Academic, pp. 43-82.
- Lauer, J. and J. Wedberg (1999), "Grain Yields of Initial Bt Corn Hybrid Introductions to Farms in the Northern Corn Belt", *J. Prod. Agric.*, 12, pp. 373-376.
- Lomonosoff, G.P. (1995), "Pathogen-Derived Resistance to Plant Viruses", *Annu. Rev. Phytopathol.*, 33, pp. 323-343.
- Lyer, L.M.; S.P. Kumpatla; M.B. Chandrasekharan and T.C. Hall (2000), "Transgene Silencing in Monocots", *Plant Mol. Biol.*, 43, pp. 323-346.
- Maagd, R.A.; A. Bravo and N. Crickmore (2005), "Bt Toxin not Guilty by Association", *Nat. Biotechnol.*, 23, p. 791.
- Machii, H.; H. Mizuno; T. Hirabayashi; H. Li and T. Hagio (1998), "Screening Wheat Genotypes for High Callus Induction and Regeneration Capability from Anther and Immature Embryo Cultures", *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 53, pp. 67-74.
- Marris, C. (2001), "Public Views on GMOS: Deconstructing the Myths", *EMBO Rep.*, 2, pp. 545-548.
- Messeguer, J. (2003), "Gene Flow Assessment in Transgenic Plants", *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 73, pp. 201-212.
- Palevitz, B.A. (2001), "EPA Reauthorizes Bt Corn", *Scientist*, 15, p.11.
- Pellegrineschi, A.; R.M. Brito; L. Velazquez; L. Noguera; M.W. Pfeiffer; S. McLean and D. Hoisington (2002), "The Effect of Pretreatment with Mild Heat and Drought Stresses on the Explant and Biolistic Transformation Frequency of Three Durum Wheat Cultivars", *Plant Cell Rep.*, 20, pp. 955-960.
- Pilcher, H.R. (2003 b), "GM Experiment Vandalized", *Nature News Service/Macmillan Magazines Ltd.*, 19 June.
- Poletti, S.; W. Gruissem and C. Sautter (2004), "The Nutritional Fortification of Cereals", *Curr. Opin. Biotechnol.*, 15, pp. 162-165.
- Potrykus, I. (2001), "Golden Rice and Beyond", *Plant Physiol.*, 125, pp. 1157-1161.
- Qaim, M. and D. Zilberman (2003), "Yield Effects of Genetically Modified Crops in Developing Countries", *Science*, 299, pp. 900-902.
- Ramesh, S.; D. Nagadhara; V.D. Reddy and K.V. Rao (2004), "Production of Transgenic Indica Rice Resistant to Yellow Stem Borer and Sap-Sucking Insects, Using Super-Binary Vectors of *Agrobacterium tumefaciens*", *Plant Sci.*, 166, pp. 1077-1085.
- Reddy, B.V.S.; S. Ramesh and P.S. Reddy (2006), "Sorghum Genetic Resources, Cytogenetics, and Improvement", in "Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement", R.J. Singh and P.P. Jauhar (eds.), Boca Raton, CRC Taylor & Francis Press, Cereals, vol. 2, pp. 309-363.

- Repellin, A.; M. Båga; P.P. Jauhar and R.N. Chibbar (2001), “Genetic Enrichment of Cereal Crops by Alien Gene Transfers: New Challenges”, in *Reviews of Plant Biotechnology and Applied Genetics*, The Netherlands, Kluwer Academic Publ., pp. 159-183.
- Sears, E.R. (1956), “The Transfer of Leaf-Rust Resistance from *Aegilops umbellulata* to Wheat”, *Brookhaven Symp. Biol.*, 9, pp. 1-22.
- Sharma, H.C.; K. Sharma and J. Crouch (2004), “Genetic Transformation of Crops for Insect Resistance: Potential and Limitations”, *Crit. Rev. Plant Sci.*, 23, pp. 47-72.
- Sharma, M.; K.S. Charak and T.V. Ramanaiah (2003), “Agricultural Biotechnology Research in India: Status and Policies”, *Curr. Sci.*, 84, pp. 297-302.
- Shillito, R. (1999), “Methods of Genetic Transformation: Electroporation and Polyethylene Glycol Treatment”, in *Molecular Improvement of Cereal Crops*, I.K. Vasil (ed.), London, Kluwer Academic, pp. 9-20.
- Shimamoto, K.; R. Terada; T. Izawa and H. Fujimoto (1989), “Fertile Transgenic Rice Plants Regenerated from Transformed Protoplasts”, *Nature*, 338, pp. 274-276.
- Stewart, C.N. Jr.; M.D. Halfhill and S.I. Warwick (2003), “Transgene Introgression from Genetically Modified Crops to Their Wild Relatives”, *Nat. Rev. Genet.*, 4, pp. 806-817.
- Swaminathan, M.S. (1993), “From Nature to Crop Production”, in *Int. Crop Sci. I. CSSA*, Madison, pp. 385-394.
- Tabashnik, B.E.; Y. Carrière; T.J. Dennehy; S. Morin; M.S. Sisterson; R.T. Roush; A.M. Shelton and J.Z. Zhao (2003), “Insect Resistance to Transgenic Bt Crops: Lessons from the Laboratory and Field”, *J. Econ. Entomol.*, 96, pp. 1031-1038.
- Toenniessen, G.H. (2000), *Vitamin A Deficiency and Golden Rice: The Role of the Rockefeller Foundation*, New York, Rockefeller Foundation.
- Vasal, S.K. (2002), “Quality Protein Maize: Overcoming the Hurdles”, *J. Crop Prod.*, 6, pp. 193-227.
- ; O. Riera Lizarazu and P.P. Jauhar (2006), “Genetic Enhancement of Maize by Cytogenetic Manipulation, and Breeding for Yield, Stress Tolerance, and High Protein Quality”, in *Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement*, R.J. Singh and P.P. Jauhar (eds.), Boca Raton, CRC Taylor & Francis Press, vol. 2 Cereals, pp. 159-197.
- Vasil, I.K. (1987), “Developing Cell and Tissue Culture Systems for the Improvement of Cereal and Grass Crops”, *J. Plant Physiol.*, 128, pp. 193-197.

- _____ and V. Vasil (1980), "Isolation and Culture of Cereal Protoplasts: II. Embryogenesis and Plantlet Formation from Protoplasts of *Pennisetum americanum*", *Theor. Appl. Genet.*, 56, pp. 97-99.
- Vasil, V.; A.M. Castillo; M.E. Fromm and I.K. Vasil (1992), "Herbicide Resistant Fertile Transgenic Wheat Plants Obtained by Microprojectile Bombardment of Regenerable Embryogenic Callus", *Bio/Technol.*, 10, pp. 667-674.
- Vinocur, B. and A. Altman (2005), "Recent Advances in Engineering Plant Tolerance to Abiotic Stress: Achievements and Limitations", *Biotechnology*, New York, 16, pp. 1-10.
- Walker Simmons, M.K. (2003), "New USDA-ARS Research in Biotechnology Risk Management", in *Agricultural Biotechnology: Science and Society at a Crossroad. Natl. Agric. Biotechnol. Council*, A. Eaglesham y otros (ed.), New York, pp. 94-98.
- Whitfield, J. (2003), "Transgenic Cotton a Winner in India", *Nature News Service*, Macmillan Magazines Ltd, Feb.
- Ye, X.; S. Al-Babill; A. Klotl; J. Zhang; P. Lucca; P. Beyer and I. Potrykus (2000), "Engineering the Provitamin A (β -carotene) Biosynthetic Pathway Into (Carotenoid-Free) Rice Endosperm", *Science*, 287, pp. 289-296.
- Yu, H. and P.P. Kumar (2003), "Post-Transcriptional Gene Silencing in Plants by RNA", *Plant Cell Rep.*, 22, pp. 167-174.
- Zhang, W. and R. Wu (1988), "Efficient Regeneration of Transgenic Plants from Rice Protoplasts and Correctly Regulated Expression of the Foreign Gene in the Plants", *Theor. Appl. Genet.*, 76, pp- 835-840.
- Zhang, N.Y.; S. Linscombe and J. Oard (2003), "Out-Crossing Frequency and Genetic Analysis of Hybrids Between Transgenic Glufosinate Herbicide-Resistant Rice and the Weed, Red Rice", *Euphytica*, 130, pp. 35-45.

Evaluación de cuatro genotipos de chile serrano en hidroponía

Evaluation of four genotypes serrano chili in hydroponics

M.A. García Delgado,^{1} G. Bustos Vázquez,¹ G. Martínez Balderas,² R. Uresti Pesina,¹ J.E. Cervantes Martínez,¹ H. Mata Vázquez*

Resumen

Se evaluaron cuatro genotipos de chile serrano en condiciones de hidroponía, tres híbridos regionales “Coloso”, “Centauro” y “HS-44” con respecto a la variedad “Tampiqueño 74”. La investigación se realizó de febrero a agosto de 2007 en la sección de hidroponía del vivero de la Unidad Académica Multidisciplinaria Mante, de la Universidad Autónoma de Tamaulipas. El agua de riego utilizada provino de la red de agua potable municipal, la cual presentó cierta “dureza” y era ligeramente alcalina (pH=7.5). Para la estabilización y disminución de la dureza se utilizó ácido fosfórico grado agrícola. La dosis nutrimental utilizada en la producción de planta en invernadero fue de 35-70-30 mg/L de agua, de N-P-K respectivamente. Se aplicó una dosis total por hectárea de 160-75-150 de N-P-K, complementada con aplicaciones foliares de nutrientes secundarios y micronutrientes. Se utilizó un diseño de bloques completos al azar con cuatro tratamientos, los cuatro genotipos y tres repeticiones. Las variables analizadas fueron el diámetro del tallo y la altura de la planta, calidad del fruto basado en el peso, ancho y largo, así como el rendimiento del fruto. Se realizaron 10 cortes de frutos los cuales fueron analizados estadísticamente.

¹ Unidad Académica Multidisciplinaria Mante, Universidad Autónoma de Tamaulipas, Ciudad Mante, Tamaulipas, México, correo electrónico: miagarci@uat.edu.mx

² Tesista de la UAM Mante.

El mayor diámetro de tallo de la planta lo presentó el híbrido “HS-44” y el menor, el híbrido “Coloso”. El híbrido “Centauro” presentó la mayor altura de planta, el resto de los cultivares presentaron alturas muy semejantes. El mejor rendimiento de frutos lo presentó el híbrido “Centauro”, el menor rendimiento el híbrido “Coloso”, esta respuesta se manifestó fisiológicamente basado en las dimensiones vegetativas alcanzadas por estos cultivares. El híbrido “Centauro” presentó la mejor conversión nutrimental de las soluciones nutritivas aplicadas en hidroponía, por lo tanto, tuvo una mayor eficiencia fisiológica y metabólica. El mayor diámetro de fruto lo presentó el híbrido “Coloso”.

Abstract

Four genotypes of Serrano chili were evaluated in hydroponic conditions, three regional hybrids “Coloso”, “Centauro” and “HS-44” with respect to the “Tampiqueño 74” cultivar. This research was conducted from February to August on 2007, under hydroponic greenhouse of the Unidad Académica Multidisciplinaria Mante, of the Universidad Autónoma de Tamaulipas, Mexico. The irrigation water was supplied from the Municipal Drinking Water Network, which has certain “hardness” and slightly alkaline (pH = 7.5), for stabilization and reduction of hardness agricultural grade phosphoric acid was used. The nutrient dose used in the plant production step in greenhouse conditions was 35-70-30 mg L⁻¹ of water, N-P-K respectively. A dose equivalent per hectare was 100-75-100 N-P-K respectively, supplemented with foliar application of secondary nutrients and micronutrients. A completely randomized design was used with four treatments, the four genotypes and three replications. The agronomics variables analyzed were stem diameter, plant height and yield of fruits. Ten “cuts” of fruits which were used for statistical analysis. The highest stem diameter (SD) of the plant was obtained in “HS-44” and lower SD in “Coloso” plants. The hybrid “Centauro” had the highest plant height; the rest of cultivars had very similar heights. The best yield of fruits was obtained per “Centauro” hybrid and the lowest yield by “Coloso”, the answer was expressed physiologically based on vegetative dimensions reached by these cultivars. The “Centauro” hybrid obtained the best in hydroponics nutrient conversion, therefore had a best physiological and metabolic efficiency.

Introducción

La técnica de hidroponía representa por sus características especiales, sistemas de producción modernos de cultivos en condiciones semi-controladas, en aquellas regiones donde los cultivos tradicionalmente establecidos se han agotado como

alternativa. También es una moderna técnica que puede ser adaptada a las comunidades rurales, a nivel multifamiliar para el establecimiento de huertos hortícolas y de esta manera apoyar en la economía de bajos ingresos característico de este sector. La hidroponía se define como la técnica o forma de cultivar plantas en sustratos inorgánicos sin suelo. Para ello, se utiliza una combinación precisa de diferentes sales minerales que contienen todos los nutrientes que requieren las plantas para su crecimiento y maduración. Esta técnica es además una alternativa para la producción intensiva de alimentos ricos en proteínas, carbohidratos, vitaminas y minerales.

Las tecnologías de producción de hidroponía en condiciones abiertas y en sistemas controlados (invernaderos) han incrementado el rendimiento de las hortalizas por unidad de superficie; sin embargo, para maximizar la producción, se aplican altas cantidades de fertilizantes y otros productos químicos, los cuales deben de ser utilizados racionalmente cuando son aplicados directamente al suelo, debido a que un uso inadecuado del agua de riego, puede favorecer el lixiviado de nutrimentos tales como nitratos y fosfatos que contaminan las aguas subterráneas (Klock-Moore y Broschat, 2001; Zúñiga-Estrada y otros, 2004). La técnica de hidroponía tiene la ventaja del reciclamiento o reutilización de la solución nutritiva drenada, evitando con esto la contaminación de las corrientes subterráneas y mantos acuíferos.

El establecimiento de cultivos en hidroponía requiere de ciertas condiciones y medios para que sea efectivo y lograr un adecuado incremento en la producción (López-Pérez y otros, 2005). La caracterización de los sustratos y los medios nutritivos en la nutrición de los cultivos es importante para determinar el potencial productivo, debido a que determinan el medio y la sanidad de las raíces, crecimiento de tallos y follaje los cuales tienen una marcada influencia en la productividad (Brückner, 1997; Lemaire, 1997). En la renovación tecnológica y modernización de las actividades agrícolas, los sustratos y las soluciones nutritivas tienen un papel fundamental en los viveros frutícolas, hortícolas, ornamentales y forestales (Pastor, 2000).

El sustrato en hidroponía es todo aquel material sólido distinto del suelo; el cual puede ser natural o sintético, mineral u orgánico, el que se coloca en un contenedor o bancal, en forma pura o mezclado, para que permita el anclaje del sistema radicular del cultivo (CENID-RASPA, 2003). Los diferentes cultivos hortícolas, por sus características específicas, necesitan y se adaptan a ciertos tipos de sustratos tales como: tezontle, fibra de coco, vermiculita, arena, etc., o bien la utilización de una mezcla de ellos, esto con el propósito de obtener el crecimiento adecuado y el máximo de productividad de los cultivos (López-Pérez y otros, 2005).

El chile verde se produce a nivel nacional en una superficie de 86 mil hectáreas con un rendimiento medio de 15.9 t ha⁻¹, los estados con mayor producción de ésta hortaliza son: Chihuahua, Coahuila, Durango, Baja California, Nuevo León,

Michoacán, Sonora y Tamaulipas (Muñoz y Castellanos, 2003). Las principales especies de chile verde que se cultivan en México son: serrano, jalapeño y morrón. El área sembrada de chile serrano en México, varía alrededor de 15 mil hectáreas con un valor de la producción estimado en más de 3 mil millones de pesos. Su consumo es en fresco o verde y el uso principal del producto es como condimento de las comidas; un pequeño porcentaje de la producción se destina a la industria de encurtidos y deshidratados. El chile, además de dar sabor a las comidas, tiene también un elevado contenido de vitaminas y sales minerales.

El chile serrano se ha cultivado en las Huastecas en forma intensiva desde hace más de 30 años, y en la actualidad a nivel nacional es una región importante, abastecedora de los principales centros de consumo del país. El área cultivada es de aproximadamente 3 mil hectáreas, divididas en tres zonas principales, que son: sur de Tamaulipas, en donde los municipios de Altamira y González son los más importantes y en menor grado los municipios de Mante y Aldama, el oriente de San Luis Potosí, en el municipio de Ébano; y el norte de Veracruz, en los municipios de Pánuco y Tempoal.

Este cultivo constituye una importante fuente de ingresos para los agricultores de la región y además es generador de empleos para los trabajadores agrícolas, ya que se requieren de 300 a 350 jornales por hectárea en las labores de cultivos, principalmente en las cosechas. También hay que agregar otros trabajadores que se relacionan en forma indirecta con el cultivo de chile, entre los que se incluyen a transportistas y comerciantes. El presente estudio se realizó con la finalidad de encontrar la mejor adaptación de tres híbridos y una variedad de chile serrano en condiciones de hidroponía, estos materiales genéticos se cultivan en el sur del estado de Tamaulipas.

Materiales y métodos

La investigación se realizó en el periodo comprendido de febrero a agosto de 2007, en el área de hidroponía del vivero de la Unidad Académica Multidisciplinaria Mante, de la UAT. Para el establecimiento del almácigo de chile serrano se utilizó el invernadero de esta institución, la siembra se realizó el 9 de febrero, se utilizaron charolas de plástico previamente desinfectadas con hipoclorito de sodio y se sembraron, los tres híbridos Coloso, Centauro y HS-44 y la variedad Tampiqueño-74, el sustrato que se utilizó fue Peat Moss o Turba comercial. Durante la época de almácigo las plántulas de chile se estuvieron regando, con la siguiente dosis en solución nutritiva de 35-70-30 mg/L de agua, de N-P-K respectivamente, con los fertilizantes comerciales: fosfato diamónico (DAP), nitrato de potasio y el ácido fosfórico grado agrícola para titulación

del agua de riego. De acuerdo a los problemas fitosanitarios presentados se aplicaron fungicidas e insecticidas para mantener las plántulas libres de enfermedades y plagas.

Cuadro 1. Contenido nutrimental foliar de chile serrano

Nutriente	Tratamiento (genotipo)			
	Coloso	Centauro	HS-44	Tampiqueño 74
Nitrógeno total (%)	3.06	3.04	4.00	4.0
Fósforo (%)	0.22	0.16	0.18	0.26
Potasio (%)	2.86	2.68	2.9	4.01
Calcio (%)	4.45	5.01	4.88	4.55
Magnesio (%)	1.05	1.44	1.36	1.30
Hierro (ppm)	385.5	402.5	391.0	364.5
Zinc (ppm)	35.0	29.5	38.5	47.5
Cobre (ppm)	35.5	33.0	40.5	60.0
Manganeso (ppm)	56.0	66.0	82.0	33.0

Fuente: elaboración propia.

El agua de riego utilizada proviene de la red de agua potable municipal la cual es ligeramente alcalina ($\text{pH} = 7.5$), se clasifica como C3S1, de salinidad moderada baja en sodio, debido a su alto pH y a la dureza (alto contenido de carbonatos y bicarbonatos) característica de esta fuente. Se llevó a cabo una titulación en laboratorio, utilizando como fuente de acidificación, neutralización y estabilización (disminución de dureza) el ácido fosfórico grado agrícola (08-24-00), esta etapa se llevó a cabo en el Laboratorio de Bioquímica de la UAM Mante. Alarcón Vera (2006) menciona que el pH más adecuado para el cultivo de chile se encuentra entre 6.0 y 6.5, por lo tanto, considerando un pH de 6.5 se obtuvo la cantidad de ácido a aplicar por volumen de agua (mL m^{-3}) en cada solución nutritiva. La dosis de fertilización base, para las soluciones nutritivas utilizada para el cultivo de chile estuvieron basadas de acuerdo a las diferentes etapas fenológicas del cultivo, las dosis aplicadas fueron las sugeridas por los promedios sugeridos por los diferentes campos experimentales del INIFAP, señalados por Bravo (2004) y las sugeridas por Mendoza y colaboradores (2004) del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Relación Agua-Suelo-Planta-Atmósfera (CENID, RASPA). Esta formulación se complementó con ocho aplicaciones foliares con micro nutrimentos, distribuidas de la siguiente manera: durante la etapa vegetativa hasta la aparición del primer racimo floral y cuatro aplicaciones más durante la etapa de cosecha de frutos.

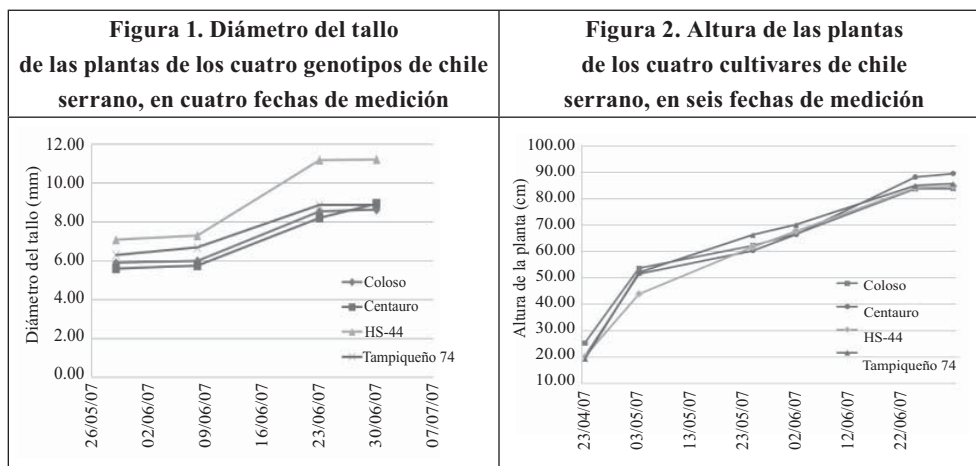
La solución “madre” (mezcla de los fertilizantes en agua) correspondiente a cada dosis, se realizó en un tanque de plástico de 200 L la cual se vertió en un depósito de concreto de 12.0 m³ de capacidad. El trasplante se realizó el 29 de marzo, 50 días después de la siembra, las plantas de chile de los cuatro materiales genéticos alcanzaron una altura promedio de 30 cm, y estuvieron listas para el trasplante. El diseño experimental que se utilizó fue de bloques completos al azar con tres repeticiones por tratamiento. El testigo que se utilizó fue la variedad regional Tampiqueño 74. Se utilizó una separación entre plantas de 30 cm en los cuatro tratamientos. Las variables agronómicas evaluadas fueron: diámetro del tallo (cuatro fechas), altura de planta (seis fechas), rendimiento por corte y rendimiento total. Se realizaron 10 cortes de frutos durante la época de cosecha. Para las variables de rendimiento del fruto se analizaron con programa estadístico desarrollado por Olivares (1994); en su caso en las variables que presentaron significancia estadística, las comparaciones de medias se realizaron con rangos múltiples de Tukey al 0.05 de significancia.

En el último corte de frutos del 15 de agosto, se realizó el muestreo foliar de las plantas de los diferentes tratamientos. Una vez realizado el muestreo foliar, las muestras recolectadas de cada tratamiento se sometieron a los procesos de lavado necesarios para limpiar impurezas (Rivera, 2003; Rodríguez y Rodríguez, 2002, Chapman, 1976). Posteriormente se secaron en la estufa a 65 °C durante 36 horas, se trituraron y molieron, para realizarles los análisis nutrimentales indicados, dichos productos fueron enviados al laboratorio para su análisis. La concentración nutrimental foliar de los diferentes materiales de chile serrano evaluados se presentan en el cuadro 1.

Resultados y discusión

Diámetro de tallo y altura de la planta

El periodo de medición del diámetro del tallo se realizó desde el 29 de mayo al 30 de junio de 2007, en las cuatro fechas de mediciones realizadas, el híbrido “HS-44” fue el que presentó las mayores dimensiones del diámetro del tallo, al final del periodo las plantas de este híbrido presentaron un diámetro promedio de 11.2 mm (± 2.7 mm), por otra parte, el resto de genotipos se comportaron muy similares a las dimensiones presentadas por la variedad “Tampiqueño 74”, al final del ciclo vegetativo el híbrido “Coloso” presentó el menor diámetro de tallo, de 8.6 mm ± 2.1 mm; mientras que el híbrido “Centauro” y la variedad “Tampiqueño 74”, finalizaron con dimensiones de diámetro de tallo muy similares (figura 1).



Fuente: elaboración propia.

Fuente: elaboración propia.

Las mediciones de la altura de la planta se iniciaron el 23 de abril y se concluyeron el 30 de junio de 2007, en las primeras dos fechas de medición el híbrido “Coloso” presentó las mayores alturas de planta en los materiales evaluados, durante el primer mes después del trasplante, lo cual es una característica del híbrido por su hábito de crecimiento compacto y precocidad (CESTAM, 1994) periodo que está definido por la fase de crecimiento acelerado de las plantas, por lo tanto, este material vegetativo presentó el mejor crecimiento vegetativo inicial en condiciones de hidroponía; mientras que el híbrido “HS-44” presentó las menores alturas en los primeros 40 días después de trasplantado (hasta el 03 de mayo), las alturas de planta alcanzadas por los híbridos “Coloso” y “HS-44”, de 83.7 y 84.7 cm respectivamente, coinciden con los datos mencionados por Ramírez (2006). El resto de genotipos presentaron un crecimiento de follaje muy similar, sólo al final del periodo de medición, sobresalió la altura alcanzada por el híbrido “Centauro”, las plantas de este híbrido presentaron una altura máxima promedio de 90 cm \pm 13.1 cm (figura 2).

Rendimiento de frutos por corte

La “Calentona”, ensayo o primer corte de frutos se efectuó el 29 de mayo de 2007, dos meses después del trasplante y 110 días después de la siembra, al realizar el análisis estadístico, en este corte, y en los cinco cortes de fruto subsecuentes, no se mostró una diferencia estadísticamente significativa entre los híbridos y el testigo (“Tampiqueño 74”). Fue a partir del séptimo corte de frutos, cosecha realizada el 10

de julio, en el cual al realizar el análisis estadístico este mostró un efecto altamente significativo ($P=0.005$ datos no mostrados) entre los tratamientos estudiados, con un coeficiente de variación de 21.87%, el cual es aceptable en este clase de estudios, en bloques no se encontró efecto estadístico significativo (datos no mostrados). Al aplicarle la prueba de medias (Tukey $\alpha=0.05$) de rendimiento expresado en Kg ha^{-1} , indicó que el mejor rendimiento lo presentaron los híbridos “HS-44” y “Coloso”, con respecto a la variedad “Tampiqueño 74” y el híbrido “Centauro” (cuadro 2).

En los cortes de frutos octavo y décimo no se encontró una diferencia estadísticamente significativa. En cambio en la novena fecha de corte de frutos si hubo una diferencia apreciable, en corte efectuado el 30 de Julio, en el cual al realizar el análisis estadístico respectivo, este mostró un efecto altamente significativo ($P=0.004$) entre los materiales genéticos de chile serrano estudiados, no se presentó diferencia estadística significativa entre los bloques, se tuvo un coeficiente de variación de 9.84%, el más bajo de todos los análisis de varianza realizados (datos no mostrados).

Al aplicar la prueba de comparación de medias de rendimiento (Tukey $\alpha=0.05$) en el noveno corte de frutos, indicó que el mejor rendimiento lo presentaron los híbridos “HS-44”, “Centauro” y la variedad “Tampiqueño 74” con respecto al híbrido “Coloso” (cuadro 3), los resultados obtenidos entre el séptimo y noveno corte de frutos, coinciden con la información reportada por el INIFAP (CESTAM, 2004), debido a la precocidad presentada por el híbrido “Coloso”, y la compactación del periodo de cosecha observado en el híbrido “HS-44”.

Rendimiento total

El rendimiento total de frutos se expresó en toneladas por hectárea, se le realizó el análisis estadístico, el cual mostró que hubo una diferencia estadísticamente significativa ($P=0.045$) entre los híbridos y el Testigo (“Tampiqueño 74”), no se presentó efecto estadístico significativo en bloques, se tuvo un coeficiente de variación muy aceptable (menor del 30%), como se muestra en el cuadro 4. La comparación de medias de los tratamientos, con la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$), indicó que el mejor rendimiento lo presentó el híbrido “Centauro” con respecto al híbrido “Coloso”, no encontrándose diferencia estadística significativa entre este híbrido, el Híbrido “HS-44” y la variedad “Tampiqueño 74” (cuadro 5), es importante señalar que en el análisis foliar realizado en el último corte de frutos, este híbrido presentó los contenidos nutrimentales más bajos de los materiales genéticos en estudio lo cual, es posible atribuirle a una mejor conversión nutrimental, hormonal y energética reflejándose posiblemente en una mayor eficiencia fisiológica y metabólica del cultivo, manifestándose en el mayor rendimiento de este híbrido. Si bien, el rendimiento de frutos obtenido por el híbrido

EVALUACIÓN DE CUATRO GENOTIPOS DE CHILE SERRANO EN HIDROPONÍA

“Centauro” es similar al promedio en condiciones de riego, lo que coincide con lo señalado por Ramírez (2006), quien menciona que este híbrido es el que presenta el mejor rendimiento en condiciones de riego y con adecuado manejo de la fertilización. Es importante aclarar que debido a un ataque severo de mosquita blanca (*Bemisia Tabaci*) se presentó daño de virosis afectando a todos los genotipos estudiados, lo que finalmente redujo el número de cortes de fruto o el periodo de cosecha.

Cuadro 2. Comparación de medias de rendimiento de fruto (kg ha⁻¹) de la séptima fecha de corte (10-07-2007)			Cuadro 3. Comparación de medias de rendimiento de fruto (Kg ha⁻¹) de la novena fecha de corte (30-07-2007)		
<i>Genotipo</i>	<i>Media</i>	<i>Significancia*</i>	<i>Genotipo</i>	<i>Media</i>	<i>Significancia*</i>
HS-44	1 229.97	A	Centauro	5 901.33	A
Coloso	804.00	A B	Tampiqueño 74	5 570.03	A
Centauro	528.67	B	HS-44	5 254.47	A
Tampiqueño 74	448.43	B	Coloso	3 339.77	B
* Letras iguales no presentan diferencia significativa (Tukey $\alpha=0.05$)			* Letras iguales no presentan diferencia significativa (Tukey $\alpha=0.05$)		

Fuente: elaboración propia.

Fuente: elaboración propia.

Cuadro 4. Análisis de varianza para el rendimiento de fruto (t ha⁻¹) de cuatro genotipos de chile serrano en condiciones de hidroponía						Cuadro 5. Comparación de medias de rendimiento de fruto (t ha⁻¹)		
<i>F. de Var</i>	<i>° de Libertad</i>	<i>Suma de Cuad.</i>	<i>Cuadros Medios</i>	<i>F</i>	<i>Pr>F</i>	<i>Genotipo</i>	<i>Media</i>	<i>Significancia*</i>
Genotipo	3	34.932	11.644	5.015	0.045	Centauro	14.05	A
Bloques	2	2.064	1.032	0.444	0.664	HS-44	13.08	A B
Error	6	13.932	2.322			Tampiq. 74	12.44	A B
Total	11	50.928				Coloso	9.48	B
Coeficiente de variación = 12.43%						* Letras iguales no presentan diferencia significativa (Tukey $\alpha=0.05$)		

Fuente: elaboración propia.

Fuente: elaboración propia.

Conclusiones

De los cuatro genotipos de chile serrano evaluados en condiciones de hidroponía, el híbrido “HS-44” presentó el mayor diámetro de tallo, el híbrido “Centauro” y la variedad “Tampiqueño 74” tuvieron dimensiones vegetativas muy similares, el menor diámetro de tallo lo presentó el híbrido “Coloso”. El híbrido “Centauro” presentó la mayor altura de planta, el resto de los genotipos presentaron alturas muy semejantes acordes a sus características vegetativas y rendimientos obtenidos. El mejor rendimiento de frutos lo presentó el híbrido “Centauro”, el menor rendimiento el híbrido “Coloso”, coincidiendo fisiológicamente esta respuesta con las dimensiones vegetativas alcanzadas por estos genotipos. El híbrido “Centauro” presentó la mejor conversión nutrimental de las soluciones nutritivas aplicadas en hidroponía, por lo tanto, tuvo una mayor eficiencia fisiológica y metabólica, la cual se reflejó en el mayor rendimiento de frutos obtenido.

Referencias

- Bravo, L.A.G. (2004), “Riego por goteo y fertirrigación en el cultivo del chile”, *Curso-Taller Producción y Manejo Integral del Cultivo del Chile*, Tamaulipas, Folleto Técnico núm. 3. Consejo Estatal de Productores de Chile en Tamaulipas, Consejo Nacional de Productores de Chile, S. C., 49 pp.
- Brückner, U. (1997), “Physical Properties of Different Potting Media and Substrate Mixtures –Especially Air– and Water Capacity”, *Acta Horticulturae*, 450, pp. 263-270.
- CENID-RASPA (2003), “Agricultura protegida”, en *Libro Técnico No. 1*, Durango, Centro Nacional de Investigación Disciplinaria Relación-Agua-Suelo-Planta-Atmósfera, INIFAP, 111 pp.
- CEPROCH (Consejo Estatal de Productores de Chile en Tamaulipas) (2004), “Curso-taller producción y manejo integral del cultivo del chile”, *Folleto Técnico No. 3*, México, Consejo Nacional de Productores de Chile, S. C., 49 pp.
- Chapman, D. y F. Parker (1976), *Métodos de análisis para suelos, plantas y aguas*, México, Trillas, S. A., pp. 46.
- Klock Moore, K.A. y T.K. Broschat (2001), “Effect of Four Growing Substrates on Growth of Ornamental Plants in Two Irrigation Systems”, *Hortechology*, 11(3), pp. 456-460.
- Lemaire, F. 1997. “The Problem of the Biostability in Organic Substrates”, *Acta Horticulturae*, 450, pp. 63-69.

- López Pérez, L.; R. Cárdenas; P. Lobit; O. Martínez C y O. Escalante L. (2005), "Selección de un sustrato para el crecimiento de fresa en hidroponía", *Rev. Fitotecnia Mexicana*, vol. 28 (2), pp. 171-174.
- Mendoza, M.S.F.; M.A. Inzunza I.; M.M. Villa C.; E.A. Catalán V.; A. Román L.; J. Martínez S. e I. Sánchez C. (2004), "Producción de chile jalapeño con riego localizado tipo cintilla y acolchado plástico", *Folleto Técnico No. 3*, Durango, Centro Nacional de Investigación Disciplinaria Relación-Agua-Suelo-Planta-Atmósfera, INIFAP, 111 pp.
- Muñoz R., J.J. y J.Z. Castellanos (2003), *Manual de producción hortícola en invernadero*, Guanajuato, INCAPA, p. 3.
- Olivares, S.E. (1994), *Paquete de diseños experimentales*, Nuevo León, FAUANL, Versión 2.5. Facultad de Agronomía.
- Pastor S.J.N. (2000), "Utilización de sustratos en viveros", *Terra*, 17(3), pp. 213-235.
- Ramírez M.M. (2006), *Chile Serrano / Mejoramiento Genético. HS-44: Híbrido de chile serrano. Fichas Tecnológicas 2006 por sistema producto*, Tamaulipas, INIFAP, CIESTAM.
- Rivera, M.P. (2003), *Guía para los análisis de laboratorio de suelos, agua y planta*, Universidad Autónoma de Tamaulipas, Unidad Académica Multidisciplinaria Agronomía y Ciencias, 33 pp.
- Rodríguez, F.H. y J. Rodríguez A. (2002), *Métodos de análisis de suelos y plantas: criterios de interpretación*, 1ª ed., Trillas (ed), 196 pp.
- Samperio, R.G. (2004), *Un paso más en la Hidroponía*, 1ª ed., México, Edit. Diana, 127 pp.
- Zúñiga Estrada, L.; J.J. Martínez Hernández; G.A. Baça Castillo; A. Martínez Garza; J.L. Tirado Torres y J. Kohashi Shibata (2004), "Producción de chile pimiento en dos sistemas de riego bajo condiciones hidropónicas", *Agrociencia*, 38(2), pp. 207-218.

**Evaluación de la asimilación de bióxido de carbono
de un cultivo de caña de azúcar
en Xicotécatl, Tamaulipas**
*Evaluation of carbon dioxide assimilation
of a sugar cane crop
on Xicotécatl, Tamaulipas*

A. Zermeño González,^{1} E. Catalán Valencia,² M.A. García Delgado,³
B. Canales López,⁴ M. Cantú Sifuentes,⁵ S. Villatoro Moreno,¹
E.E. Olivar Rodríguez¹*

Resumen

Con el propósito de evaluar la capacidad de asimilación de bióxido de carbono (CO₂) de un cultivo de caña de azúcar, se usó un sistema eddy para medir el flujo de bióxido de carbono y vapor de agua sobre el dosel de una superficie de 6 ha de caña de azúcar de la variedad CP 722086. También se midió la radiación fotosintéticamente activa (PAR). El cultivo se sembró el 4 de octubre de 2007 en la propiedad Santa Anita, Xicotécatl, Tamaulipas y las mediciones se realizaron de septiembre

¹ Departamento de Riego y Drenaje, UAAAN, Calzada Antonio Narro, núm. 1923, Saltillo, Coahuila, México, c.p. 25230, correo electrónico: azermenog@hotmail.com

² CENID-RASPA INIFAP, Km 6.5 margen derecha canal de sacramento, Gómez Palacio Durango, México, c.p. 35060.

³ UAM-Mante, Universidad Autónoma de Tamaulipas, Ciudad Mante, Tamaulipas, México.

⁴ Palau Bioquím, Salvador González, Lobo núm. 280 altos, col. Republica Ote., Saltillo, Coahuila, México, c.p. 25280.

⁵ Departamento de Estadística y Cálculo, UAAAN, Calzada Antonio Narro, núm. 1923, Saltillo, Coahuila, México c.p. 25230.

a noviembre de 2008. Se observaron tasas de asimilación de bióxido de carbono de hasta $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La fijación de CO_2 durante el día (NEE) fue cuatro veces mayor que la liberación durante la noche, lo que demostró el alto potencial de fijación de CO_2 que tiene este ecosistema vegetal. La eficiencia intrínseca del uso del agua y de la PAR absorbida por la vegetación fue $248.90 \text{ mol CO}_2 \text{ L}^{-1} \text{ m}^{-2}$ y 4.70% respectivamente. Se observó una relación cuadrática directamente proporcional entre los flujos integrados de NEE y los flujos integrados del flujo de calor latente (LE), y entre los flujos integrados de NEE y los flujos integrados de la PAR absorbida por la superficie vegetal.

Abstract

To evaluate the capacity of carbon dioxide (CO_2) assimilation of a sugar cane crop, an eddy covariance system was used to measure water vapor and carbon dioxide flux over the canopy of a 6 ha surface of sugar cane crop of the variety CP 722086. The photosynthetically active radiation (PAR) was also measured. The crop was seeded on October 4, 2007 in the property Santa Anita, Xicoténcatl, Tamaulipas and the measurements were conducted from September to November, 2008. Rates of carbon dioxide assimilation of up to $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ were observed. The fixation of CO_2 during daytime (NEE) was four times higher than the release during nighttime, that demonstrated the high potential of carbon assimilation of this ecosystem. The intrinsic water use efficiency and the efficiency of PAR absorbed by the vegetated surface were $248.90 \text{ mol CO}_2 \text{ L}^{-1} \text{ m}^{-2}$ and 4.70%, respectively. It was observed directly proportional quadratic relation between the integrated fluxes of NEE and the integrated fluxes of latent heat flux (LE), and between the integrated fluxes of NEE and the integrated fluxes of absorbed PAR by the crop canopy.

Introducción

La caña de azúcar (*Saccharum, Officinarum*) es uno de los cultivos más importantes de México, ya que este genera alrededor de 440 mil empleos directos y 2.5 millones de empleos indirectos. En el país se tiene establecida una superficie aproximada de 680 mil ha. Los principales estados productores y número de ingenios azucareros establecidos en estos son: Veracruz (22), Jalisco (6), San Luis Potosí (4), Oaxaca (4), Michoacán (3), Tabasco (3), Sinaloa (3), Chiapas (2), Nayarit (2), Puebla (2), Tamaulipas (2), Morelos (2), Quintana Roo (1), Colima (1), Campeche (1). El rendimiento promedio es de 74-75 t ha⁻¹. México ocupa el 4º lugar en rendimiento después de Colombia, Australia y Guatemala (UNC, 2007).

La caña de azúcar y el maíz, son cultivos que en los últimos años se han utilizando ampliamente en otros países como Brasil y Estados Unidos para producir biocombustibles (etanol), con la finalidad de reducir el consumo de combustible fósiles (gasolina). Esto se debe a que los cultivos mencionados se caracterizan por tener altas tasas de asimilación de bióxido de carbono (CO_2). Si a nivel global se pudiera remplazar en un gran porcentaje el uso de los combustibles fósiles por biocombustibles, se podría reducir la tendencia creciente del calentamiento global, ya que se podría reducir la concentración de CO_2 en la atmósfera, debido a que el CO_2 liberado a la atmósfera por la quema de los biocombustibles, es previamente abstraído de la atmósfera por el proceso de fotosíntesis de las plantas. La mayor demanda de biocombustibles, requerirá de plantas y cultivos de mayor capacidad fotosintética, y de un mejor entendimiento del efecto de las variaciones del clima y del manejo de los cultivos en la tasa de asimilación de bióxido de carbono. Debido a que la caña de azúcar es un cultivo de cobertura total mantiene altas tasas de asimilación de bióxido de carbono durante la mayor parte de su ciclo de crecimiento (Saliendra y otros 1996; Glaz y otros, 2004). Pero también, es un cultivo de un alto consumo de agua (Omary e Izuno, 1995; Watanabe y otros, 2004; Yoshikazu y otros, 2005). El objetivo de la investigación fue evaluar la tasa de asimilación de bióxido de carbono de un cultivo de caña de azúcar, su relación con la evapotranspiración y la radiación fotosintéticamente activa absorbida por la vegetación.

Materiales y métodos

El estudio se realizó en la propiedad Santa Anita, municipio de Xicoténcatl, Tamaulipas. La siembra se realizó del 2 al 4 de octubre de 2007 utilizando la variedad CP 722086. En total se dieron 10 riegos por año de una lámina de aproximadamente 15 cm por riego. La fertilización consistió en 500 kg/ha de la formulación 22-11-55 al momento de la siembra, y 500 kg/ha de la dosis 20.5-00-00 (sulfato de amonio) a 60 días después de la siembra. Las mediciones se realizaron en una sección de 200 m (dirección este-oeste) por 400 m (dirección norte-sur), del 3 de octubre al 22 de noviembre de 2008. Los flujos de masa y energía entre el dosel de la vegetación y la atmósfera se midieron colocando un sistema eddy en el extremo norte de la sección de estudio, ya que los vientos dominantes en esta localidad durante el tiempo del estudio fueron del norte. El flujo de bióxido de carbono (FCO_2) y flujo de calor latente (LE) entre el dosel de la vegetación y la atmósfera se obtuvieron con las siguientes ecuaciones (Zermeño-González, 2007):

$$LE=Lw'\rho_{wv}'(1)$$

$$FCO_2=w'\rho_{co_2}'(2)$$

Donde:

L es el calor de vaporización del agua y los productos, $w'\rho_{wv}'$ y $w'\rho_{co_2}'$ representan la covarianza entre la velocidad vertical del viento (w) y la densidad del vapor de agua (ρ_{wv}) y del bióxido de carbono (ρ_{co_2}).

La velocidad vertical del viento se midió con un anemómetro sónico tridimensional (CSI-CSAT3, Campbell, Sci, Inc.), mientras que ρ_{wv} y ρ_{co_2} con un analizador de bióxido de carbono y vapor de agua de sendero abierto (open path CO₂/H₂O analyzer, LI-7500; LI-COR). Ambos sensores se montaron en una torre de 5 m de alto (2 m sobre el dosel de la vegetación) (figura 1). El anemómetro sónico tridimensional se orientó hacia el norte para lograr un fetch (distancia horizontal desde la ubicación de los sensores al límite del área de estudio) de por lo menos 200 m, en un ángulo de +/- 90° respecto a la orientación del anemómetro sónico tridimensional (vientos dominantes del norte en esta localidad). La velocidad vertical del viento, densidad del vapor de agua y del bióxido de carbono se midieron a una frecuencia de 10 Hz, y las covarianzas se calcularon cada 30 minutos.

El intercambio neto de bióxido de carbono del ecosistema (NEE), formado por el suelo y la vegetación se obtuvo con la siguiente relación (Martens y otros, 2004):

$$NEE = FCO_2 + \frac{\Delta\rho_{CO_2}}{\Delta t} * \Delta z \quad (3)$$

Donde:

FCO_2 , es el flujo de bióxido de carbono medido con el método de la covarianza eddy (negativo hacia la superficie vegetal),

$\Delta\rho_{co_2}$ es el cambio en la densidad del CO₂ medido a la misma altura a la que se midió el flujo de CO₂, Δt es el intervalo de tiempo (30 min) y Δz es la altura a la que se realizaron las mediciones (5 m).

La retención de CO₂ por el ecosistema se estimó con la diferencia entre la integración de los valores negativos (durante el día) y positivos (durante la noche) de NEE. También se midió la radiación neta (Rn) con un Net Radiometer (LITE, Keep and Zonen) colocado a 2 m sobre el dosel de la vegetación. La radiación fotosintéticamente activa (PAR) absorbida por el dosel, se obtuvo con la diferencia entre la radiación

PAR incidente y la radiación PAR reflejada. Que se midieron con dos sensores quantum colocados a 2 m sobre el dosel, una orientado hacia el cenit y el otro hacia el dosel de la vegetación. La eficiencia intrínseca del uso del agua (Ef_{H_2O}) y de la PAR (Ef_{PAR}) por el ecosistema, se obtuvieron con los valores integrados entre las 8:00 y las 20:00 h de NEE, PAR y la lámina de agua evapotranspirada (Lam_{ET}) con las siguientes relaciones:

Figura 1. Sistema eddy para medir flujos de bióxido de carbono, vapor de agua, radiación neta y radiación fotosintéticamente activa sobre el dosel de un cultivo de caña de azúcar en Santa Anita, Xicoténcatl, Tamaulipas, noviembre de 2008



Fuente: elaboración propia.

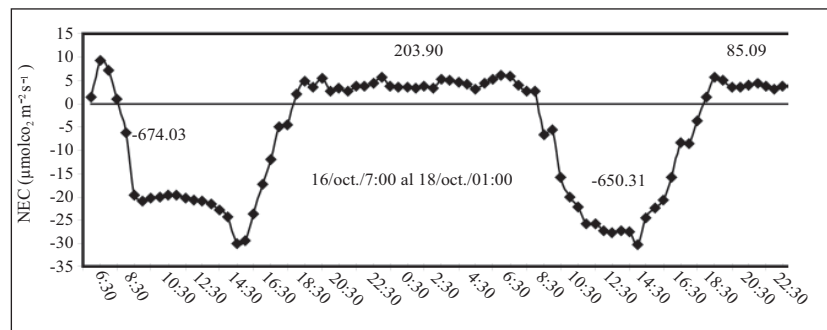
$$Ef_{H_2O} = \frac{NEE}{Lam_{ET}} \quad (4)$$

$$Ef_{PAR} = \frac{NEE}{PAR} \quad (5)$$

Resultados y discusión

Se observaron altos valores de intercambio neto de bióxido de carbono del ecosistema vegetal (NEE), indicando el alto potencial de fijación de CO₂ del cultivo de caña de azúcar (figura 2). Los valores máximos de NEE fueron de hasta -25 μmol m⁻² s⁻¹ y se observaron entre las 11 y las 14 h, que correspondió a las horas del día donde el cultivo absorbió la mayor PAR. Estudios previos (Saliendra y otros,1996) reportaron tasas de asimilación neta de bióxido de carbono de hasta -25 μmol m⁻² s⁻¹ en cuatro cultivares de caña de azúcar. Pero otros estudios (Glaz y otros,2004), encontraron tasas menores de asimilación neta (15 μmol m⁻² s⁻¹). La tasa de NEE nocturna no fue mayor de 4 μmol m⁻² s⁻¹ (figura 2). La retención neta promedio diaria de CO₂ por el dosel del cultivo del 27 de octubre a las 8:00 h al 29 de octubre a las 7:30 h fue 421.38 mmol de CO₂ m⁻². Esto demostró el potencial de fijación de bióxido de carbono que tiene este cultivo. Los flujos integrados de CO₂ durante los segmentos de tiempo con asimilación de CO₂ (8:30 – 19:00 h) fueron hasta cuatro veces mayor que los flujo integrados en los segmentos de tiempo con liberación de CO₂ (respiración nocturna).

Figura 2. Intercambio neto de bióxido de carbono del ecosistema (NEE) de un dosel de caña de azúcar observado del 27 al 29 de octubre de 2008, y flujos integrados (mmol CO₂ m⁻²) durante el día (valores negativos) y la noche (valores positivos). Santa Anita, Xicoténcatl, Tamaulipas, México



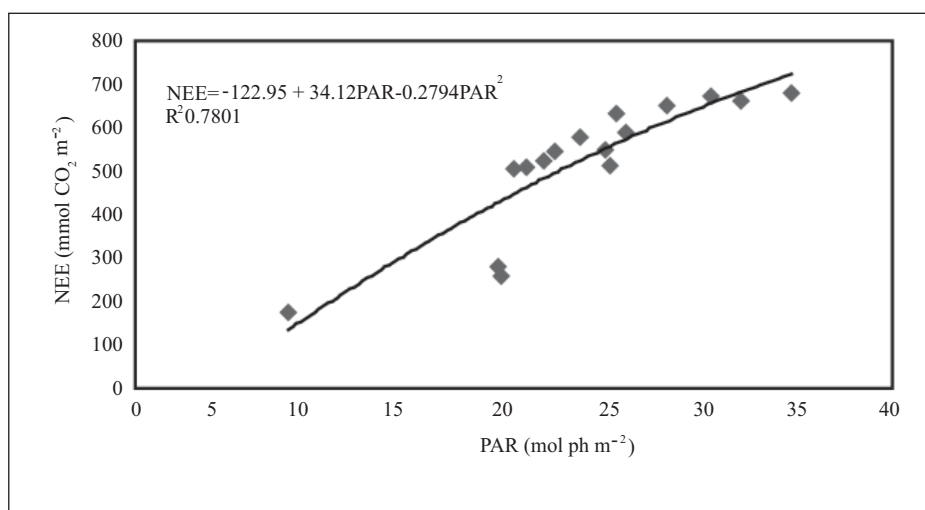
Fuente: elaboración propia.

Se observó una relación cuadrática directamente proporcional entre los flujos integrados de NEE y los flujos integrados de PAR absorbida (figura 3). Esto indicó que la máxima asimilación integrada de CO₂ por el dosel del cultivo

correspondería a $918.72 \text{ mmol CO}_2 \text{ m}^{-2}$ con una PAR absorbida integrada de 61.06 mol de fotones por m^2 . Similarmente, la relación entre los flujos integrados de NEE y los flujos integrados de flujo de calor latente (LE) fue también cuadrática (figura 4). De acuerdo con esta relación, el máximo valor del NEE sería de $964.06 \text{ mmol CO}_2 \text{ m}^{-2}$ y se obtendría con un flujo de calor latente integrado de 9.69 MJ m^{-2} .

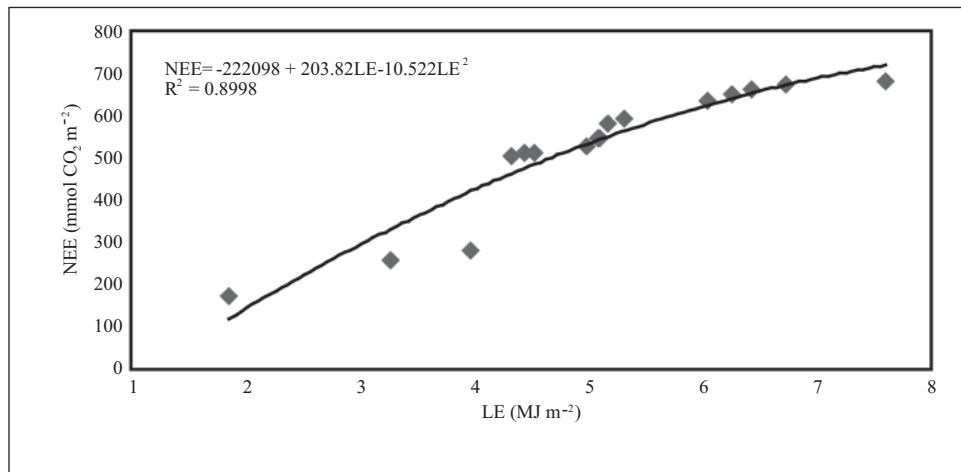
Para el tiempo correspondiente a este estudio, la eficiencia intrínseca promedio del uso del agua por la superficie vegetal fue $248.90 \text{ mmol CO}_2 \text{ L}^{-1} \text{ m}^{-2}$ ($4.46 \text{ mmol mol}^{-1}$). Esta eficiencia fue muy similar a las eficiencias reportadas para otros cultivos de cobertura total. Por ejemplo, Baldocchi (1994) observó la misma eficiencia de $4.5 \text{ mmol mol}^{-1}$ para maíz y trigo, bajo las mismas condiciones ambientales y en su máximo desarrollo foliar. La eficiencia promedio del uso de la PAR en la fijación de CO_2 fue 4.70% . Esto significa que la mayor parte de PAR absorbida (95.3%) no participa en la fijación de CO_2 y la planta debe disipar dicha radiación en forma de calor y transpiración.

Figura 3. Relación entre el flujo integrado del intercambio neto de bióxido de carbono del ecosistema vegetal (NEE) y la radiación fotosintéticamente activa (PAR) absorbida integrada por el dosel del cultivo de caña de azúcar. Santa Anita, Xicoténcatl, Tamaulipas, México, noviembre de 2008



Fuente: elaboración propia.

Figura 4. Relación entre el flujo integrado del intercambio neto de bióxido de carbono del ecosistema vegetal (NEE) y el flujo de calor latente integrado (LE) sobre el dosel del cultivo de caña de azúcar. Santa Anita, Xicoténcatl, Tamaulipas, México, noviembre de 2008



Fuente: elaboración propia.

Conclusiones

La máxima tasa de intercambio neto de bióxido de carbono a la hora de mayor incidencia de radiación solar fue de hasta $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, y los flujos integrados de la asimilación de CO_2 fueron hasta cuatro veces mayor que los flujos integrados de la liberación nocturna. Esto indicó el alto potencial de fijación de CO_2 que tiene este ecosistema. Se observó una relación cuadrática directamente proporcional entre los flujos integrados del intercambio neto de bióxido de carbono (NEE) y los flujos integrados del flujo de calor latente (LE) y entre los flujos integrados de NEE y los flujos integrados de la PAR absorbida por el dosel del cultivo.

Referencias

- Baldocchi, D. (1994), "A Comparative Study of Mass and Energy Exchange Rates Over a Closed C3 (Wheat) and an Open C4 (Corn) Crop: II. CO_2 Exchange and Water Use Efficiency", *Agric. For. Meteorology*, 67, pp. 291-321.

- Glaz, B.; D.R. Morris and S.H. Daroub (2004), "Sugarcane Photosynthesis, Transpiration and Stomatal Conductance Due to Flooding and Water Table", *Crop Sci.*, 44, pp. 1633-1641.
- Martens C; T.J. Shay; H.P. Mendlovitz; D.M. Matross; S.S. Saleska; S.C. Wofsy; W.S. Woodward; M.C. Menton; J.M.S. de Moura; P.M. Crill; O.L.L. de Moraes and R.L. Lima (2004), "Radon Fluxes in Tropical Forest Ecosystem of Brazilian Amazonia: Night-Time CO₂ Net Ecosystem Exchange Derived from Radon and Eddy Covariance Methods", *Glob. Chang. Biol.*, 10, pp. 618-629.
- Omary, M. and F.T. Izuno (1995), "Evaluation of Sugarcane Evapotranspiration from Water Table Data in the Everglades Agricultural Area", *Agricultural Water Management*, 27, pp. 309-319.
- Saliendra N.Z.; F.C. Meinzer; M. Perry and M. Thom (1996), "Associations Between Partitioning of Carboxylase Activity and Bundle Sheath Leakiness to CO₂, Carbon Isotope Discrimination, Photosynthesis and Growth in Sugarcane", *Journal of Experimental Botany*, 47(3), pp. 907-914.
- UNC (Union Nacional de Cañeros) (2007), disponible en www.caneros.org.mx consultado en diciembre.
- Yoshikazu, S., K. Reiji, I. Masato and O. Moriya (2005), "Evapotranspiration from a Sugarcane Field in the Miyako Islans", *Journal of Agricultural Meteorology*, 61(1), pp. 77-81.
- Watanabe, K.; T. Yamamoto; T. Yamada; T. Sakuratani; E. Nawata; C. Noichana; A. Sributta and H. Higuchi (2004), "Changes in Seasonal Evapotranspiration, Soil Water Content, and Crop Coefficients in Sugar Cane, Cassava and Maize Fields in Northeast Thailand", *Agricultural Water Management*, 67(2), pp. 133-143.
- Zermeño González, A. (2007), "Balance de energía sobre superficies vegetales y su aplicación en la agricultura", *Memorias del XVII Congreso Nacional de Ingeniería Agrícola. Bermejillo*, Durango, noviembre de 2007.

**Extractos metanólicos de plantas silvestres
con actividad antirradical**
*Methanolics extracts of wild plant
with antirradical activity*

R.G. Rodríguez Garza,¹ R.A. Garza Padrón,¹ N.S. Martínez Cruz,¹
M.E. Morales Rubio,^{1*} J.F. Treviño Neávez,¹
M.P. Barrón González¹

Resumen

Los compuestos denominados radicales libres son sintetizados de forma natural en los organismos aeróbicos. En condiciones de estrés fisiológico, su producción tiende a incrementarse de forma desmedida y con el tiempo causan estrés oxidativo, dañando los componentes celulares. En el ser humano, esta producción desmedida de radicales libres está involucrado con enfermedades crónico degenerativas como la aterosclerosis, Parkinson, Alzheimer, etc. Debido a lo nocivo de estos radicales, es imprescindible la búsqueda de productos naturales que puedan frenar o atenuar los daños que causan. Tomando lo anterior como base, se inició un estudio con la finalidad de determinar el potencial antirradical/antioxidante de: *Ariocarpus kotschoubeyanus*, *Ariocarpus retusus*, *Fouquieria splendens*, *Rubus adenotrichus*, *Eynsenhardtia texana*, *Astrophytum capricorne* y *Astrophytum myriostigma*. Se realizó un estudio fitoquímico preliminar a estos extractos y para la determinación de la actividad antirradical se utilizaron dos métodos: cualitativo y cuantitativo. Primero se colocaron los cuatro extractos de las especies en estudio sobre placas de sílica gel 60 F₂₅₄ Fisher, en donde se colocó una cantidad de cada extracto así como

¹ Universidad Autónoma de Nuevo León, av. Universidad s/n, c.p. 66451, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, Mexico, tel. 83294110, ext. 6468, correo electrónico: mmorales1132000@yahoo.com

la vitamina C como control positivo, utilizando como revelador una solución de DPPH (1,1-Difenil-2-picrihidrazil) radicales libres desecados al 0.04%. Después de dejar secar el solvente del extracto, se agregó la solución reveladora de DPPH por aspersion sobre la placa cromatográfica. Para la cuantificación de la actividad antioxidante se utilizó el método de Cottele y otros (1996) y se evaluaron los extractos metanólicos de las especies para determinar la actividad antioxidante. Se utilizó el método del radical libre DPPH, el cual reduce el radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo en la 2,2-difenil-1-picril hidracina por la acción antioxidante de compuestos que contienen grupos –OH que decoloran el reactivo DPPH. En todos los extractos se determinó la presencia de flavonoides. Se observó que el extracto de *Rubus adenotrichus* mostró una mejor actividad comparada con los demás extractos teniendo una CE₅₀ de 48.9 µg/mL. Estos resultados permiten inferir que esta especie vegetal puede ser una posible fuente de aditivos alimenticios; así como también relacionar que los posibles mecanismos antirradicales están en función con el contenido de compuestos fenólicos en el extracto.

Abstract

Free radicals are synthesized naturally in aerobics organisms, in conditions of physiological stress, their production increase excessively and with time is cause of oxidative stress, damaging cellular components on humans, the excessive production of free radicals is involved with chronic degenerative diseases. Because of harmful effects of these radical, is essential to search natural products that can stop or mitigate the damage they cause. Considering the above mentioned, began a study with the aim of establishing the potential antirradical/antioxidant, was carried out. A preliminary phytochemical study was conducted with several species: *Ariocarpus kotschoubeyanus*, *Ariocarpus retusus*, *Fouquieria splendens*, *Rubus adenotrichus*, *Eynsenhardtia texana*, *Astrophytum capricorne* and *Astrophytum myriostigma*. For the determination of antirradical activity two methods were used: qualitative and quantitative. A quantity of each extract was placed on plate of silica gel 60 F₂₅₄ (Fisher) as well as the Vitamin C (positive control), using a solution of DPPH (1,1-diphenyl-2-picrihidrazil) free radicals to 0.04% as developer. After drying the solvent extract, DPPH revealing solution was added by spraying on the chromatographic plate. For the quantification of the antioxidant activity the method of Cottele and others (1996). The free radical DPPH method reduces the radical 2,2-diphenyl-1-picrilhidracilo in 2,2-diphenyl-1-picril hydrazine by the antioxidant action of compounds that contain groups –OH that fade the reagent DPPH. The presence of flavonoids was

determined in all extracts, it was noted that extract of *Rubus adenotrichus* showed a CI_{50} 48.9 $\mu\text{g/mL}$, these results allow us to infer that this plant species can be a possible source of food additives; as well as relate to the possible antiradical mechanisms are a function of the content of phenolic compounds in the extract.

Introducción

Recientemente se ha registrado un marcado interés por los radicales libres y la función que desempeñan en los sistemas biológicos. Los radicales libres son muy reactivos y pueden ser formados tanto por la pérdida como por la ganancia de un electrón, se sintetizan sobre todo en condiciones de estrés fisiológico causando daños a la célula, ADN y en tejidos del cuerpo humano (Molina, 2001; Halliwell, 1994; Pryor, 1997).

La incapacidad de nuestro organismo para neutralizar los radicales libres a los que nos exponemos diariamente como contaminantes, alimentos, medicamentos, etc. (Sood y otros, 2009), nos obliga a recurrir a componentes con la propiedad de neutralizarlos. Estos compuestos actúan liberando electrones en nuestra sangre que son captados por los radicales libres convirtiéndose así en moléculas estables (Desmarchelier, y otros 1998). Muchos compuestos químicos tienen la capacidad de inhibir o disminuir significativamente a los radicales libres en el organismo e impedir su formación; se les conoce como compuestos antioxidantes (García y otros, 2001; Halliwell, 1995). Entre estas sustancias antioxidantes se encuentran las antocianinas, polifenoles y flavonoides (Rao y Balachandran, 2002; Rao y Agarwal, 2000), sustancias que estando presentes a baja concentración con respecto a una molécula oxidable (biomolécula), retarda o previene la oxidación, protegiendo directa o indirectamente a las células contra los efectos adversos de numerosas drogas, sustancias carcinogénicas y en la prevención de numerosas patologías como problemas cardiovasculares, enfermedades crónicas degenerativas e incluso el proceso de envejecimiento (aterosclerosis, Parkinson, Alzheimer, cáncer, entre otros) (Bendich, 1990; Madhavi y otros, 1996; Gutteridge y Halliwell, 1996; Pérez y otros, 2006).

Para la evaluación de la actividad de los radicales libres existen diversos métodos, pero el más utilizado sobre extractos de plantas, alimentos o sólo compuestos, es la reacción del DPPH, ya que ha sido muy difundida entre tecnólogos de alimentos e investigadores por lo fácil de esta metodología (Kondo y otros, 2002; Kondo y otros, 2004; Saint-Crieq y otros, 1999; Sánchez y Saura, 1998; Sánchez, 2002; Skupien y Oszmianski, 2004; Von Gadow y otros, 1997; Zhang y Hamazu, 2003; Lo Scalzo, 2008) coincidiendo con lo implementado por Treviño y otros (2006) al utilizar esta técnica, en donde reporta que *Echinocereus stramineus* presentó una actividad

antioxidante relevante con una CE_{50} de 25 ppm mientras que *E. polystachya* se ha reportado con una CE_{50} de 5500 ppm (Cantú Cabello, 2001) sin haberse identificado el compuesto, pero Pérez (2004) determina que el compuesto antioxidante de *E. polystachya* es un flavonoide. Lee y otros (2002), evaluaron la propiedad antioxidante de un extracto etanólico de *Opuntia ficus-indica* var. Saboten mediante varias técnicas, concluyendo que debido a la alta cantidad de fenoles (180.3 mg/g), puede ser que estos compuestos sean los responsables de la propiedad antioxidante del extracto probado.

Debido a los daños ocasionados por los radicales libres, es imprescindible la búsqueda de productos que puedan frenar o atenuar los daños causados por estos, las plantas son una fuente importante de sustancias conocidas como metabolitos secundarios, algunos de los cuales pueden tener propiedades antioxidantes. Tomando lo anterior como base, se inició un estudio con la finalidad de determinar el potencial antirradical/antioxidante de: *Ariocarpus kotschoubeyanus*, *Ariocarpus retusus*, *Fouquieria splendens*, *Rubus adenotrichus*, *Eynsenhardtia texana*, *Astrophytum capricorne* y *Astrophytum myriostigma*.

Materiales y métodos

Material vegetativo

Las especies *Ariocarpus kotschoubeyanus*, *Ariocarpus retusus*, *Fouquieria splendens*, *Eynsenhardtia texana*, *Astrophytum capricorne*, *Astrophytum myriostigma* fueron colectadas en el estado de Nuevo León, mientras que *Rubus adenotrichus*, en el estado de Veracruz.

Obtención de extractos: Los tallos de cada especie se pesaron, maceraron y se colocaron en matraces Erlenmeyer que fueron perfectamente cerrados después de adicionarle metanol, como solvente de extracción. Los matraces se mantuvieron en agitación constante en el agitador Dual Action Shaker Lab Line a temperatura ambiente durante tres días. Después, cada uno de los extractos fueron filtrados con papel Whatman Núm. 2; se obtuvieron las muestras y se concentraron en el Rotavapor Büchi 461, posteriormente fueron almacenados en refrigeración.

Identificación de oxidrilos fenólicos: Se utilizó cloruro férrico al 12.5% y las muestras se disolvieron en metanol en placas de cerámica de 12 pozos (Domínguez, 1973).

Identificación de flavonoides: Se realizó la prueba química de identificación (Domínguez, 1973), utilizando los reactivos de H₂SO₄ y Shinoda (limaduras de Mg y HCl). Los extractos fueron disueltos en metanol y se utilizaron placas de cerámica de 12 pozos.

Determinación y cuantificación de actividad antirradical: Se utilizaron dos métodos: cualitativo y cuantitativo. Para la determinación cualitativa, primero se colocaron los cuatro extractos de las especies en estudio sobre placas de sílica gel 60 F₂₅₄ Fisher, en donde se colocó una cantidad de cada extracto así como el control positivo (vitamina C), se utilizó como revelador una solución de DPPH (1,1-Difenil-2-picrilhidrazil) al 0.04%. Después de dejar secar el solvente del extracto, se agregó la solución reveladora de DPPH por aspersión sobre la placa cromatográfica. Para la cuantificación de la actividad antioxidante se utilizó el método de Cottele y otros (1996). Se evaluaron los extractos metanólicos de las especies para determinar la actividad antioxidante mediante la reacción del radical libre DPPH, el cual reduce el radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo en la 2,2-difenil-1-picril hidracina por la acción antioxidante de compuestos que contienen grupos –OH que decoloran el reactivo DPPH. *Solución de DPPH:* Se preparó una solución 0.1 mM de DPPH en etanol que inmediatamente se protegió de la luz para evitar su degradación.

Diluciones de cada extracto: Se preparó una solución stock de cada extracto, a una concentración de 1 mg de extracto seco en 1 mL de metanol, posteriormente se hicieron diluciones para obtener concentraciones de 10, 20, 50, 70 y 100 µg/mL.

Diluciones de vitamina C: Se elaboró una solución stock de ácido ascórbico a una concentración de 1 mg en 1 mL de metanol y posteriormente se hicieron las siguientes diluciones de 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20 µg/mL.

Reacción de neutralización del radical: La mezcla de la reacción se determinó en tubos de ensaye, se hicieron cuatro repeticiones por cada concentración de cada extracto, en dos eventos independientes. A cada tubo se adicionó 750 µL de solución de DPPH y 250 µL de cada una de las disoluciones de cada extracto. Como control positivo se utilizaron las diluciones de ácido ascórbico (vitamina C). La absorbancia se midió transcurridos los 30 minutos a una longitud de onda de 517 nm en un espectrofotómetro Spectronic Genesys 5. Con el propósito de determinar la CE₅₀ (Concentración Efectiva Media) de cada uno de los extractos metanólicos y de la vitamina C, se diseñó el experimento en base al análisis Probit, mediante el programa SPSS versión 17.

Resultados y discusión

En cuanto a la identificación de oxidrilos fenólicos y flavonoides mediante las pruebas coloridas, fue positivo para todas las especies. Con respecto a la prueba preliminar de la presencia de los radicales libres en los extractos metanólicos de las especies en estudio, se observa que todas las muestras presentan antioxidantes aunque algunas en mayor cantidad como en el caso de *F. splendens* 3), *R. adenotrichus*

6) y *E. texana* 7), mientras que las muestras restantes, la actividad fue menor como se observa en la figura 1.

Figura 1. Presencia de antioxidantes de manera cualitativa en los extractos metanólicos



1) *A. k.*, 2) *A. r.*, 3) *E. s.*, 4) *A. m.*, 5) *A. c.*, 6) *R. a.*, 7) *E. t.* y 8) Vitamina C (control positivo)
Fuente: elaboración propia.

Tabla 1. Actividad antioxidante de los extractos metanólicos y control positivo mediante el método con DPPH

Extractos y vitamina C	CE ₅₀ (µg/mL)
Vitamina C	12.03
<i>Rubus adenotrichus</i>	48.09
<i>Fouquieria splendens</i>	130.02
<i>Eynsenhardtia texana</i>	152.04
<i>Ariocarpus retusus</i>	258.02
<i>Astrophytum capricorne</i>	302.08
<i>Ariocarpus kotschoubeyanus</i>	335.04
<i>Astrophytum myriostigma</i>	3961.03

Fuente: elaboración propia.

Para determinar la concentración efectiva media (CE₅₀ considerada como la concentración de la muestra requerida para atrapar el 50% de radicales DPPH libres) (Pérez y otros, 2006) de cada uno de los extractos metanólicos; los valores se analizaron mediante el análisis Probit, con el programa SPSS versión 17. En la tabla I se muestran los resultados obtenidos para la actividad antioxidante de los extractos metanólicos y vitamina C en la reacción con DPPH; en donde se observa que el extracto de *Rubus adenotrichus* mostró una mejor actividad comparada con los demás extractos teniendo una CE₅₀ de 48.9 µg/mL mientras *Fouquieria splendens* presentó una CE₅₀ de 130.2 µg/mL, seguido de *Eynsenhardtia texana* con una CE₅₀ de 152.4 µg/mL a diferencia del resto de las especies que mostraron una CE₅₀ de valores superiores a los 200 µg/mL, considerándose con menor capacidad atrapadora de los radicales libres, comparados con el ácido ascórbico o vitamina C con una CE₅₀ de

12.3 µg/mL; coincidiendo con lo que mencionan Nenadis y Tsimidou (2002) que al obtener valores menores en la CE_{50} , es mayor la actividad antioxidante.

Es importante notar que varias de las propiedades medicinales del género *Eysenhardtia* pertenecen a los flavonoides, en especial las isoflavonas que aparecen sobre todo en las especies de la familia de las leguminosas. Las propiedades que presentan las isoflavonas son variadas, citándose su acción estrogénica, antiaterogénica, antioxidante, antitumoral, vasodilatadora y antiagregante plaquetaria (Carretero Accame, 2001). En el caso de los extractos concentrados de las cactáceas del presente estudio indican la presencia de oxidrilos fenólicos, lo que hace suponer que estos compuestos pueden ser los responsables de la actividad antioxidante.

Conclusiones

De la presente investigación se puede inferir que el extracto metanólico de *Rubus adenotrichus* presentó una actividad antirradical alta comparada con las otras especies estudiadas, sin embargo, *Fouquieria splendens* y *Eysenhardtia texana* también podrían considerarse como fuentes de compuestos antirradicales libres y su uso alternativo tanto en la industria alimenticia o farmacéutica, para la creación de nuevos fármacos con aplicación quimioprotectora.

Referencias

- Bendich A. (1990) "Antioxidant Micronutrients and Immune Responses", *Acad. Sci.*, 587, pp. 168-80.
- Cantú Cabello, G.M. (2001), "Actividad Antioxidante de Extractos de 15 Plantas Nativas de Nuevo León", *Tesis de licenciatura*, México, UANL, Facultad de Ciencias Biológicas.
- Carretero Accame, M.E. (2001), "Las isoflavonas: utilidades y necesidades de control farmacéutico", *Panorama Actual Med*, 25 (244), pp. 564-567.
- Cottele, N.; J.L. Bernier; J.P. Catteau; P. Pommery; J.C. Wallet and E.M. Gaydou (1996), "Antioxidants Properties of Hydroxyl-Flavones", *Free Radical Biol. Med.*, 20, pp. 35-43.
- Desmarchelier C., J. Coussio and G. Ciccía (1998), "Antioxidant and Free Radical Scavenging Effects in Extracts of the Medicinal Herb *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC", *Braz J Med Biol Res.*, 31(9), pp. 1163-70.
- Domínguez, X.A. (1973), *Métodos de Investigación Fitoquímica*, México, Limusa, pp. 39-44; 141-143; 211-228 y 246.

- García, L.; L. García; D. Rojo y E. Sánchez (2001), “Plantas con Propiedades Antioxidantes”, *Revista Cubana Investigaciones Biomédicas*, 20(3), pp. 231-235.
- Gutteridge, J.M.C. and B. Halliwell (1996), “Antioxidants in Nutrition, Health, and Disease”, Oxford University Press.
- Halliwell, B. (1994), *Free Radicals, Antioxidants and Human Diseases: Curiosity, Cause or Consequence?*, *Lancet* 344, pp. 721-724.
- Halliwell, B.; M.A. Murcia; S. Chirico and O.I. Aruoma (1995), “Free Radicals and Antioxidants in Food and *in vivo*: What They Do and How They Work?”, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 35, pp. 7-20.
- Kondo, S.; K. Tsuda; N. Muto and S. Nakatani (2002), “Changes in Antioxidant Activity During Fruit Development in Citrus Fruits”, *Horticultural Research*, Japan, 1, pp. 63-66.
- Kondo, S.; H. Yoshikawa and R. Katayama (2004), “Antioxidant Activity in Astringent and Non-Astringent Persimmons”, *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 79, pp. 390-394.
- Lee, J.C.; H.R. Kim; J. Kim and Y.S. Jang (2002), “Antioxidant Property of an Ethanol Extract of the Stem of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*”, *Journal Agriculture Food Chemistry*, 50(22), pp. 6490-6.
- Lo Scalzo, R. (2008), “Organic Acids Influence on DPPH Scavenging by Ascorbic Acid”, *Food Chemistry* 107, pp. 40-43.
- Madhavi, D.L.; S.S. Desphande and D.K.Salunkhe (1996), *In Food Antioxidants*, Dekker, New York.
- Molina Salinas, G. M. (2001), “Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos metanólicos y hexánico del clavo (*Eugenia caryophyllata*)”, *Tesis de Maestría Escuela de Graduados*, UANL, Fac. de Medicina.
- _____ (2004), “Aislamiento y caracterización de compuestos con actividad bactericida y/o bacteriostática de plantas del noreste de México sobre cepas de *Mycobacterium tuberculosis* sensibles y multidrogoresistentes”, *Tesis de Doctorado*, UANL, Escuela de Graduados, Facultad de Medicina.
- Nenadis, N. and M. Tsimidou (2002), *Observations on the Estimation of Scavenging Activity of Phenolic Compounds Using Rapid 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) Tests*, *JAOCS*, 79(12), pp. 1191-1195.
- Pérez, L.R.; M.M.R. García; V.M. Martínez and H.M. Soto (2006), “Actividad citotóxica y antioxidante de *Petiveria alliacea*”, *Revista Chapingo*, Serie horticultura, 12(1), pp. 51-56.
- Pérez, M.H.M.; C.A. Oranday; M.C. Rivas y S.M. Verde (2004), “Identificación de compuestos con actividad antioxidante en *Hedeoma drummondii*_(póleo),

- Eysenhardtia polystachya* (palo azul) y *Acacia rigidula* (chaparro prieto)”, *Revista Salud Pública y Nutrición*, núm. 1, edición especial.
- Pryor, W.A. (1997), “Cigarette Smoke Radicals and Role of Free Radicals in Chemical Carcinogenicity”, *Environ Health Perspect*, 105, pp. 875-882.
- Rao, A.V.; B. Balachandran (2002), “Role Oxidative Stress and Antioxidants in Neurodegenerative Disease”, *Nutr. Neurosci.*, 5, pp. 291-309.
- Rao, A.V. and S. Agarwal (2000), “Role of Antioxidant Lycopene in Cancer and Heart Disease”, *J. Am. Coll. Nutr.*, 19, pp. 563-9.
- Saint Cricq de Gaulejac, N.; C. Provost and N. Vivas (1999), “Comparative Study of Polyphenol Scavenging Activities Assessed by Different Methods”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, pp. 425-431.
- Sanchez Moreno, C. (2002), “Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems”, *Food Science and Technology International*, 8, pp. 121-137.
- Sanchez Moreno, C.; J.A. Larrauri and F. Saura Calixto (1998), “A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols”, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76, pp. 270-276.
- Sood, S.; B. Arora; S. Bansal; A. Muthuraman; G.N. Singh; R. Arora; M. Bali and P.D. Sharma (2009), “Antioxidant, Anti-Inflammatory and Analgesic Potential of the *Citrus decumana* L. Peel Extract”, *Inflammopharmacology*, 17, pp. 267-274.
- Skupien, K.; J. Oszmianski (2004), “Comparison of Six Cultivars of Strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.) Grown in Northwest Poland”, *European Food Research and Technology*, 219, pp. 66-70.
- Treviño, N.J.F.; C.A. Oranday; M.C. Rivas; S.M.J. Verde; G.M.A. Núñez and R.M.E. Morales (2006), “Potencial Antioxidante en Cactáceas”, *Revista electrónica RESPYN*, núm. 14.
- Von Gadow, A.; E. Joubert and C.F. Hansmann (1997), “Comparison of the Antioxidant Activity of Rooibos Tea with Green, Oolong and Black Tea”, *Food Chemistry*, 60, pp. 73-77.
- Zhang, D. and Y. Hamauzu (2003), “Phenolic Compounds, Ascorbic Acid, Carotenoids and Antioxidant Properties of Green, Red and Yellow Bell Peppers”, *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 1, pp. 22-27.

Producción de bioplaguicidas por fermentación sumergida para el control de hongos fitopatógenos y malezas

Biopesticides production by submerged fermentation for the control of phytopathogenic fungi and weeds

M.E. Díaz de Villegas;¹ P. Villa Gómez;¹ A. Bell García;¹
E. Torres Castañeda;¹ J. Martínez Valdivieso¹

Resumen

Para combatir las plagas se emplean diferentes métodos entre los que se encuentra el uso de agroquímicos, que si bien son efectivos, contaminan el medio ambiente y provocan daños a la salud del hombre, por lo que la tendencia actual es hacia el desarrollo de tecnologías para la producción de bioplaguicidas, los que pueden estar constituidos por la biomasa del microorganismo o por los metabolitos activos producidos por ellos. Las bacterias del género *Pseudomonas* spp., producen diversos metabolitos como antibióticos, sideróforos, cianuro de hidrógeno, enzimas como proteasas, fitotoxinas, fitohormonas y ácido salicílico, que pueden ser empleados en el control de diferentes enfermedades producidas por microorganismos fitopatógenos y en el control de malezas. La *Pseudomonas aeruginosa* PSS, de la colección de cultivo del ICIDCA, produce el sideróforo pioverdin, metabolitos antimicrobianos y fitotoxinas, en dependencia del medio de cultivo y condiciones de fermentación. En el presente trabajo se presentan los resultados obtenidos en la producción

¹ Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA), c.p. 11000, Ciudad de la Habana, Cuba, tel. (537)-696-7015, correo electrónico: mariaelena.diaz@icidca.edu.cu

a escala piloto, caracterización y evaluación de los bioplaguicidas HERBIO (bioherbicida) y GLUTICID (antifúngico).

Ambos productos se obtienen a partir de la *Pseudomonas aeruginosa* PSS, en condiciones de cultivo sumergido específicas para cada producto, en fermentadores de 500 L de capacidad, seguido de las operaciones de centrifugación, evaporación y secado. El medio de producción del HERBIO está constituido por glicerina como fuente de carbono y sales, mientras que el de GLUTICID contiene ácido glutámico y sales. Los productos en polvo resultantes GLUTICID y HERBIO, tienen 98% de materia seca. El GLUTICID tiene una concentración de metabolitos antimicrobianos de 30-85 mg/g de polvo y 70 mg/g de pioverdín y un pH entre 5-6, mientras que el bioherbicida, contiene 10 mg de fitotoxina expresada como proteína por g de polvo y pH 4.5. La caracterización de los metabolitos que constituyen los principios activos de los productos, a partir de los sobrenadantes libres de células, se realizó empleando diferentes técnicas cromatográficas, las que permitieron identificar en el GLUTICID, el sideróforo Pioverdin II, formado por un compuesto cromóforo, constituido por 2,3-diamino-6,7-hydroxiquinolina unido a un péptido de 6 a 10 aminoácidos que contiene grupos hidroxamatos y metabolitos antimicrobianos del tipo monoacetylfloroglucinol. Para el caso del HERBIO, la actividad fitotóxica está dada por las fitotoxinas de naturaleza peptídica de PM cercano a mil Da. El GLUTICID es efectivo en el control de la enfermedad moho azul (*Peronospora tabacina*) del tabaco (*Nicotiana tabacum*), tiene un efecto comparable al Mancozeb en el control de *Alternaria solani* en el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) y papa (*Solanum tuberosum*) y *Pseudoperonospora cubensis* en pepino (*Cucumis sativus* L). El HERBIO ejerce un control satisfactorio sobre las malezas dicotiledóneas *Ipomoea trifida* (marrullero), *Croton lobatus* (frailecillo cimarrón), *Chamaecyse hyssopifolia* (hierba lechera) y *Euphorbia heterophylla* (hierba lechosa).

Abstract

Today's agriculture demands the reduction of chemical pesticides, which although effective, pollute the environment and cause harm to human health, so the trend worldwide is towards the introduction of sustainable systems that include the development of technologies for the production of biopesticides, which are constituted by biomass of the microorganism or active metabolites produced by them. Bacteria of genus *Pseudomonas* spp, produce various metabolites such as antibiotics, siderophores, proteases and phytotoxins, which can be used in the monitoring of different diseases caused by pathogenic microorganism, and weed control. This work presents the re-

sults obtained in pilot scale production, characterization and evaluation of bioherbicide HERBIO and the antifungal product GLUTICID from *Pseudomonas aeruginosa* PSS in submerged culture conditions specific to each product, followed by centrifugation, evaporation and drying. GLUTICID has a concentration of antimicrobial metabolites of 30-40 mg/g commercial product and 0.45-0.50 mg/g of siderophores Ploverdin II, and commercial product HERBIO contain peptide phytotoxins with molecular weight around 1000 Da. GLUTICID is effective in the control of *Peronospora tabacina* in tobacco, *Alternaria solani* in tomato culture and potato, *Pseudoperonospora cubensis* in cucumber. HERBIO control dicotyledoneous weeds *Ipomoea trifida*, *Croton lobatus*, *Chamaecyse hyssopifolia* and *Euphorbia heterophylla*.

Introducción

Entre las problemáticas de la agricultura, se encuentran las enfermedades causadas por hongos fitopatógenos y malezas, que generan costos económicos y ambientales. Para controlar los mismos, se emplean métodos convencionales, entre los que se encuentran la aplicación de plaguicidas químicos, que si bien son efectivos, contaminan el medio ambiente y la salud de los trabajadores (Fernández y Juncosa, 2002; Mazariegos, 2003). Debido a esto, ha surgido la necesidad de buscar nuevas alternativas para su control, a través de metodologías seguras y con menor impacto ambiental. Una de ellas es el control biológico utilizando bioplaguicidas (Pérez y Vázquez, 2005; David, 2003), los cuales pueden ser obtenidos a través de procesos biotecnológicos (Kameswara, 2003). Los biopesticidas son productos que contienen un microorganismo como ingrediente activo o bien se extraen de un ser vivo mediante procedimientos que no alteran su composición química. Pueden estar constituidos por toda o una parte de la sustancia extraída, concentrada o no, adicionada o no a sustancias coadyuvantes (De Liñan, 2001).

Entre las bacterias que han llamado la atención de los científicos de diferentes países se encuentran las comprendidas en el género *Pseudomonas*, por la capacidad que poseen de producir numerosos metabolitos secundarios entre los que se encuentran: antibióticos, sideróforos, cianuro de hidrógeno, proteasas, fitotoxinas, y ácido salicílico que pueden ser empleados en el control de diferentes enfermedades producidas por fitopatógenos (Höfte y Bakker, 2007, Nielsen y otros, 1998, (Boruah y Kumar 2002). La producción de los metabolitos sideróforos, antibióticos y fitotóxicas por diferentes especies de *Pseudomonas* spp., depende de diferentes factores ambientales como son la fuentes de carbono y nitrógeno, la temperatura, el pH, y los niveles de agitación y aireación entre otros, por lo que los procesos

fermentativos relacionados con la obtención de un metabolito u otro resulta compleja aun cuando se mantengan las mismas condiciones de fermentación (Kraus, y Loper, 1995, Slininger y otros, 1995).

En el Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA), se ha venido trabajando en el desarrollo del antifúngico foliar GLUTICID y el bioherbicida HERBIO a partir de la *Pseudomonas aeruginosa* PSS. En este trabajo se presentan los resultados obtenidos en la producción a escala piloto, caracterización y evaluación de los mismos.

Materiales y métodos

Microorganismo y condiciones de cultivo

Se empleó la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* PSS de la colección de cultivos del ICIDCA aislada del suelo. Para la producción a nivel de planta piloto del GLUTICID y HERBIO, se escogieron las condiciones más promisorias de trabajo de la etapa de micro planta, con las adecuaciones pertinentes referidas a la agitación y aireación en las distintas etapas: preparación de inóculo a nivel de laboratorio en zaranda orbital; pre-fermentación, utilizando los medios diseñados al efecto para cada uno, que para el GLUTICID está constituido por ácido glutámico como fuente de carbono y sales, y para el HERBIO por glicerina como fuente de carbono y sales, en un fermentador Biolafite de 50 L, con un volumen de trabajo de 35 L. La etapa de fermentación, se llevó a cabo en un fermentador Marubishi de 500 L, con un volumen de trabajo de 350 L, en el mismo medio que en el pre-fermentador.

Etapas de Post Fermentación (Down Stream)

Centrifugación: se realizó en una centrifuga Sharples modelo AS26 IJV₁α Laval eMBH, trabajando a 12000 rpm min⁻¹.

Evaporación: la concentración del caldo centrifugado se realizó en el evaporador con régimen discontinuo.

Secado: la operación de secado se efectuó en un secador del tipo secado por aspersión (spray-driers) Niro Atomiser, Copenhagen, Dinamarca. Se empleó como soporte sulfato de amonio.

Determinaciones analíticas

Crecimiento celular: se estimó mediante la medición de la absorbancia a una longitud de onda (λ) a 600 nm en un espectrofotómetro PM 2ª OPTON.

Determinación de fitotoxinas: se realizó a los sobrenadantes libres de células (SLC) por el método del microbiuret (Frankhauser, 2004). Se expresó como mg/mL de proteína.

Determinación de pioverdin: se realizó por medición de la absorbancia a 400 nm y asumiendo el coeficiente de absorción molar reportado para los pioverdines de $\epsilon_{400\text{ nm}} = 20\,000\text{ l x mol}^{-1}\text{x cm}^{-1}$.

Actividad antimicrobiana: se determinó por envenenamiento del medio papa dextrosa agar frente al hongo *Sclerotium rolfsii.*, se incubó a 30° C durante 48 a 144 horas, se midió el diámetro de la colonia diariamente y se comparó con el testigo sembrado en un medio sin envenenar.

Actividad fitotóxica in Vitro: se realizó en placas petri con papel de filtro humedecido, sobre hojas de romerillo recién cortada, sobre las que se aplicaron 100 mL de muestra sobre la superficie adaxial. A las hojas testigos, se aplicó 100 mL de agua. Se emplearon tres hojas por tratamiento a evaluar. Las placas se sellaron con parafilm y se dejaron a temperatura ambiente. El efecto fitotóxico cualitativo (Hartman y otros, 1984) se midió cada 24 horas según escala graduada de 1 al 4.

Cromatografía en placa delgada: la separación de la fitotoxina de los contaminantes no peptídicos del HERBIO, se llevó a cabo en placas de sílica gel de 10 x 20cm, activadas a 100°C, en las cuales se aplicó 15µl de los extractos etanólicos. Las placas fueron desarrolladas en los siguientes sistemas de solventes:

Acetato de etilo - isopropanol - agua 15:30:20, cloruro de metileno - acetona 9: 2
n - butanol - ácido acético - agua 4: 1: 1.

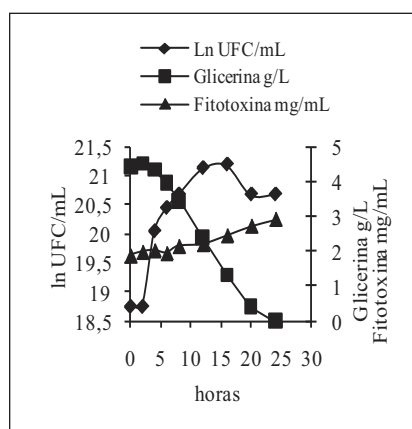
Espectros de los sideróforos libres y del sideróforo-Fe(III) del GLUTICID

Los espectros de absorción en las regiones visibles y ultravioleta, de los sobrenadantes libres de células de los cultivos obtenidos por centrifugación, se determinaron en un espectrofotómetro Hitachi 100-40, después de realizadas las diluciones apropiadas utilizando buffer fosfato 0.2 M pH 7 empleado una cubeta (1 cm de paso de luz), conteniendo 3 ml de muestra y midiendo la absorbancia en las regiones visibles y uv utilizando buffer fosfato 0.2 M pH 7 como blanco. Los correspondientes a los sideróforo-Fe (III), se realizaron añadiendo 10mL de una solución fresca de FeCl_3 3.25 mM, a 3 mL de los sobrenadantes libres de células.

Resultados y discusión

El principio activo del herbicida bioquímico HERBIO, son las fitotoxinas producidas por la *Pseudomonas aeruginosa* PSS. Los resultados obtenidos, en el crecimiento celular, producción de fitotoxinas y consumo de glicerina, aparecen en la figura 1. En la cinética del crecimiento celular se puede apreciar un crecimiento rápido con una fase de latencia mínima (dos horas), seguido de una fase logarítmica que termina alrededor de la hora 16, en la que la velocidad específica de crecimiento máxima (μ_{max}), está en el orden de 0.24 h^{-1} . El rendimiento biomasa / sustrato $Y(x/s)$ es de 28% y el rendimiento producto sustrato $Y(p/s)$ de 69.45 por ciento. El HERBIO formulado en forma de polvo humedecible, tiene las siguientes características: 4% de humedad, 9 mg de fitotoxina expresada como proteína por g de producto comercial, pH: 4.5. En el bioensayo de la actividad fitotóxica en hojas del HERBIO al 10%, produjo la necrosis total de las hojas de romerillo a los cuatro días.

Figura 1. Crecimiento celular, producción de fitotoxinas y consumo de glicerina por la *Pseudomonas aeruginosa* PSS



Fuente: elaboración propia.

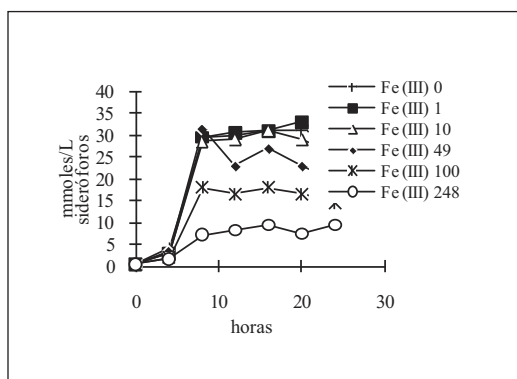
Las manchas púrpuras que aparecen en los cromatogramas del sistema de solvente n- butanol —ácido acético— agua 4: 1: 1, y revelado con ninhidrina de las muestras disueltas tanto en agua como en etanol, con R_f 0.42 y 0.34, corroboran la naturaleza peptídica de la fitotoxina.

En los ensayos de campo, las mezclas de HERBIO más el surfactante-acidificante AG-5 (el último ajustado a pH 5 o coloración violeta) ejercen un control satisfactorio

sobre las malezas dicotiledóneas *Ipomoea trifida*, *Croton lobatus*, *Chamaecyse hyssopifolia*, *Euphorbia heterophylla* y *Vigna vexillata* con las dosis de 6.25, 12.5, 25 y 50 kg/ha, resultando comparable al estándar de 2,4-D éster a la dosis máxima (50 kg/ha). La especie *Cyperus rotundus* también resulta controlada aceptablemente y mejor que el citado estándar con las dosis más altas (25 y 50 kg/ha). No se apreciaron daños fitotóxicos visibles en la variedad de caña de azúcar CP 52-43.

El fungicida de naturaleza bioquímica GLUTICID contiene metabolitos antimicrobianos y el sideróforo Pioverdin II. En la producción de sideróforos, la concentración de hierro, es el factor más importante que debe tenerse en cuenta, ya que la síntesis de este metabolito ocurre como respuesta de la célula ante una situación de estrés, producida por una limitación de hierro en el medio, por lo cual a mayor concentración de Fe (III), menor será la producción de sideróforos para atrapar las trazas de este ión en el medio circundante y necesario para el metabolismo celular (Vasil and Ochsner, 1999). En el caso de la producción del GLUTICID, a pesar de que el mayor crecimiento celular de la *Pseudomonas aeruginosa* PSS, se alcanza con valores superiores a 10 mM de Fe (III), la producción de sideróforos disminuye sensiblemente a estas concentraciones, es decir el crecimiento y la producción de sideróforos son inversamente proporcionales a la concentración de Fe (III). Correspondiéndose con la producción de sideróforos, se produce un incremento del pH de 7 a 8.5, lo cual sugiere que la alcalinidad del medio es importante para evitar la destrucción de este metabolito, lo cual ha sido planteado también por Budzikiewicz (1993).

Figura 2. Producción de sideróforos por la *Pseudomonas aeruginosa* PSS en función del (Fe III) añadido



Fuente: elaboración propia.

El GLUTICID formulado en forma de polvo humedecible tiene 98% de materia seca, una actividad antimicrobiana del 100% frente al hongo *Sclerotium rolfsii*. Contiene de 30-40 mg/g de metabolitos antimicrobianos formados por antibióticos del tipo monoacetilfloroglucinol y 0.45-0.50 mg/g del sideróforo Pioverdin II, el cual es un pigmento amarillo- verdoso cuya estructura está formada por un grupo cromóforo, constituido por 2,3-diamino-6,7-hydroxiquinolina, unido a un péptido de 6 a 10 aminoácidos que contiene grupos hidroxamatos y exhibe una alta afinidad por el hierro (Budzikiewicz, 1999).

El espectro uv-vis correspondiente al pioverdin libre, presenta un máximo a una longitud de onda (λ) de 390 nm a los tres pH estudiados, lo que indica que es dependiente del mismo. Este resultado concuerda con lo reportado por Abdallah (1991) como una característica de los pioverdines libres. En relación con el espectro del complejo sideróforo-Fe (III), muestra un máximo a pH 7 relacionado con el sistema quinolina, reportado para estos compuestos por Budzikiewicz (1997). Asimismo a pH 4.5 y 8.2 también se observa un máximo a λ 400 nm, similar a lo reportado por Abdallah (1991), sobre un máximo a λ 403 nm a pH entre 3 y 8.

El modo de acción del GLUTICID, es mediante la inhibición de los hongos fitopatógenos por medio del antibiótico monoacetilfloroglucinol, y el pioverdin (competencia por el hierro trivalente). La aplicación foliar a una concentración entre 5 y 6 g de producto comercial por litro, produce un efecto comparable al Mancozeb, Zineb y mejor que el Fundazol, por lo que puede sustituir a estos fungicidas químicos. Su mayor contribución esta en la protección preventiva y al inicio de la incidencia de los patógenos. Previene y reduce enfermedades producidas por la *Alternaria solani*, en papa y tomate, tizón tardío *Phytophthora infestans* en papa, *Peronospora tabacina* en tabaco, *Uromyces phaseoli* en frijol y *Pseudoperonospora cubensis* en *curcubitáceas*. Controla los hongos inferiores contaminantes del cultivo de los hongos comestibles del género *Pleurotus ostreatus*. Se emplea además en la protección de la semilla botánica de la caña de azúcar para disminuir los hongos fitopatógenos del suelo que provocan enfermedades en las posturas como el damping off.

Referencias

- Abdallah, M.A. (1991), "Pyoverdins and Pseudobactins", in *Handbook of Microbial Iron Chelates*, G. Winkelmann (ed.), Boca Ratón, CRC Press, INC., pp 139-153.
- Boruah H.P.D. and B.S.D. Kumar (2002), "Biological Activity of Secondary Metabolites Produced by Strain of *Pseudomonas fluorescens*", *Folia Microbiologica*, 47, pp. 359-363.

- Budzikiewicz H. (1993), "Secondary Metabolites from Fluorescent Pseudomonads", *FEMS Microbiol. Rev.*, 104, pp. 209-228.
- Budzikiewicz H. (1997), "Siderophores from Fluorescent Pseudomonas", in *Studies in Natural Products Chemistry*, Atta-ur-Rahman (ed.), vol. 19, Elsevier Science B. V, pp. 793-835.
- Budzikiewicz H. (1999), *Aislamiento e identificación de Pioverdin de Pseudomonas sp., cepa PSS*, Instituto de Química Orgánica, Universidad de Koln.
- David R.G. (2003), "Bioplaguicidas: raíces históricas, situación actual y mercados globales", en *Simposio Internacional de Bioplaguicidas para Países en Desarrollo*, U. Röttger y R. Muschler (ed.), Costa Rica, CATIE, Octubre 28-30, pp. 10-13.
- De Liñan, C. (2001), *Vademécum de productos fitosanitarios y nutricionales*, Madrid, Ediciones Agrotécnicas S.L., 670 pp.
- Fernández C. y R. Juncosa (2002), *Biopesticidas: ¿la agricultura del futuro?*, Phytoma, 141, pp. 14-19.
- Frankhauser, B.D. (2004), "Protein Assay by Microbiuret Standardization", *DBF's Hopkins Notebook III*, p. 102 and VI p. 75.
- Hartman C.L.; T.J. McCoy and T.R. Knous (1984), "Selection of Alfalfa (*Medicago sativa*) Cell Lines and Regeneration of Plants Resistant to the Toxin(s) Produced by *Fusarium oxysporum* f. sp. *medicaginis*", *Plant Science Letters*, 34, pp. 183-194.
- Höfte M and P.A.H.M. Bakker (2007), "Competition for Iron and Induced Systemic Resistance by Siderophores of Plant Growth Promoting Rhizobacteria", in *Soil Biology*, A. Varma and S. Chincholkar (eds), vol. 12, cap. 6, pp. 121-130.
- Kameswara R.C. (2003), "Fermentation Biotechnology", in *Foundation for Biotechnology Awareness and Education*.
- Kraus, J. and J.E. Loper (1995), "Characterization of a Genomic Region Required for Production of the Antibiotic Pyoluteorin by the Biological Control Agent *Pseudomonas fluorescens* Pf-5", *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, pp. 849-854.
- Mazariegos L.A. (2003), "Bioplaguicidas: Consideraciones del sector privado sobre los estándares industriales y la calidad del producto", en *Simposio Internacional de Bioplaguicidas para Países en Desarrollo*, U. Röttger y R. Muschler (ed.), Costa Rica, CATIE, Octubre 28-30, pp. 44-50.
- Nielsen N.M.; Fels J. Sorensen and H.C. Pendersen (1998), *Secondary Metabolite – and Endochitinase– Dependent Antagonism toward Pant-Pathogenic Microfungi of Pseudomonas fluorescens Isolates from Sugar Beet Rhizosphere Applied and Environmental Microbiology*, vol. 64, num. 10, pp. 3563-3569.
- Pérez N y L. Vázquez (2005), "Manejo de Plagas", *Manejo Ecológico de Plagas*, 21, pp. 38.

- Slininger P.J. and M.A. Shea Wilbur (1995), "Liquid-Culture pH, Temperature, and Carbon (not Nitrogen), Source Regulate Phenazine Productivity of the Take-All Biocontrol Agent *Pseudomonas fluorescens* 2-79", *Appl Microbiol Biotechnol*, 43, p. 794-80.
- Vasil M.L. and U.A. Ochsner (1999), "The Response of *Pseudomonas aeruginosa* to Iron: Genetics, Biochemistry and Virulence", *Mol. Microbiol.*, 34, pp. 399-413.

Tolerancia a inhibidores del hidrolizado de bagazo de caña por *S. cerevisiae* ITV-01 y *P. stipitis* NRRL y-7124
*Tolerance of inhibitors present in the sugar cane bagasse hydrolizate by *S. cerevisiae* ITV-01 and *P. stipitis* NRRL*

B. Gutiérrez,¹ M.G. Aguilar Uscanga²

Resumen

El comportamiento cinético y metabólico de ambas cepas frente al ácido acético fue diferente, debido a que *S. cerevisiae* ITV-01 mostró mayor resistencia que *P. stipitis* NRRL Y-7124 a los compuestos tóxicos. En este sentido, *S. cerevisiae* presentó un consumo de glucosa mayor al 97% hasta los 3 g/L de ácido acético, disminuyendo gradualmente al aumentar la concentración de acético, sin embargo, *P. stipitis* mostró un consumo del 100%, únicamente en la concentración de 1 g/L de acético disminuyendo drásticamente el crecimiento celular al aumentar la concentración del ácido. De forma similar al evaluar su tolerancia al furfural, *S. cerevisiae* ITV-01 (consumo mayor de glucosa al 80% hasta los 3g/L de furfural) presentó mayor tolerancia que *P. stipitis* NRRL Y-7124 (consumo máximo de 45% de xilosa). Por otro lado, las dos cepas no presentaron cambios en la producción de etanol al ser expuestas al 5-hidroximetilfurfural, el cual fue consumido al 100%; se afectó únicamente la producción de biomasa. De acuerdo con estos resultados, *S. cerevisiae* ITV-01 presenta mayor tolerancia que *P. stipitis* NRRL Y-7124 a los principales inhibidores presentes en el hidrolizado de bagazo de caña, en las concentraciones evaluadas.

¹ Instituto Tecnológico Superior de Tierra Blanca.

² Unidad-Instituto Tecnológico de Veracruz, av. Miguel Ángel de Quevedo núm. 2772, col. Formando Hogar, c.p. 91860, ITV, Veracruz, correo electrónico: gaguilar@itver.edu.mx.

Abstract

Important differences in the kinetic and metabolic behaviour of both strains were observed due to *S. cerevisiae* ITV-01 was more resistant to the toxic components tested than *P. stipitis* NRRL Y-7124. Glucose uptake was greater than 97% up to 3 g/L acetic acid, decreasing gradually at higher acetic acid concentrations. In *P. stipitis* NRRL Y-7124, however, 100% glucose uptake was only observed at 1 g/L acetic acid and cellular growth decreased drastically at greater acetic acid concentrations. Furfural tolerance in *S. cerevisiae* ITV-01 (glucose uptake >80% up to 3g/L furfural) is greater than in *P. stipitis* NRRL Y-7124 (maximum xylose uptake of 45%). Neither microbial strain tested presented changes in ethanol production when exposed to 5-hidroximetilfurfural (100% consumed); only biomass production was affected. According to these results, *S. cerevisiae* ITV-01 showed more tolerance than *P. stipitis* NRRL Y-7124 to the main inhibitors present in sugar cane bagasse at the concentrations tested.

Introducción

El bagazo de caña es un residuo vegetal, considerado como fuente alternativa para producir bioetanol. Entre los pretratamientos empleados para degradar esta biomasa en moléculas más sencillas, se encuentra la hidrólisis ácida, a partir de la cual se pueden formar inhibidores del crecimiento celular, entre ellos destacan por su toxicidad el ácido acético, el furfural y el 5-hidroximetilfurfural. Por otro lado, el aprovechamiento integral de las hexosas y pentosas presentes en el hidrolizado de bagazo de caña para la producción de etanol puede permitir un proceso económicamente más competitivo. En este sentido, en el laboratorio de bioingeniería del ITV se aisló una levadura identificada como *S. cerevisiae* ITV-01, la cual posee características de gran interés para la industria alcoholera. Puede fermentar un amplio rango de azúcares, pero no las pentosas como la xilosa. Por otro lado, *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 puede fermentar xilosa a etanol con escasa producción de xilitol. Por lo anterior, una estrategia que se propone como el uso integral de los azúcares presentes en el hidrolizado de bagazo de caña, es el uso de un cultivo mixto con estas dos levaduras con el fin de poder optimizar el proceso de producción de etanol, por lo cual dentro de los objetivos particulares de este estudio, se tiene la evaluación de la tolerancia a los inhibidores presentes en el hidrolizado de bagazo de caña por *S. cerevisiae* y *P. stipitis* NRRL Y-7124, con el fin de conocer cómo afectarían la presencia de estos compuestos en el metabolismo de ambas levaduras.

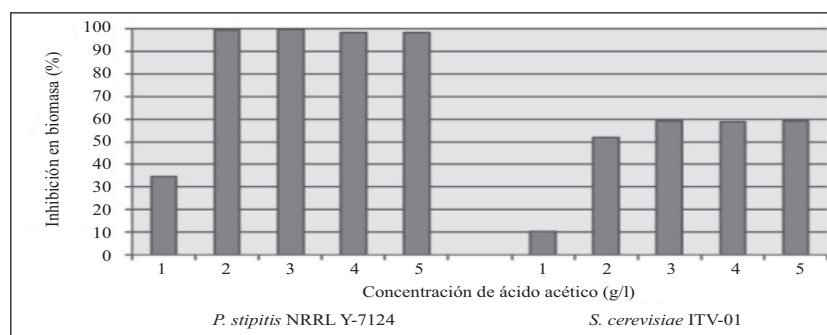
Metodología

Las cepas de *S. cerevisiae* ITV-01 y *P. stipitis* NRRL fueron expuestas a diferentes concentraciones de cada uno de los inhibidores. Entre ellos, ácido acético (1, 2, 3, 4 y 5 g/L), furfural (1, 2 y 3 g/L) y 5-hidroximetilfurfural (0.2, 0.5 y 0.7 g/L), en cultivo por lote, medio mínimo reportado por Strehlaiano (1986), 20 g/L de glucosa y xilosa respectivamente para cada cepa, 150 rpm y 30°C. La concentración de xilosa, glucosa, xilitol, glicerol, etanol, ácido acético, furfural y 5-hidroximetilfurfural fue determinada mediante HPLC utilizando una columna Shodex SH1011-P.

Resultados y discusión

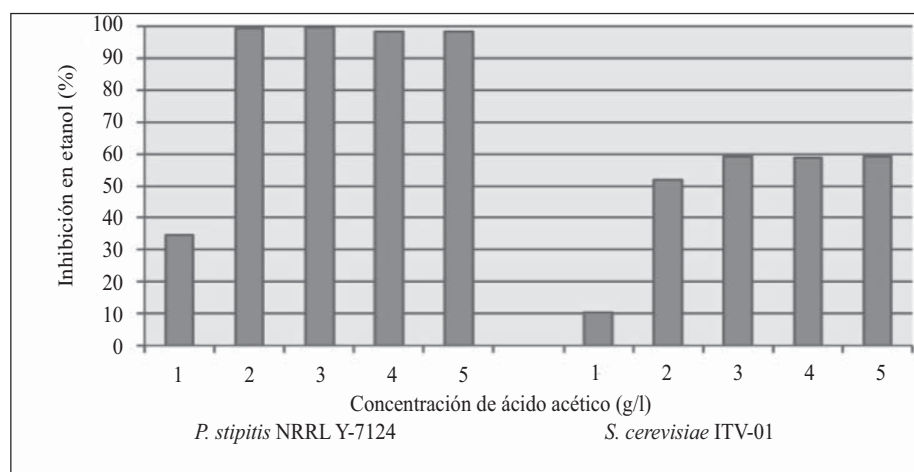
Para las dos levaduras, el mayor efecto de inhibición por la presencia de ácido acético sobre la producción de biomasa y etanol fue para *P. stipitis* NRRL Y-7124, mientras que para *S. cerevisiae* ITV-01 el efecto de inhibición en biomasa presentó mayor intensidad que el observado para etanol (figuras 1 y 2). Lo anterior, ha sido también reportado por Pampulha y Loureiro (1989), hasta 90% cuando la concentración de ácido acético fue de 100 mM. En nuestros resultados, el rendimiento global de etanol permanece constante en las diferentes pruebas evaluadas, sin embargo, la actividad fermentativa es afectada, la velocidad promedio de síntesis de etanol disminuye cuando la concentración de ácido acético se incrementa (tabla 1).

Figura 1. Efecto del ácido acético sobre la producción de biomasa para *P. stipitis* NRRL Y.7124 y *S. cerevisiae* ITV-01



Fuente: elaboración propia.

Figura 2. Efecto del ácido acético sobre la producción de etanol para *P. stipitis* NRRL Y.7124 y *S. cerevisiae* ITV-01



Fuente: elaboración propia.

Tabla 1. Parámetros de fermentación de *S. cerevisiae* ITV-01 para diferentes concentraciones de ácido acético

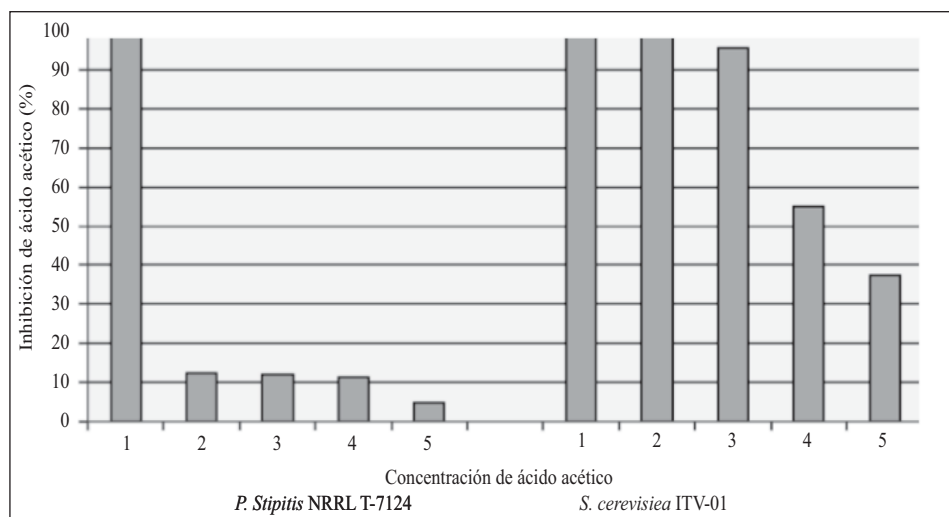
Concentración de ácido acético (g/L)	Biomasa máxima (g/L)	$Y_{x/s}$ (g/g)	$Y_{e/s}$ (g/g)	Productividad (g/L h)	Azúcar consumido
1	3.9	0.20	0.33	0.35	100
2	2.1	0.10	0.33	0.35	100
3	2.0	0.10	0.31	0.32	100
4	1.8	0.08	0.33	0.22	100
5	1.8	0.07	0.32	0.17	100
Testigo	4.41	0.23	0.41	0.97	100

Fuente: elaboración propia.

Como se ha venido mencionando, la presencia de ácido acético en el medio de crecimiento afecta mayormente el metabolismo de *P. stipitis* NRRL Y-7124, a partir de una concentración de 2 g/L de este ácido. El carácter débil del ácido acético favorece que en su forma no disociado sea liposoluble y pueda difundirse a través de la membrana plasmática. El efecto de inhibición del crecimiento que se presenta sobre los microorganismos se ha propuesto sea debido a la influencia de este ácido no

disociado sobre el citosol. En el caso de *S. cerevisiae* ITV-01, observamos un comportamiento diferente en la presencia de este ácido débil, debido a que se activa la ATPasa de la membrana plasmática y se incrementa la capacidad de bombeo de protones de la célula (Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000). De acuerdo a lo anteriormente expuesto, en la figura 3 se presenta un mayor consumo de ácido acético para *S. cerevisiae* ITV-01, en respuesta de su mayor tolerancia al medio.

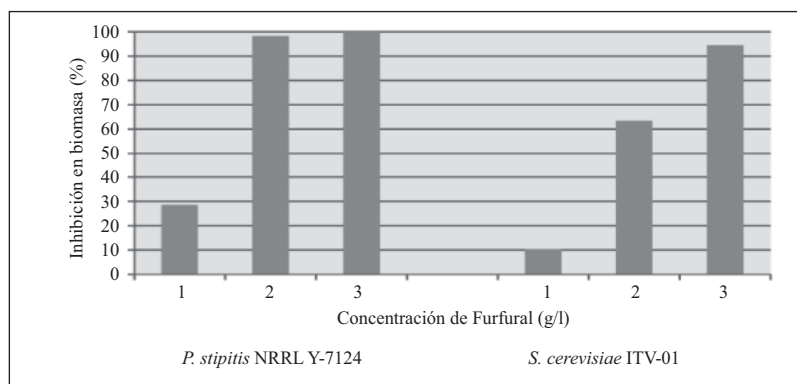
Figura 3. Consumo de ácido acético para *P. stipitis* NRRI Y.7124 y *S. cerevisiae* ITV-01



Fuente: elaboración propia.

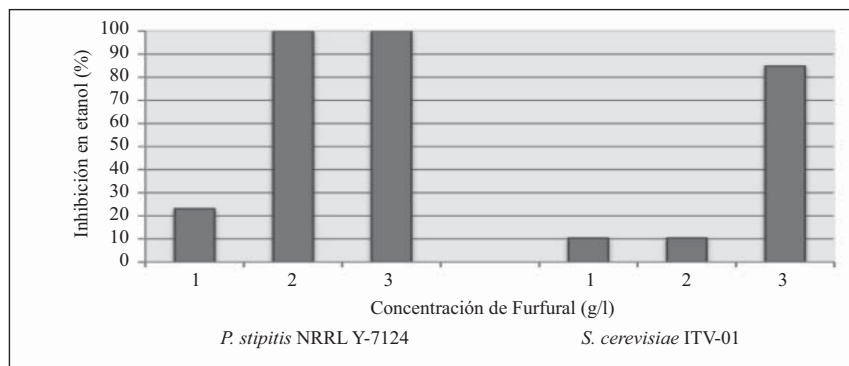
Por otro lado, el furfural y el 5-hidroximetilfurfural afectan el crecimiento y metabolismo de los microorganismos. De estos dos compuestos, el furfural es el que mayor efecto inhibitorio presenta durante la fermentación, principalmente para *P. stipitis* NRRL Y-2174 en la que a partir de 2 g/L el porcentaje de inhibición en la producción de biomasa y etanol fue mayor al 90% (figura 4 y 5). Durante la fermentación, el furfural es reducido a furfural alcohol, reportándose para *P. stipitis* una inhibición del crecimiento por la presencia de furfural alcohol (Weigert y otros, 1988), mientras que para *S. cerevisiae* se ha reportado un menor efecto (Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000).

Figura 4. Efecto del furfural sobre la producción de biomasa para *P. stipitis* NRRI Y.7124 y *S. cerevisiae* ITV-01



Fuente: elaboración propia.

Figura 5. Efecto del furfural sobre la producción de etanol para *P. stipitis* NRRI Y.7124 y *S. cerevisiae* ITV-01

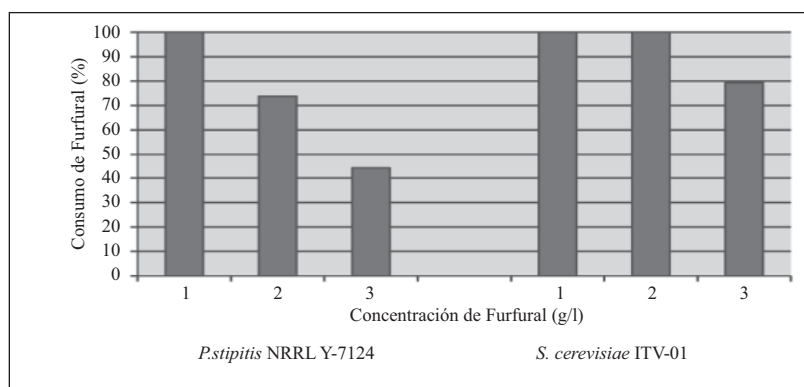


Fuente: elaboración propia.

Por otra parte, durante el inicio de la fermentación el furfural es asimilado y degradado (figura 6). Un periodo de muerte celular se presenta durante este proceso al completarse, las células que permanecen se propagan y completan la fermentación, de acuerdo a lo reportado por Palmqvist, y otros (1996). Un retraso en la fase *lag*, fue observado en las concentraciones evaluadas de furfural para *S. cerevisiae* ITV-01, indicando probablemente que la levadura requiere de un período de adaptación

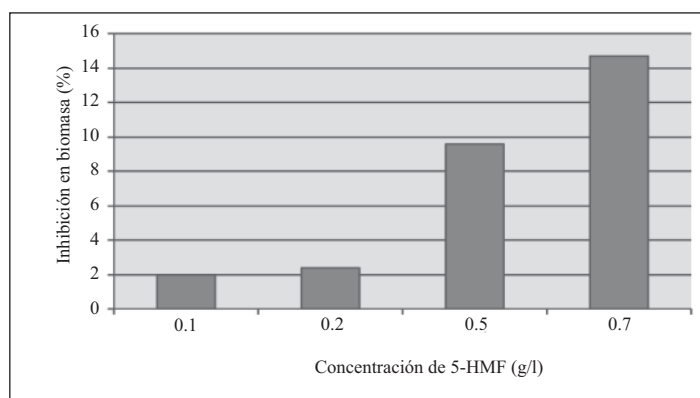
debido a la presencia de esta sustancia y en la que es convertida a furfural alcohol, su forma menos tóxica. Por ello, en la figura 6 observamos este proceso de conversión para ambas cepas, que disminuye gradualmente al incrementarse la concentración de furfural. La mejor adaptación de *S. cerevisiae* al furfural, es debida probablemente a la síntesis de nuevas enzimas o coenzimas necesarias para la reducción del furfural (Palmqvist y Hanh-Hägerdal, 2000).

Figura 6. Consumo de furfural para *P. stipitis* NRRL Y-7124 y *S. cerevisiae* ITV-01



Fuente: elaboración propia.

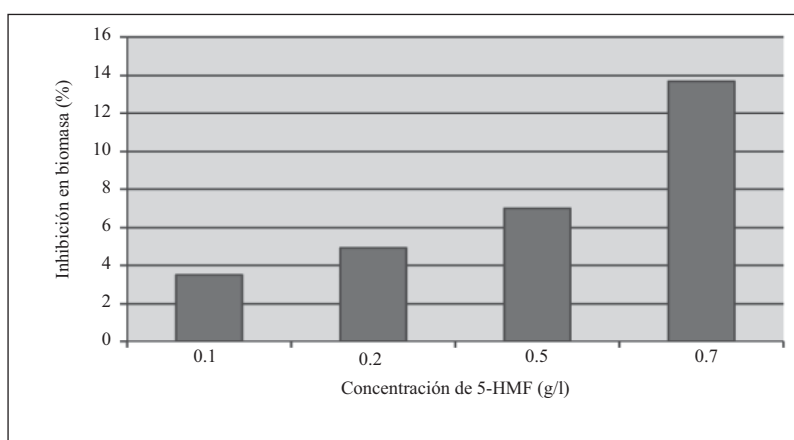
Figura 7. Efecto del 5-hidroximetilfurfural sobre la producción de biomasa para *P. stipitis* NRRL Y-7124



Fuente: elaboración propia.

El hidroximetilfurfural es también metabolizado por *P.stipitis* NRRL Y-7124 y *S. cerevisiae* ITV-01, presentándose el efecto de inhibición únicamente en la producción de biomasa (figura 8 y 9), sin afectar la síntesis de etanol. Se ha reportado también, que el principal producto de conversión del 5-hidroximetilfurfural es el furfural alcohol, lo cual sugiere un mecanismo similar al presentado en la inhibición por furfural (Palmqvist y Hanh-Hägerdal, 2000).

Figura 8. Efecto del 5-hidroximetilfurfural sobre la producción de biomasa para *S. cerevisiae* ITV-01



Fuente: elaboración propia.

Conclusiones

S. cerevisiae ITV-01 se adapta mejor a la presencia de ácido acético, furfural y 5-hidroximetilfurfural en todas las concentraciones evaluadas en este estudio que *P. stipitis* NRRL Y-7124, lo cual favorece la resistencia de la primera cepa a los principales inhibidores presentes en el hidrolizado de bagazo de caña. Lo anterior, puede favorecer que en un cocultivo empleando estas dos cepas, se pueda disminuir el efecto de los inhibidores sobre la producción de biomasa y etanol para *P. stipitis* NRRL Y-7124, añadiendo en primera instancia a *S. cerevisiae* ITV-01. Lo anterior refleja la capacidad de *S. cerevisiae* ITV-01 para regular las condiciones del medio y favorecer la adaptación de *P. stipitis* NRRL Y-7124 en el hidrolizado con el fin de lograr desarrollar un proceso óptimo de producción de etanol a partir del bagazo de caña de azúcar.

Referencias

- Palmqvist, E. and B. Hanh-Hägerdal (2000), “Fermentation of Lignocellulosic Hydrolysates. II: Inhibitors and Mechanism of Inhibition”, *Bioresource Technology*, 74, pp. 25-33.
- ; M. Galbe and G. Zacchi (1996), “The Effect of Water-Soluble Inhibitors from Steam-Pretreated Willow on Enzymatic Hydrolysis and Ethanol Fermentation”, *Enzyme and Microbial Technology*, 19, pp. 470-476.
- Phowchinda, O.; M.L. Délia Dupuy and P. Strehaiano (1995), “Effects of Acetic Acid on Growth and Fermentative Activity of *S. cerevisiae*”, *Biotechnol. Lett.*, 17(2), pp. 237-242.
- Weigert, B.; K. Klein; M. Rizzi; C. Lauterbach and H. Dellweg (1988), “Influence of Furfural on the Aerobic Growth of the Yeast *P. Stipitis*”, *Biotechnol. Lett.*, 10(12), pp. 895-900.

**Utilización de carbón activo inmovilizado
para la recuperación de productos
o eliminación de sustancias contaminantes**
*Utilization of entrapped activated carbon
in the recovery of products
or in the removing of contaminated substances*

*A.B. Moldes;¹ X. Vecino,¹ R. Devesa Rey,¹
M.G. Bustos;² J.M. Cruz¹*

Resumen

En este trabajo se hace una revisión de distintas operaciones de adsorción llevadas a cabo con carbón activo inmovilizado, principalmente utilizando alginato de calcio. El carbón activado es un derivado del carbón altamente poroso y con un área superficial muy elevada que favorece la adsorción de compuestos. La adsorción con carbón activado se puede considerar una tecnología limpia desde el punto de la gestión medio ambiental, ya que el carbón activado no supone riesgo alguno para la salud humana. De hecho se utiliza en medicina como tratamiento en casos de envenenamiento o intoxicaciones. Sin embargo la utilización del carbón a nivel industrial puede presentar algunos problemas derivados de su estructura fina y su área superficial elevada, que lo hacen difícil de manejar sobre todo cuando se utilizan membranas. Por tanto en este trabajo se propone la utilización de carbón

¹ Departamento de Ingeniería Química, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales, Universidad de Vigo, c.p. 36310, Vigo, España, correo electrónico: amoldes@uvigo.es

² Unidad Académica Multidisciplinaria Mante, Universidad Autónoma de Tamaulipas, blvd. Enrique Cárdenas González núm. 1201 Col. Jardín, c. p. 89840, Ciudad Mante Tamaulipas, México.

activado atrapado en alginato de calcio para la eliminación de compuestos coloreados. Se muestra como el carbón activado inmovilizado es capaz de eliminar de forma eficaz el color de las aguas residuales procedentes de una industria vitivinícola, disminuyendo en gran medida el impacto medioambiental que este tipo de residuos produce.

Abstract

In this chapter we summarize different adsorption processes, carried out with entrapped activated carbon, principally using calcium alginate beads. Activated carbon is a form of carbon, with high amount of porous and with a very large surface area. The adsorption with activated carbon can be considered a friendly technology from the environmental point of view, because activate carbon almost does not suppose risk for the human health. In fact it is employed in medicine to treat cases of poisoning or intoxication. However, the industrial utilization of activated carbon has some problems due to its fine texture and high superficial area that is difficult to manage, mostly when membranes are used, by increasing significantly the time and the cost of the analysis. Consequently, in this chapter we propose the utilization of entrapped activated carbon in calcium alginate beads, to remove colored compounds. We show how entrapped activated carbon is able to remove efficiently the color from the residual water produced by the winery industry decreasing the environmental impact produced by this kind of residues.

Introducción

La adsorción es un proceso por el cual átomos, iones o moléculas son atrapados o retenidos en la superficie de un material. Por tanto se llama adsorción al fenómeno de acumulación de partículas sobre una superficie. En este caso la superficie sería el carbón activo inmovilizado. La sustancia que se adsorbe se denomina adsorbato y el material sobre el cual se realiza la adsorción es el adsorbente. El proceso inverso de la adsorción es la desorción.

El carbón activo es un adsorbente utilizado ampliamente en diferentes procesos industriales, debido a su capacidad de adsorber gran cantidad de sustancias de diferente naturaleza, ya sean compuestos orgánicos, metales pesados, así como sustancias de naturaleza coloreada que crean un gran impacto ambiental cuando son emitidas al medio ambiente. El carbón activo se encuentra en el mercado en forma granular o en forma

de polvo, aunque este último presenta una mayor efectividad en los procesos de adsorción debido a su elevada área superficial. Frente a su capacidad de adsorción favorable el carbón activo presenta varios inconvenientes que derivan principalmente de su elevada área superficial. Entre estos inconvenientes encontramos el difícil manejo del mismo, así como su facilidad para obturar membranas. Para evitar este tipo de desventajas, se podría llevar a cabo una inmovilización del mismo, lo que favorecería su utilización, así como su regeneración y almacenaje. Además algunos autores han apuntado que el carbón activo inmovilizado tiene un enorme potencial para eliminar compuestos químicos utilizados en agricultura a partir de disoluciones acuosas, utilizando bajas concentraciones de adsorbente, que favorecería la rentabilidad del proceso (Yong-Bo y otros, 2005).

Por otra parte, el ácido algínico es un ácido no tóxico de viscosidad elevada en forma de polisacárido coloidal que se obtiene de forma natural de las paredes celulares de algunas algas. Sus sales sódicas, cálcicas y potásicas se denominan alginatos y se emplean frecuentemente en la industria alimentaria como espesantes y emulsionantes. Además las sales de alginato, sobre todo el alginato de calcio, son utilizadas con frecuencia para inmovilizar microorganismos o enzimas. Otra aplicación del alginato cálcico se basa en la inmovilización de compuestos con capacidad de adsorción entre los que se encuentran el carbón, el quitosano (Gotoh y otros, 2004), el alcohol polivinílico (Jeon y otros, 2002a), carboxilatos (Jeon y otros, 2002b) y ácidos húmicos (Pandey y otros, 2003).

Procesos de adsorción llevados a cabo con carbón activo inmovilizado

Algunos autores han propuesto la utilización de carbón activo inmovilizado para la eliminación de metales pesados así como compuestos orgánicos de aguas residuales procedentes de diferentes industrias. En algunos casos este carbón activo ha sido combinado con otros adsorbentes con el fin de favorecer el proceso de adsorción.

El carbón activo como único adsorbente

El carbón activo inmovilizado en esferas de alginato cálcico, presenta carga negativa y por tanto adsorbe compuestos neutros, como el *p*-clorofenol, y compuestos cargados positivamente, como el azul de metileno (Yong-Bo y otros, 2005). Se ha comprobado también, que la adsorción de compuestos cargados negativamente como

el ácido gálico o naranja de metilo sobre carbón activo inmovilizado se ve favorecida incrementando la concentración de iones calcio; ya que los iones calcio neutralizan la carga negativa del carbón activo inmovilizado, debido a la unión de los grupos carboxilo y los iones Ca, disminuyendo la repulsión entre las cargas negativas del ácido gálico o del naranja de metilo y las cargas negativas del carbón activo inmovilizado. Por otra parte la adsorción de los compuestos cargados positivamente como el azul de metileno, se ve favorecida a bajas concentraciones de iones Ca.

Por tanto cuando se utiliza carbón activo inmovilizado el proceso de adsorción se puede controlar fácilmente variando la concentración de Cl_2Ca utilizada en la formación del gel de alginato cálcico (Yong-Bo y otros, 2005). Por otra parte se ha comprobado que en algunos casos, la capacidad de adsorción del carbón activo inmovilizado se puede ver favorecida cuando se introduce algún otro ion como por ejemplo el Fe-(III), que favorece la adsorción del ácido gálico, incluso por encima de los niveles obtenidos utilizando carbón activo sin inmovilizar. Aunque en otros casos puede suceder totalmente lo contrario, por ejemplo la adsorción del azul de metileno disminuye con el incremento de la concentración de iones Fe (III). Esto puede ser debido a que cuando inmovilizamos carbón activo en alginato cálcico en presencia de iones Fe III el gel que se forma tiene zonas cargadas positivamente, aunque la carga global que predomine sea la negativa (Yong-Bo y otros, 2005). Por tanto se puede decir que las propiedades de adsorción del carbón activo inmovilizado pueden variar en función de la presencia o ausencia de ciertos iones metálicos.

Gurusamy y otros (2002) llevaron a cabo procesos de adsorción en discontinuo para eliminar un colorante, la rhodamina 6G, utilizando carbón activo inmovilizado en esferas de alginato cálcico. Estos autores observaron que trabajando en un rango de concentración de contaminante entre 100 y 300 mg/l, con un pH de entre 7 y 9, una temperatura de entre 30 y 60 °C y una dosis fija de carbón activo inmovilizado de 1 g/L, la variable independiente que más influyó en el proceso de adsorción fue la concentración de contaminante que existía en disolución.

Por otra parte Yong-Bo y otros (2005), comprobaron que el carbón activo sin inmovilizar tiene una capacidad de adsorción parecida a la del carbón activo inmovilizado en esferas de alginato cálcico, excepto cuando se pretende eliminar compuestos húmicos. En este caso la estructura del gel formado alrededor del carbón activo impide el transporte de los ácidos húmicos hasta el interior de la esfera de alginato cálcico, donde se encuentra el carbón activo. Por tanto en el caso de tener que eliminar ácidos húmicos de una disolución acuosa con carbón activo la inmovilización del mismo no sería una buena estrategia a seguir. Aunque si lo que se pretende es una eliminación selectiva de ciertos compuestos, la utilización de carbón activo inmovilizado sería una buena opción. Por ejemplo el carbón activo

inmovilizado representa una alternativa interesante en el tratamiento de aguas, cuando se pretende eliminar de forma selectiva ciertos contaminantes químicos agrícolas, manteniendo componentes beneficiosos como serían los ácidos fúlvicos y ácidos húmicos.

Utilizando 1% de carbón activo inmovilizado en alginato cálcico (formado a partir de una disolución del 2% de alginato sódico y una disolución 0.05 M de CaCl_2), se logra eliminar entre el 95 y 100% de rodamina 6G (Gurusamy y otros, 2002); mientras que utilizando 1.6% de carbón activo inmovilizado en alginato cálcico (formado a partir de una disolución del 1% de alginato sódico y una disolución 0.9 M de CaCl_2), se logra eliminar 95% del *p*-clorofenol, 55% de ácido gálico y 100% de azul de metileno presentes en disolución acuosa (Yong-Bo y otros, 2005).

Combinación de carbón activo y otros adsorbentes

Algunos autores con el fin de incrementar la capacidad de adsorción del carbón activo inmovilizado han utilizado combinación de distintos adsorbatos junto con el carbón activo. Entre los adsorbatos utilizados se encuentra el quitosano, zeolitas o nanopartículas de óxido de Fe. Algunos autores también han propuestos la inmovilización conjunta de carbón activo y microorganismos en esferas de alginato cálcio.

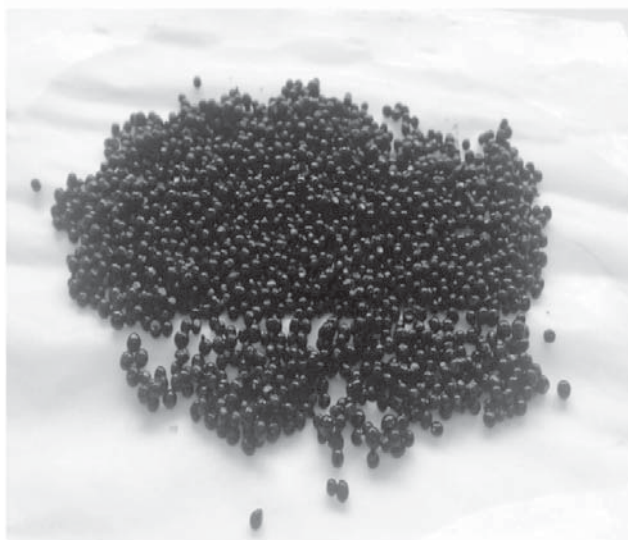
Chang y otros (2009) comprobaron que la adsorción de Hg se ve favorecida cuando el carbón activo se combina con el quitosano respecto a utilizar carbón activo como único adsorbente. Estos mismos autores comprobaron también que el carbón activo y el quitosano inmovilizado en alginato cálcico pueden ser fácilmente regenerados. Por otra parte Choi y otros (2008), proponen la utilización conjunta de carbón activo y zeolitas inmovilizados en esferas de alginato cálcico para la eliminación de Zn y tolueno. Estos autores, utilizando carbón activo y zeolitas inmovilizadas, fueron capaces de eliminar 54% de Zn y 86% de tolueno.

Estudio de un caso: eliminación de compuestos coloreados en vinazas utilizando carbón activo inmovilizado

Con base en los trabajos recogidos en los apartados anteriores, se ha llevado a cabo un proceso de adsorción de compuestos coloreados, a partir de un agua residual procedente de una industria vitivinícola, este tipo de aguas residuales se conocen con el nombre de vinazas. Como adsorbente se utilizó carbón activo inmovilizado en esferas de alginato cálcico.

Para ello se tomaron 100 mL de una disolución con 2% de alginato sódico y se pusieron en contacto con 1 g de carbón activo y a continuación esta suspensión se bombeó a una disolución de CaCl_2 50 mM. Posteriormente las esferas de alginato cálcico con carbón activo inmovilizado se lavaron con agua destilada a 60-70 °C. La 1 corresponde a la imagen de las esferas de carbón activo inmovilizado en alginato cálcico.

Fotografía 1. Aspecto que presentan las esferas de carbón activo inmovilizado en alginato cálcico



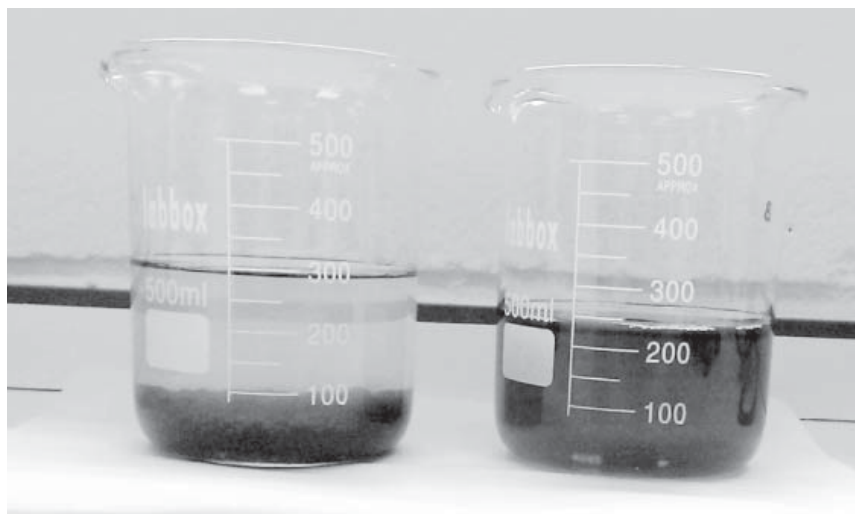
Fuente: elaboración propia.

Posteriormente, para el proceso de adsorción se tomaron 250 mL de vinazas y se pusieron en contacto con el carbón activo inmovilizado a temperatura ambiente, durante 45 minutos, con una agitación de 100 rpm.

En la figura 2 se muestra la diferencia de color que presentan las vinazas antes de llevar a cabo el proceso de adsorción con carbón activo inmovilizado y después del mismo. Se observa que el carbón activo inmovilizado es capaz de eliminar la totalidad de los compuestos coloreados con un 100% de eficacia. Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos por Yong-Bo y otros (2005), los cuales fueron capaces de eliminar en su totalidad el azul de metileno de una disolución acuosa, utilizando carbón activo inmovilizado en esferas de alginato cálcico.

Con base en los resultados obtenidos, cabría pensar que los compuestos coloreados presentes en las vinazas procedentes de vino tinto, están cargados positivamente, ya que según Yong-Bo y otros (2005) el carbón activo inmovilizado en alginato cálcico está cargado negativamente y por tanto su eficacia en los procesos de adsorción se ve favorecida cuando los compuestos que se quieren eliminar tienen carga positiva. Además una ventaja adicional de utilizar carbón activo inmovilizado para eliminar los compuestos coloreados de las vinazas, es que el carbón activo inmovilizado no es capaz de adsorber los ácidos húmicos y fúlvicos de las disoluciones acuosas (Yong-Bo y otros, 2005), con lo cual nos quedaría un agua residual exenta de compuestos coloreados y rica en ácidos fúlvicos y húmicos que podría ser susceptible de ser empleada como agua de riego.

Figura 2. Aspecto que presentan las vinazas antes y después de la adsorción con carbón activo inmovilizado



Fuente: elaboración propia.

Por tanto se puede concluir que el carbón activo inmovilizado puede ser una opción interesante en el tratamiento de aguas residuales procedentes de la industria alimentaria, como es el caso de las vinazas procedentes de la industria vitivinícola, debido a que presenta un elevado rendimiento en la extracción de los compuestos no deseados, disminuyendo además el tiempo de tratamiento en la etapa de filtración con membranas y los costos asociados.

Agradecimientos

Los autores agradecen la financiación recibida por la Xunta de Galicia para la consolidación de grupos emergentes 2009/070 y por los Programas “Angeles Alvariño” y “Ramón y Cajal” financiados por la Xunta de Galicia y el Ministerio de Ciencia e Innovación respectivamente.

Referencias

- Gurusamy, A.; J. Ruey Shin and L. Duu-Jong (2002), “Factorial Design Analysis for Adsorption of Dye on Activated Carbon Beads Incorporated with Calcium Alginate”, *Advances in Environmental Research*, 6, pp. 191-198.
- Yong-Bo, L.; F. Bunshi; T. Norifumi and T. Shunitz (2005) “Removal of Organic Compounds by Alginated Gel Beads with Entrapped Activated Carbon”, *Journal of Hazardous Materials*, 120, pp. 237-241.
- Gotoh, T.; K. Matsushima and K.I. Kikuchi (2004) “Preparation of Alginate-Chitosan Hybrid Gel Beads and Adsorption of Divalent Metal Ions”, *Chemosphere*, 55 (1), pp. 135-140.
- Jeon, C.; J.Y. Park and Y.J. Yoo (2002a), “Novel Immobilization of Alginic Acid for Heavy Metal Removal”, *Biochemical Engineering Journal*, 11 (2-3), pp. 159-166.
- (2002b), “Characteristics of Metal Removal Using Carboxylated Alginic Acid”, *Water Research*, 36(7), pp. 1814-1824.
- Choi, J.W.; S.G. Chung; D.J. Kim and C.E. Lee (2008), “Regeneration of AG-AC Beads for Adsorption of Monoaromatic Compounds”, *Current Applied Physics*, 8(5), pp. 559-562.
- Chang, Y.H.; K.H. Hsieh and F.C. Chang (2009), “Removal of Hg²⁺ from Aqueous Solution Using a Novel Composite Carbon Adsorbent”, *Journal of Applied Polymer Science*, 112(4), pp. 2445-2454.
- Pandey, A.K.; S.D. Pandey; V. Misra and S. Devi (2003), “Role of Humic Acid Entrapped Calcium Alginate Beads in Removal of Heavy Metals”, *Journal of Hazardous Materials*, 98(1-3), pp. 177-181.

**Producción de xilitol por células inmovilizadas
de *Candida tropicalis* IEC5-ITV: efecto del tiempo
de curado y concentración de esferas
de alginato de calcio**

*Production of xylitol by immobilized cells
of *Candida tropicalis* IEC5-ITV:
effects of curing time and concentration
of calcium alginate spheres*

Y. Cocotle Ronzón,¹ A.I. Peña Cardeña,¹ T. Hernández Quiroz,²
M. G. Aguilar Uscanga,³ M. López del Castillo Lozano⁴

Resumen

Se inmovilizó en alginato de calcio la levadura *Candida tropicalis* IEC5-ITV para la producción de xilitol, a partir de xilosa, en un medio de fermentación sintético de composición similar a un hidrolizado de bagazo de caña. La inmovilización se realizó en alginato de sodio al 2% y cloruro de calcio 0.1 M. Mediante un diseño factorial 3², se determinó el efecto de la variación de la condición de inmovilización, tiempo de curado y de la concentración de esferas de algina-

¹ Facultad de Química Farmacéutica Biológica, Universidad Veracruzana, Circuito doctor Gonzalo Aguirre Beltrán s/n, Zona Universitaria, c.p. 91000, Xalapa, Veracruz, correo electrónico: ycocotle@uv.mx

² Centro de Investigaciones en Micro y Nanotecnología (Microna), Facultad de Ingeniería –Veracruz, Universidad Veracruzana.

³ Unidad de Investigación y Desarrollo de Alimentos (UNIDA), Instituto Tecnológico de Veracruz.

⁴ Instituto de Ciencias Básicas, Universidad Veracruzana, tel: 228-841-8931.

to de calcio que contienen la levadura sobre la producción de xilitol; los tiempos de curado evaluados fueron 12, 24 y 36 horas y la concentración de esferas de 135, 185 y 235 g/L. La fermentación se realizó por duplicado en matraces Erlenmeyer de 125 mL con 50 mL de medio de fermentación durante 72 h, a 30 °C y 200 rpm. Se tomaron muestras cada 8 h determinando por HPLC la producción de xilitol y consumo de xilosa y ácido acético. En todos los casos probados se presentó consumo de ácido acético aumentando simultáneamente el pH, en el medio de fermentación, de 5.5 a 8.0. Mediante un ANOVA se concluyó que el tiempo de curado no tiene efecto significativo en la producción de xilitol, pero sí la concentración de esferas. Un tiempo de curado de 36 horas y 285 g/L de concentración de esferas de alginato de calcio representaron las condiciones de inmovilización más apropiadas para la producción de xilitol. La productividad volumétrica, rendimiento y eficiencia de bioconversión obtenidos para estas últimas condiciones fueron 0.20 g/L.h, 0.40 g/g y 44.7% respectivamente. Por último, se observó que la barrera impuesta por el gel de alginato redujo la transferencia del sustrato, disminuyendo la producción de xilitol por la levadura inmovilizada (9.11g/L) con respecto a la levadura en estado libre (13.0 g/L).

Abstract

Candida tropicalis IEC5-ITV cells were immobilized in Ca-alginate beads and used to produce xylitol, from xylose, in a synthetic fermentation medium similar in composition to a hydrolyzed sugarcane bagasse. The immobilization was performed in sodium alginate 2% and 0.1 M calcium chloride. Using a 3² factorial design, we determined the effects of changing the condition of immobilization, curing time and concentration of calcium alginate spheres containing the yeast on the production of xylitol; the curing times tested were 12, 24 and 36 hours while the evaluated concentrations of spheres were of 135, 185 and 235 g/L. Duplicated fermentations runs were carried out in 125 mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL of fermentation which were maintained at 30 °C and 200 rpm for 72h. Samples were periodically analyzed monitoring by HPLC xylose and acetic acid consumption and xylitol production. In every tested case the consumption of acetic acid increased while pH in the fermentation medium increased, from 5.5 to 8.0. Using ANOVA we concluded that curing time has no significant effect on the production of xylitol unlike the concentration of spheres. A curing time of 36 hours and a concentration of 285 g/L of calcium alginate spheres proved to be the most appropriate immobilization conditions within the range of conditions tested. The volumetric

productivity, yield factor and efficiency of bioconversion obtained in these conditions were 0.20 g/L.h, 0.40 g/g and 44.7% respectively. Finally, we observed that the barrier created by the alginate gel reduced the transfer of the substrate, decreasing the production of xylitol by immobilized yeast (9.11 g/L) compared to yeast in a free state (13.0 g/L).

Introducción

El xilitol es un polialcohol tan dulce como la sacarosa que a diferencia de otros edulcorantes, es anticariogénico y tiene un agradable sabor. Es ampliamente utilizado en las industrias alimentaria, farmacéutica y odontológica. Tiene además varias aplicaciones clínicas como sustituto de azúcar, bajo en calorías, en alimentos para diabéticos y en infusiones postquirúrgicas por pacientes con dificultad para metabolizar azúcares; mejora las propiedades biomecánicas de los huesos en el caso de la osteoporosis y previene la otitis media (Mussatto y Roberto, 2002; Sarrouh y otros, 2007).

Actualmente el xilitol se obtiene industrialmente mediante la reducción química de la xilosa, proceso que resulta en un producto caro que limita su uso. La producción biotecnológica de xilitol a partir de hidrolizados hemicelulósicos derivados de residuos agrícolas tales como el bagazo de caña puede ser una promisoría alternativa al método químico ya que constituye un material renovable, barato y que contiene xilosa, el sustrato de la xilosa reductasa, la enzima que cataliza su conversión a xilitol y que se encuentra presente en algunos microorganismos como las levaduras del género *Candida* (Martínez y otros, 2002; Granström y otros, 2007; Prakasham y otros, 2009).

La bioconversión de la xilosa contenida en tales hidrolizados es complicada por la presencia de compuestos tóxicos, los cuales inhiben el crecimiento microbiano y la actividad fermentativa de las levaduras. Estos compuestos son liberados de la estructura lignocelulósica o son originados de la degradación de los azúcares durante el proceso hidrolítico.

Se han propuesto varios métodos para minimizar la toxicidad de estos hidrolizados, entre ellos adaptación y reciclaje de células, tratamiento del hidrolizado con disolventes, neutralización, resinas de intercambio iónico y el uso de altas concentraciones celulares iniciales, que pueden ser obtenidas mediante el uso de sistemas inmovilizados (Carvalho y otros, 2002; Santos y otros, 2007), los cuales permiten además la utilización de las células por largos periodos, aumentan su estabilidad, confieren ventajas en la configuración de los reactores ya que no requieren sistemas de agitación,

además se utilizan de modo repetido y continuo disminuyendo los costos de producción considerablemente (González y otros, 2003). Entre las diversas matrices disponibles para la inmovilización de células destacan las esferas de alginato de calcio, debido a que su método de producción no requiere condiciones drásticas, es económico y las esferas obtenidas se pueden aplicar en procesos alimenticios ya que es un ingrediente aceptado como aditivo alimentario (Carvalho y otros, 2003); sin embargo, su principal desventaja como soporte de inmovilización es su inestabilidad química, la cual de acuerdo a Ogbonna y otros (1989), puede disminuir incubando en solución de cloruro de calcio las esferas de alginato de calcio recién formadas (tiempo de curado).

La levadura *Candida tropicalis* IEC5-ITV, una cepa autóctona productora de xilitol, fue preliminarmente inmovilizada en alginato de calcio, estableciéndose que alginato de sodio al 2% y cloruro de calcio 0.1 M fueron las concentraciones más adecuadas para su inmovilización (Sánchez, 2009). En este trabajo se optimizó la variable de inmovilización, tiempo de curado así como la concentración de esferas de alginato de calcio con la levadura inmovilizada, evaluando su efecto sobre la producción de xilitol a partir de xilosa presente en un medio sintético de composición similar a un hidrolizado de bagazo de caña.

Materiales y métodos

Microorganismo: La levadura *Candida tropicalis* IEC5-ITV fue aislada en el Laboratorio de Bioingeniería de la Unidad de Investigación y Desarrollo de Alimentos (Unida) del Instituto Tecnológico de Veracruz y mantenida a 4 °C en medio de conservación (agar 25 g/L, extracto de levadura 10 g/L y xilosa 20 g/L) (Gastélum, 2007).

Inmovilización de la levadura: Tres asadas de células de la levadura fueron transferidas a un matraz Erlenmeyer de 125 mL con 50 mL de medio sintético de activación (xilosa 20 g/L, KH_2PO_4 , 5 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g/L, $\text{Mg}(\text{SO}_4) \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4 g/L y extracto de levadura 1 g/L, pH 5.5). Se incubó a 30 °C durante 24 h a 250 rpm (Gastélum, 2007). Las células obtenidas después de este tiempo fueron colectadas por centrifugación a 5000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. La biomasa obtenida, se resuspendió en medio de fermentación estéril (xilosa 30 g/L, glucosa 2.68 g/L y arabinosa 3.4 g/L pH 5.5), centrifugándose nuevamente. El paquete celular (3 g/L), con una viabilidad total superior a 85%, se mezcló en un matraz Erlenmeyer con 80 mL de alginato de sodio al 2%, las esferas de alginato de calcio, fueron

producidas por goteo de esta suspensión a un segundo matraz Erlenmeyer provisto de un agitador magnético que contenía 90 mL de una solución de CaCl_2 0.1 M, usando una aguja larga de calibre grueso y una bomba peristáltica. Las esferas de alginato, se mantuvieron en la solución de CaCl_2 por 12, 24 y 36 horas (tiempo de curado) a 4°C.

Fermentación con células inmovilizadas: Las esferas de alginato de calcio con diferentes tiempos de curado se lavaron con agua desionizada estéril y se pesó, en condiciones estériles, la cantidad de esferas a probar (135, 185 y 235 g/L), se colocaron en matraces Erlenmeyer de 125 mL con 50 mL de medio de fermentación de composición similar a la de un hidrolizado de bagazo de caña (xilosa 30 g/L, glucosa 2.68 g/L, arabinosa 3.4 g/L, ácido acético 5.0 g/L, furfural <0.05 g/L) y enriquecido con extracto de levadura 1.0 g/L, urea 3.0 g/L, KH_2PO_4 5.0 g/L, pH 5.5) (Sánchez, 2009). La fermentación se llevó a cabo a 30 °C durante 72 h a 250 rpm, tomando muestra cada 8 h para la determinación de xilosa, xilitol y ácido acético.

Fermentación con células libres: El inóculo para la fermentación con células libres fue cultivado en medio de activación transfiriendo tres asadas de la cepa IEC5-ITV, a un matraz Erlenmeyer de 125 mL con 50 mL de medio de activación cultivando 24 h a 30°C a 250 rpm. Cumplido el tiempo de incubación, se inocularon 6×10^6 células viables/mL a un matraz de 500 mL que contenía 300 mL de medio de fermentación enriquecido, la fermentación se realizó a 250 rpm a 30°C por 72 h tomando muestra cada 8 h para la determinación de xilosa y xilitol (Gastélum, 2007).

Métodos analíticos: La concentración de células libres viables se determinó por conteo directo empleando una cámara de Thoma., mientras que la de células viables atrapadas en cada esfera, se realizó disolviendo dos esferas de alginato de calcio por concentración probada con 100 μL de citrato de sodio 0.05 M (Phisalaphong y otros, 2007) y contando células viables en placa de acuerdo a la NOM-111-SSA1-1994. La estabilidad química de las esferas de alginato de calcio fue estimada monitoreando su solubilización durante las fermentaciones (Carvalho y otros, 2002).

Se tomaron micrografías tanto del interior como del exterior de las esferas de alginato de calcio usando un microscopio electrónico de barrido marca JEOL, Modelo JSM-5600 en el Instituto de Ecología A.C. de la ciudad de Xalapa, Veracruz. La determinación de xilosa, xilitol y ácido acético se realizó en un cromatógrafo cuarter S, automuestreador 717 PLUS, Controlador 600 con detector de índice de

refracción 2414 y adaptado a una columna Shodex 1011, usando una fase móvil de H_2SO_4 0.1 N y velocidad de flujo de 0.6 mL/min a 55 °C.

Análisis estadístico: Se empleó un diseño factorial 3^2 para identificar los niveles de las variables de inmovilización, tiempo de curado y la concentración de esferas de alginato de calcio (tabla 1). Los efectos de estas variables en la bioconversión de xilosa a xilitol fueron analizados utilizando una ANOVA usando el programa Minitab (versión 15).

Tabla 1. Tiempo de curado y cantidad de esferas para una fermentación en lote de acuerdo al diseño factorial 3^2

Variable	Símbolo	Nivel		
		-	0	+
Tiempo de curado (h)	TC	12	24	36
Concentración de esferas (g/L)	CE	135	185	235

Fuente: elaboración propia.
(-) bajo, (+) alto, (0) medio.

Resultados y discusión

Producción de xilitol y parámetros fermentativos: Como puede observarse en la tabla 2, la productividad volumétrica de xilitol (Q_p) y el rendimiento ($Y_{p/s}$) variaron de 0.130 a 0.206 (g/L.h) y de 0.234 a 0.409 g/g respectivamente, mientras que la concentración final de xilitol varió de 5.61 a 10.6 g/L. El análisis de varianza reveló que el tiempo de curado no tiene efecto significativo ($p= 0.388 - 0.618$) sobre la producción (P_F), la productividad volumétrica (Q_p), el rendimiento ($Y_{p/s}$) y la eficiencia de bioconversión (η) pero sí lo tiene la concentración de esferas de alginato de calcio utilizadas en la fermentación ($p < 0.05$ en todos los casos).

Carvalho y otros (2002) inmovilizando células de *Candida guilliermondii* FTI 20037 en alginato de calcio también encontraron que el tiempo de curado no tiene influencia en la productividad volumétrica ni en el rendimiento pero sí en la estabilidad de las esferas de alginato de calcio, en este trabajo también se observó que las esferas con tiempos de curado de 24 y 36 h no mostraron solubilidad o agrietamiento

de las esferas como cuando se utilizan 12 h. Los valores más altos para todos los parámetros de fermentación se alcanzaron con 235 g/L de esferas y 36 h de curado.

Tabla 2. Parámetros fermentativos empleando células inmovilizadas de levadura IEC5-ITV en un medio sintético a 48 h de fermentación de acuerdo al diseño factorial 3²

Ensayo	Código de variable		Respuesta			
	TC	CE	PF (g/L)	QP (g/L.h)	YP/S (g/g)	η(%)
1	-	-	6.25	0.130	0.234	25.59
2	-	0	6.82	0.142	0.258	28.21
3	-	+	9.01	0.187	0.371	40.36
4	0	-	5.61	0.116	0.208	22.76
5	0	0	6.91	0.144	0.266	29.09
6	0	+	9.43	0.196	0.381	41.59
7	+	-	7.09	0.147	0.265	28.93
8	+	0	8.90	0.185	0.321	35.01
9	+	+	10.06	0.206	0.409	44.65

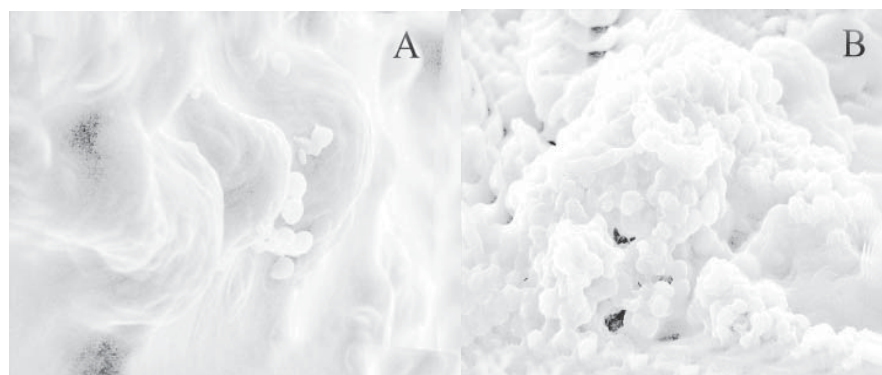
Fuente: elaboración propia.

P_F=Concentración final de xilitol; Q_p=Productividad volumétrica de xilitol (g/L.h); Y_{p/S}=rendimiento (g xilitol producido/ g xilosa consumida); η = eficiencia de bioconversión [Y/Y teórico =0.917]

Conteo de células viables libres y en las esferas de alginato de calcio: La concentración de células inmovilizadas incrementó aproximadamente un 84% después de 48 h y quedó casi constante. La concentración de células libres suspendidas en el medio varió de 5.5 X 10⁶ células/mL a 1.0 X 10⁷ células/mL. Este mismo comportamiento lo observaron Cunha y otros (2007) utilizando células de *C. guilliermondii* inmovilizadas en hidrogel de alcohol polivinílico (PVA) e hidrolizado de bagazo de caña, sugiriendo que después de 48 h de fermentación, los poros de la matriz del gel se saturan por las células inmovilizadas y que una porción de estas células son liberadas de las perlas y proliferan en el medio alcanzando concentraciones elevadas. Las imágenes por microscopio electrónico de barrido, muestran que desde el inicio de la fermentación algunas células de la levadura IEC5-ITV están adheridas a la superficie (figura 1A), después de 24 horas de fermentación se observa como las células atrapadas en la matriz se han multiplicado abundantemente (figura 1B). Estas observaciones indican que en este trabajo el xilitol producido proviene tanto

de células inmovilizadas como libres, lo cual se ha encontrado también en otros procesos de producción de xilitol usando sistemas de células inmovilizadas (Carvalho y otros, 2002; Silva y otros, 2007; Cunha y otros, 2009).

Figura 1. Células de la levadura *Candida tropicalis* IEC5-ITV adheridas a la superficie de las esferas de alginato de calcio al inicio de la fermentación (A) y en el interior después de 24 h de fermentación (B)



Fuente: elaboración propia.

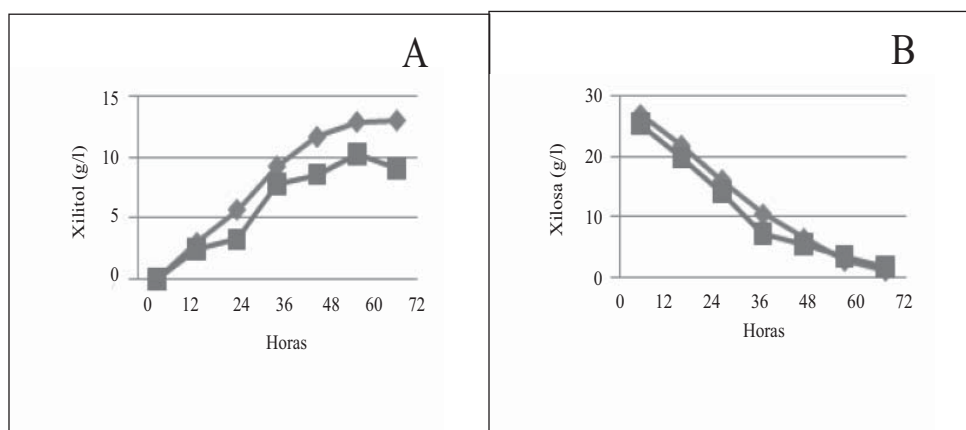
Fuente: elaboración propia.

Consumo de ácido acético: Este ácido es generado al hidrolizar el bagazo de caña de azúcar, algunos autores lo consideran como un compuesto tóxico a las levaduras productoras de xilitol (Martínez y otros, 2002; Rodrigues y otros, 2001); sin embargo, en este trabajo lo que se observó es que no sólo no resulta tóxico sino que incluso la levadura IEC5-ITV lo utiliza, lo cual está reportado en trabajos anteriores con esta levadura tanto en estado libre con hidrolizado de bagazo de caña (Gastélum, 2007) como inmovilizada (Sánchez, 2009), utilizando un medio sintético. Su consumo varió de 37% con un tiempo de curado de 12 h y 135 g/L de esferas de alginato de calcio a 77% cuando se usa un tiempo de curado de 12 h y 235 g/L de esferas en la fermentación.

Carvalho y otros (2002) encontraron también este consumo de ácido acético utilizando hidrolizado de bagazo de caña y células inmovilizadas en alginato de calcio de *C. guilliermondii*. Al monitorear la variación del pH en el medio de fermentación se encontró que aumentó de 5.5 inicial a 6.0 después de 8 h de fermentación, a pH de 7.0 a las 24 h y finalmente a un pH de 8.0 a las 56 h para mantenerse con este valor hasta el final de la fermentación a las 72 h; la producción de xilitol y el consumo de xilosa no se vieron afectados.

Observaciones similares son reportadas por Cunha y otros (2009) quienes, al igual que en este trabajo, no controlaron el pH durante la fermentación. Es indudable que la fermentación de hidrolizados de bagazo de caña es grandemente favorecida por el consumo de este ácido ya que invariablemente estará presente en ellos cuando se utilicen para la producción de xilitol.

Figura 2. Producción de xilitol (A) y consumo de xilosa (B) durante 72 horas de fermentación en lote utilizando células libres (◆) así como inmovilizadas de la levadura IEC5-ITV (■) con 36 h de tiempo de curado y 235 g/L de concentración de esferas de alginato de calcio, en un medio sintético con 30 g/L de xilosa



Fuente: elaboración propia.

Fuente: elaboración propia.

Producción de xilitol y consumo de xilosa por células de la levadura IEC5-ITV libres e inmovilizadas

Como se observa en la figura 2A, la producción de xilitol obtenida a las 72 horas es mayor cuando se emplea el microorganismo en estado libre (13.0 g/L), 29.9% más con respecto a la inmovilizada (9.11 g/L).

Al comparar el consumo de xilosa tanto por la levadura libre como inmovilizada (figura 2B) se observa que en ambos casos es casi completamente consumida (95.4 y 93.3% respectivamente), sugiriendo que la producción de xilitol en las células

inmovilizadas es menor, debido probablemente a la barrera que constituye el gel de alginato de calcio que limita el transporte tanto de sustratos como de productos.

Los valores de productividad y rendimiento al final de la fermentación (tabla 3), para la levadura *Candida tropicalis* IEC5-ITV libre e inmovilizada con 36 horas de curado y 235 g/L de esferas de alginato, son comparables con los reportados para fermentaciones en hidrolizados hemicelulósicos con células de *Candida guilliermondii* adsorbidas en esferas de vidrio poroso o zeolita o atrapadas en hidrogel de PVA, tanto a nivel matraz como en reactores de lecho fluidizado (Santos y otros, 2005; Cunha y otros, 2009), pero bajos cuando se comparan los valores obtenidos por Sarrouh y otros (2007), 0.40 g/L.h y 0.58 g/g respectivamente, utilizando células de *C. guilliermondii* inmovilizada en alginato de calcio e hidrolizado de bagazo de caña y un reactor de lecho fluidizado de tres fases.

Tabla 3. Parámetros fermentativos obtenidos con células libres e inmovilizadas de la levadura IEC5-ITV en un medio sintético

<i>Levadura IEC5-ITV</i>	<i>QP (g/Lh)</i>	<i>YP/S (g/g)</i>	<i>η(%)</i>
Libre	0.18	0.49	53.08
Inmovilizada	0.20	0.40	44.65

Fuente: elaboración propia.

Q= productividad volumétrica (g/L.h); Y= rendimiento (g xilitol/xilosa consumida);
 η = eficiencia de bioconversión [Y/Y teórico (0.91)]

Conclusión

Los resultados presentados en este trabajo demostraron que en la bioconversión de xilosa a xilitol por la levadura *Candida tropicalis* IEC5-ITV inmovilizada en alginato de calcio, en un medio de fermentación sintético con composición similar al de un hidrolizado de bagazo de caña, no influye el tiempo de curado pero sí de manera significativa la concentración de esferas de alginato de calcio usadas en la fermentación. En términos de productividad volumétrica, rendimiento y eficiencia de bioconversión un tiempo de curado de 36 horas y 235 g/L de esferas de alginato de calcio son las condiciones más convenientes para la producción de xilitol en las condiciones aquí probadas.

Este trabajo forma parte del proyecto denominado: Tecnologías para un desarrollo sostenible en la producción de xilitol y energía a partir del bagazo de caña de azúcar. Clave N° 31346. Fondo mixto Conacyt-Gobierno del Estado

Referencias

- Carvalho W.; S.S. Silva; A. Converti; M. Vitolo; M.G.A. Felipe; I.C. Roberto; M.B. Silva and I.M. Mancilha (2002), "Use of Immobilized Candida Yeast Cells for Xylitol Production from Sugarcane Bagasse Hydrolysate: Cell Immobilization Conditions", *Appl Biochem Biotechnol*, 98-100, pp. 489-496.
- Carvalho W.; S.S. Silva; J.C. Santos and A. Converti (2003), "Xylitol Production by Ca-alginate Entrapped Cells: Comparison of Different Fermentation Systems", *Enzyme and Microbial Technology*, 32, pp. 553-559.
- Cunha, A.A.M.; A. Converti; J.C. Santos; S.T.S. Ferreira and S.S. Silva (2009), "PVA-Hydrogel Entrapped *Candida guilliermondii* for Xylitol Production from Sucargane Hemicellulose Hydrolysate", *Appl Biochem Biotechnol*, 157, pp. 527-537.
- Gastélum E. (2007), "Producción de xilitol por la levadura IEC5-ITV a partir de hidrolizado de bagazo de caña en cultivo por lote alimentado", *Tesis de Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica*, México, Instituto Tecnológico de Veracruz.
- González M.; P. Gross y V. Ramos (2003), "Producción de etanol y proteínas por una cepa de *Saccharomices cerevisiae* inmovilizada en alginato de calcio", *Tecnol Quim.*, 1, pp. 44-53.
- Granström T.B.; K. Izumori; M. Leisola (2007), "A Rare Sugar Xylitol. Part II: Biotechnological Production and Future Applications of Xylitol", *Appl Microbiol Biotechnol.*, 74, pp. 273-6.
- Martínez E.A.; M.L.M. Villarreal; J.B. Almeida e Silva; A.I.N. Solenzal; L. Canilha y S.I. Mussatto (2002), "Uso de diferentes materias primas para la producción biotecnológica de xilitol", *Cienc. Tecnol. Aliment.*, 3, pp. 295-301.
- Mussatto S.I. e I.C. Roberto (2002), "Xilitol: edulcorante con beneficios para la salud humana", *Rev. Brasileña de Ciencia Farmacéuticas (RBCF)*, 38, pp. 401-413.
- Ogbonna J.C.; Y. Amano and K. Nakamura (1989), "Elucidation of Optimum Conditions for Immobilization of Viable Cells by Using Calcium Alginate", *J Ferment Bioeng.*, 67(2), pp. 92-96.
- Phisalaphong M.; R. Budiraharjo; P. Bangrak; J. Mongkolkajit and S. Limtong (2007), "Alginate-Loofa as Carrier Matrix for Ethanol Production", *J Biosci Bioeng*, 104, pp. 214-7.
- Prakasham R.S., S.R. Rao and P.J. Hobbs (2009), "Current Trends in Biotechnological Production of Xylitol and Future Prospects", *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 3, pp. 8-36.
- Rodrigues R.C.L.B.; M.G.A. Felipe; J.B. Almeida e Silva; M. Vitolo and P.V. Gómez (2001), "The Influence of pH, Temperatura and Hydrolysate Concentration on

- the Removal of Volatile and Nonvolatile Compounds from Sugarcane Bagasse Hemicellulosic Hydrolysate Treated with Activated Charcoal Before or After Vacuum Evaporation”, *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 18, pp. 299-311.
- Sánchez M.M.A. (2009), “Estudio preliminar de la inmovilización de una cepa de levadura productora de xilitol”, *Tesis de licenciatura*, Veracruz, Facultad de Química Farmacéutica Biológica.
- Santos J.C.; S.S. Silva; S.I. Mussato; W. Carvalho and M.A.A. Cunha (2005), “Immobilized Cells Cultivated in Semi-Continuous Mode in a Fluidized Bed Reactor for Xylitol Production from Sugarcane Bagasse”, *World J Microbiol Biotechnol.*, 21, pp. 531-535.
- Santos D.T.; B.F. Sarrouh; J.D. Rivaldi; A. Converti and S.S. Silva (2007), “Use of Sugarcane Bagasse as Biomaterial for Cell Immobilization for Xylitol Production”, *Journal of Food Engineering*, 86, pp. 542-548.
- Sarrouh B.F.; S.D. Tresinari and S.S. Silva (2007), “Biotechnological Production of Xylitol in a Three-Phase Fluidized Bed Bioreactor with Immobilized Yeast Cells in Ca-Alginate Beads”, *Biotechnol. J.*, 2, pp. 1-5.
- Silva S.S.; S.I. Mussato; J.C. Santos; D.T. Santos and J. Polizel (2007), “Cell Immobilization and Xylitol Production Using Sugarcane Bagasse as Raw Material”, *Appl Biochem Biotechnol.*, 141, pp. 215-227.

Bioproductos de la fermentación láctica de los residuos del camarón

Bioproducts from the lactic fermentation of shrimp waste

*J. López Cervantes,¹ D.I. Sánchez Machado,¹ N.P. Adan Bante,¹
C. Bueno Solano,¹ O.N. Campas Baypoli¹*

Resumen

El objetivo de este estudio fue optimizar la fermentación láctica de los residuos de camarón para facilitar la separación de productos tales como quitina, hidrolizados proteicos y pasta lipídica pigmentada. Para la caracterización bioquímica de los productos del fermentado se evaluó el perfil de aminoácidos y ácidos grasos, así como también cenizas, proteínas y lípidos totales. El pH y la acidez total titulable fueron monitoreados durante la fermentación. La quitina cruda fue desproteinizada y desmineralizada obteniéndose quitina pura. El perfil de aminoácidos y glucosamina en quitina fueron determinados simultáneamente por HPLC. La astaxantina y los ácidos grasos fueron determinados en la pasta lipídica. Los rendimientos obtenidos fueron 10% en quitina cruda y 59% del hidrolizado proteico. Los aminoácidos presentes en los productos del fermentado se encontraron en el rango de 140 a 394 mg/g. El grado de pureza de la quitina cruda y purificada, expresados en base al contenido de glucosamina, fue de 59 y 92%, respectivamente. El contenido de proteína en el hidrolizado fue 42%, mientras que el contenido de proteína y cenizas en quitina cruda fueron 18 y 4%, respectivamente. En la pasta lipídica el contenido de lípidos y astaxantina fueron 42% y 1.35 mg/g, respectivamente. Este estudio ha

¹ Cuerpo Académico de Biotecnología y Productos Naturales del Departamento de Biotecnología y Ciencias Alimentarias, Instituto Tecnológico de Sonora, 5 de febrero, núm. 818, Sur, c.p. 85000, Ciudad Obregón, Sonora, México, correo electrónico: jlopezc@itson.mx

permitido identificar el potencial de la fermentación láctica para obtener productos de alto valor agregado a partir de los residuos generados por las plantas procesadoras de camarón.

Abstract

The aim of this investigation was to optimize the lactic fermentation of shrimp waste to facilitate the separation of bioproducts, such as chitin, hydrolyzed protein and a paste rich in lipid pigment. For the biochemical characterization of bioproducts was evaluated the profile of amino acids and fatty acids, the content of ash, protein and total lipids were evaluated. The pH and total titratable acidity were monitored during all fermentation process. The profile of amino acid and glucosamine in chitin were determined simultaneously by HPLC. Both, astaxanthin and fatty acids were determined in lipid paste. The yields obtained were 10% of crude chitin and 59% of protein hydrolyzate. The amino acid content in the hydrolyzed is in the range of 140 to 394 mg/g. The degree of purity of crude and purified chitin (based on the content of glucosamine) was 59 and 91 %, respectively. The protein content in the hydrolyzate was 42%, while protein and ash content in crude chitin was 18% and 4%, respectively. In the paste, the content of lipid and astaxanthin was 42% and 1.35 mg/g, respectively. This research has indentified the potential of lactic fermentation to produce high value products from remnants generated in the industry of shrimp processing.

Introducción

El camarón en México se constituye como el producto principal al captar 44% del valor de la producción pesquera nacional. Sin embargo, es generador de residuos sólidos constituidos por cabeza y caparazón, correspondientes al 45% del peso del animal (Armenta López y otros, 2002). Los residuos de camarón son ricos en productos de alto valor agregado como quitina, proteína, lípidos, pigmentos carotenoides y minerales (Agullo y otros, 2003).

Se han propuestos métodos químicos empleando ácidos y álcalis para la extracción de quitina y recuperación de hidrolizados proteicos, pero esto puede ocasionar depolimerización y desacetilación parcial de la quitina; además, los tratamientos químicos son generadores de problemas ecológicos y sus desechos requieren de una neutralización para su eliminación (Synowiecki y Al-Khateeb, 2003). También, se han desarrollado métodos enzimáticos para la extracción de quitina, proteínas y pigmentos. En diferentes investigaciones se ha reportado el uso de enzimas microbianas

comerciales tales como alcalasa y neutrasa para la extracción de proteínas de los residuos de camarón (Synowiecki y Al-Khateeb, 2000). Duarte y Netto (2006) reportaron el uso de alcalasa y pancreasa para la extracción de quitina, hidrolizado proteico y pigmentos lipídicos. Armenta López y otros (2002) estudiaron la recuperación de astaxantina combinando la fermentación ácido láctica y una hidrólisis enzimática con la finalidad de estabilizar los residuos de camarón especialmente la estructura de la astaxantina. La fermentación ácido láctica de los residuos de camarón ha sido reportado como una alternativa para el tratamiento de estos desechos por ser un método amigable al medio ambiente y económico, facilitando la separación de quitina, proteínas, lípidos y minerales (Shirai y otros, 2001).

El objetivo de este estudio fue optimizar la fermentación láctica de los residuos de camarón para facilitar la separación de productos tales como quitina, hidrolizados proteicos y pasta lipídica pigmentada.

Metodología

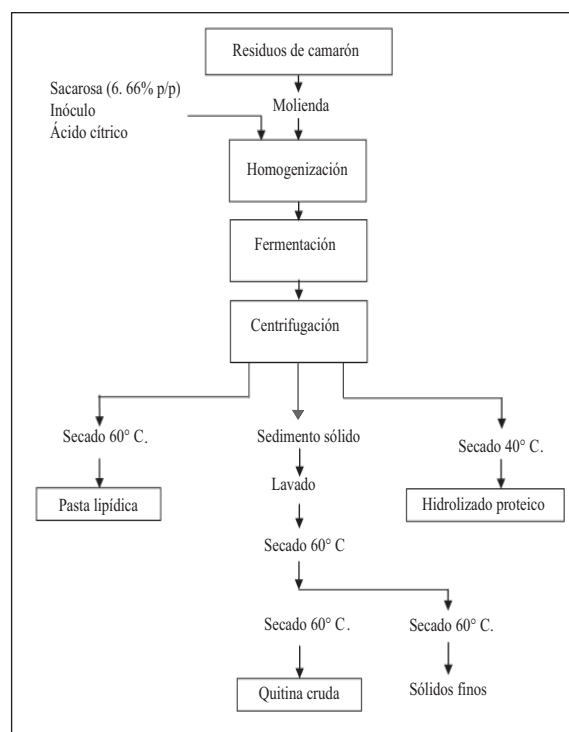
Condiciones de fermentación de los residuos de camarón: El desarrollo del método fue propuesto por López Cervantes y otros (2006a). El probiótico comercial fue activado a una concentración del 5% en una solución de sacarosa y se incubó a 37°C (Fisher Scientific, Modelo 500). Los residuos de cabeza de camarón molidos y descongelados (1.5 kg) se colocaron en frascos de polietileno con capacidad de 2 kg, se les adicionó 6.6% de sacarosa comercial (p/p) y el probiótico previamente activado 50% (v/p). A la mezcla se ajustó el pH por debajo de 6.5 con ácido cítrico 2M durante las primeras tres horas. Las muestras fueron incubadas con agitación a 80 rpm, 36°C durante 24 horas (Lab-Line Instruments INC., Melrose Park, Illinois). El pH y el porcentaje de acidez total titulable (%ATT) fueron monitoreados por 24 horas, hasta obtener un pH por debajo de 4.5 y una acidez titulable de 3.5 por ciento. El ensilado fue centrifugado (6°C) a 1250 rpm por 15 minutos (Harrier 18/80, Sanyo, UK), obteniéndose una fracción quitinosa (sedimento), un líquido hidrolizado rico en proteínas y una fracción lipídica (sobrenadante). Los productos obtenidos fueron almacenados en frascos de vidrio para su posterior uso (figura 1).

Purificación de quitina cruda: La quitina cruda fue despigmentada con una mezcla de ácidos orgánicos consistente en éter de petróleo-acetona-agua; posteriormente, desproteinizada con una enzimas comercial (0.15% p/p, Takabate 380); desmineralizada con ácido clorhídrico 1N; finalmente, blanqueada con una solución de hipoclorito de sodio de acuerdo al método de López Cervantes y otros, 2007.

Perfil de aminoácidos y glucosamina: El perfil de aminoácidos en las cuatro fracciones, y el contenido de glucosamina en quitina fueron determinados por HPLC con

el método de López Cervantes y otros (2006a). Se utilizó un sistema HPLC (GBC, Dandenong, Australia) equipado con autoinyector LC1650, desgasificador de solventes LC1460, bomba cuaternaria LC1150, detector de fluorescencia LC1255S y sistema WinChrom de análisis de datos cromatográficos. Las condiciones HPLC empleadas fueron las siguientes: fase móvil A: fosfato de amonio 30 mM (pH 6.5) en 15:85 (v/v) de metanol-agua; fase móvil B: 15:85 (v/v) de metanol-agua; fase móvil C: 90:10 (v/v) acetonitrilo-agua. La velocidad de flujo fue 1.1 ml/min y la columna se mantuvo a 38°C. La detección por fluorescencia fue a 270 y 316 nm para excitación y emisión, respectivamente. El tiempo total de la corrida fue de 50 minutos.

Figura 1. Condiciones óptimas de fermentación láctica y separación de los productos



Fuente: elaboración propia.

Cuantificación de astaxantina: En la pasta lipídica se cuantificó astaxantina mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) de acuerdo al método de

López Cervantes y otros (2006b). Las condiciones cromatográficas para la separación de astaxantina fueron: columna C18 (25cm x 4.6 mm), fase móvil (agua:metanol:diclorometano: acetonitrilo 4.5:28:22:45.5 v/v/v/v), velocidad 1.0 ml/min a 25°C y una longitud de onda de 476 nm.

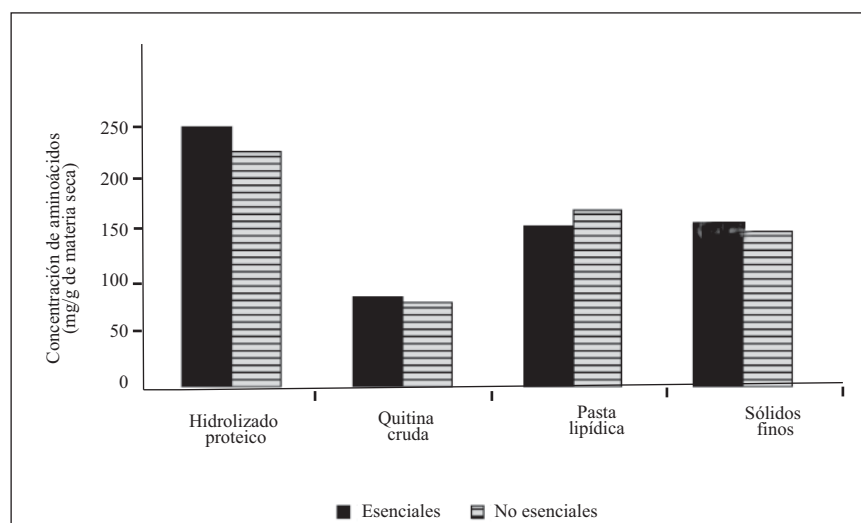
Análisis generales

Los valores de pH fueron medidos usando un potenciómetro Corning modelo 340 (Corning, NY, USA) y el % de acidez total titulable (% ATT) fue expresado como % ácido láctico, tal como lo reportó Armenta y otros (2002). Proteínas por Kjeldahl (contenido de nitrógeno multiplicado por 6.25), humedad, y cenizas por el método AOAC (1995). Para determinar el contenido de lípidos totales las muestras fueron extraídas con una mezcla de cloroformo-metanol (2:1, v/v) por el método Sánchez Machado y otros (2004).

Resultados y discusión

El efecto de las condiciones óptimas de la fermentación de los residuos de cabeza de camarón está reflejado en los valores del pH y %ATT. Inicialmente los residuos de cabeza de camarón presentaron un pH 7.31 ± 0.10 y un %ATT 0.54 ± 0.13 , por ello, fue necesario acidificar las muestras por abajo de 6.5. Se presentó un incremento de pH a 7.11 ± 0.23 y %ATT 0.53 ± 0.09 alrededor de la segunda hora ajustando nuevamente las condiciones de pH, seguido de una reducción significativa del pH como resultado de la producción de ácido láctico por las bacterias presentes en el probiótico, y al mismo tiempo se incrementaron los valores del %ATT durante la fermentación. Con lo anterior se logró el desarrollo óptimo de las bacterias presentes en el probiótico e inhibir el crecimiento de otros. La rápida disminución de pH fue un indicador de la eficiencia del proceso, debido a la presencia bacteriana que convierte la fuente de carbono en ácido láctico (Shirai y otros, 2001; Beaney y otros, 2005). Los resultados de pH y %ATT a las 24 h son similares a los reportados por Shirai y otros (2001). El fermentado obtenido de los residuos de camarón a las 24 h fue centrifugado para facilitar la mayor recuperación de los productos por diferencia de densidad (López Cervantes y otros, 2006a), el rendimiento de cada uno, reportado en base húmeda, fue 59% de hidrolizado proteico, 27% de pasta lipídica, 10% de quitina y 4% de sólidos finos, resultando como la fracción más abundante el hidrolizado proteico.

Figura 2. Perfil de aminoácidos contenidos en los productos fermentados



Fuente: elaboración propia.

Determinación del perfil de aminoácidos

Los aminoácidos presentes en los productos finales del fermentado se presentaron en un rango de 140 a 394 mg/g de materia seca (figura 2). Los aminoácidos totales en el hidrolizado proteico fueron de 394 mg/g de materia seca y en esta fracción los aminoácidos esenciales representaron el 52.53% del total. Los aminoácidos totales en quitina cruda, pasta lipídica y sólidos finos fueron de 140, 268 y 255 mg/g de materia seca, respectivamente. El contenido total de aminoácidos mostró que el hidrolizado proteico contiene la mayor cantidad de aminoácidos y estos resultados son similares a los reportados en hidrolizados proteicos de residuos de camarón producidos con proteasas comerciales (Gilberg y Stenberg, 2001). La presencia de aminoácidos esenciales en los hidrolizados proteicos indica un alto valor nutricional y pueden ser usados como suplementos para consumo animal y para la industria acuícola (Cremades y otros, 2001). Otra característica importante del hidrolizado proteico es la presencia de alanina, arginina, glicina, ácido glutámico, prolina y particularmente metionina, que influyen en sabor y olor (López Cervantes y otros, 2006a). La presencia de aminoácidos en quitina cruda, pasta lipídica y sólidos finos puede deberse al proceso fermentativo en el que ocurrieron simultáneamente dos efectos una des-

proteínización y desmineralización rompiendo el complejo quitina-proteína (Chang y Tsai, 1997), produciéndose quitina parcialmente purificada y la liberación de astaxantina, ácidos grasos y minerales (Guillou y otros, 1995).

Cuantificación de glucosamina

La figura 3 muestra un cromatograma por HPLC de quitina cruda indicando la presencia de aminoácidos y una región sombreada correspondiente a la señal de la glucosamina. El contenido de glucosamina en quitina cruda se presentó en un rango de 516 y 640 mg/g de materia seca. El valor promedio de glucosamina determinada en el presente estudio fue de 591 mg/g de materia seca, lo que corresponde a 59.1% de pureza. El contenido de glucosamina representa la calidad de la quitina, por ello la quitina cruda obtenida requiere de un proceso extra de purificación. En la quitina purificada el contenido de glucosamina esta en el rango de 980.7 a 996.8 mg/g de materia seca (95.24% de pureza), estos valores son similares a los reportados por Zhu y otros (2005) obtenidos a partir de los residuos de cangrejo.

Determinación de astaxantina

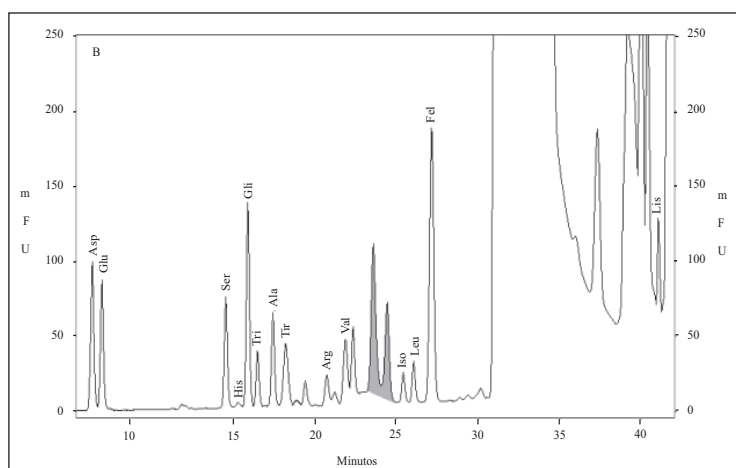
El contenido de astaxantina se determinó en la pasta lipídica, encontrándose que los rangos fueron de 1.91 a 3.16 mg/g de materia seca, mientras que el valor promedio global fue de 2.65 ± 0.40 mg/g de materia seca. En relación a esto, se ha reportado 4.2 mg/g de materia seca en residuos de camarón mediante extracción con fluidos supercríticos (Lin y otros, 2005). La variabilidad entre los resultados puede atribuirse a la especie de camarón y las condiciones de fermentación láctica en los residuos de camarón.

Determinación del perfil de ácidos grasos

El análisis de ácidos grasos en la pasta lipídica, provenientes del fermentado de los residuos de camarón, indicaron que la mayor abundancia correspondió a los insaturados (64.15%), poliinsaturados (37.84%), saturados (35.86%) y monoinsaturados (26.31%). Estos resultados son similares a los reportados por Guillou y otros (1995) con rangos de 57.6, 35.43, 38.01 y 26.51% en insaturados, poliinsaturados, saturado y monoinsaturados, respectivamente, procedentes del cefalotórax de camarón. Las diferencias de los resultados pueden ser atribuidos a la variación estacional, especie, estado fisiológico, dietas así

como también la maduración sexual del camarón. Los ácidos grasos poliinsaturados tales como el ácido docohexaenoico (22:6n-3) y el ácido eicopentaenoico (20:5n3) los cuales han sido reportados como un alimento funcional importante, además de prevenir la actividad cancerígena, reducen las enfermedades cardiovasculares e inhiben los procesos inflamatorios.

Figura 3. Cromatograma por HPLC de muestras de quitina cruda



Fuente: elaboración propia.

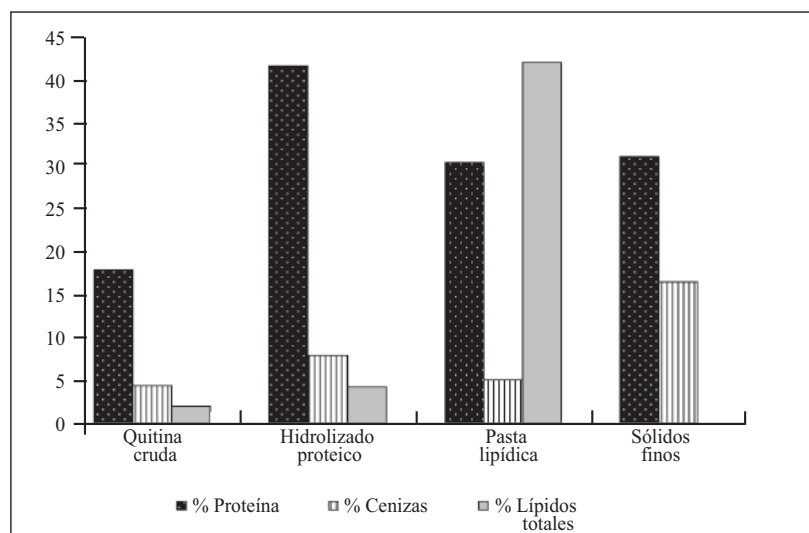
Composición proximal de las fracciones fermentadas

La figura 4 muestra los resultados de la composición química de cada producto aislado del fermentado. La quitina cruda recuperada del residuo de camarón fermentado presentó cerca del 18.1% de proteína residual, mientras que el contenido de cenizas fue de 4.3%, ambos resultados muestran la eficiencia de la fermentación en la desproteínización y desmineralización del exosqueleto del camarón y son similares a los reportados por Cremades y otros (2001) para residuos de langosta y de cangrejo.

Por otro lado, el contenido de lípidos totales en el residuo quitinoso (2.0%) fue más alto que los reportados por Cremades y otros (2001) en quitina proveniente de los residuos de cangrejos. El hidrolizado proteico obtenido de la fermentación láctica indica una fracción rica en proteínas (42.3%), estos resultados están en rango de los reportados por Gildberg y Stenberg (2001) para hidrolizado proteico de residuos

camarón. Synowiecki y Al-Khateeb (2000), reportaron 64.3% de proteínas en hidrolizados enzimáticos de los residuos de camarón. La diferencia de los resultados puede atribuirse a la diferencia de especies y la naturaleza del complejo quitina-proteína existente en el residuo de crustáceos (Chang y Tsai, 1997). El contenido de lípidos totales fue 42.6% en la pasta lipídica, estos resultados son similares a los reportados por Beaney y otros, 2005. Los lípidos totales han sido reportados como una fuente para la extracción de astaxantina, ácidos grasos, retinol (vitamina A) y α -tocoferol (vitamina E) a partir de los residuos de camarón y cangrejo (Beaney y otros, 2005).

Figura 4. Composición química de los productos aislados del fermentado



Fuente: elaboración propia.

Conclusiones

Los resultados de esta investigación sugieren que la fermentación láctica facilita la separación y purificación de los principales componentes de los residuos de camarón, tales como hidrolizados proteicos ricos en aminoácidos, quitina cruda parcialmente desproteïnizada y desmineralizada, y una pasta lipídica rica en ácidos grasos conteniendo astaxantina. La fermentación es un método simple, económico, amigable al medio ambiente, además de producir productos naturales de alta calidad.

Agradecimientos

Esta investigación fue financiada bajo el proyecto No. SON-2004-C03-016 con fondos mixtos del Gobierno del Estado de Sonora y la contribución de Conacyt-Fomix.

Referencias

- Agullo, E.; M.S. Rodríguez; V. Ramos and L. Albertengo (2000), "Present and Future Role of Chitin and Chitosan in Food", *Macromol. Biosci.*, 3(10), pp. 521-530.
- AOAC (1995), "Official Methods of Analysis", *Association of Official Analytical Chemists*.
- Armenta López, R.; L. Guerrero and S. Huerta S. (2002), "Astaxanthin Extraction from Shrimp Waste by Lactic Fermentation and Enzymatic Hydrolysis of the Carotenoprotein Complex", *J. Food Science* 67, pp. 1002-1006.
- Beaney, P.; J. Lizardi Mendoza and M. Healy (2005), "Comparison of Chitins Produced by Chemical and Bioprocessing Methods", *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 80, pp. 45-150.
- Chang, K. and G. Tsai (1997), "Response Surface Optimization and Kinetics of Isolation Chitin from Pink Shrimp (*Solenocera melantho*) Shell Waste", *J. Agric. Food Chem.* 45, pp. 1900-1904.
- Cremades, O.; E. Ponce; R. Corpas; J. Gutiérrez; M. Jover; M. Alvarez Ossorio; J. Parrada and J. Bautista (2001), "Processing of Crawfish (*Procambarus clarkii*) for the Preparation of Carotenoproteins and Chitin", *J. Agric. Food Chem.* 49, pp. 5468-5472.
- Duarte de Holanda, H. and F. Netto (2006), "Recovery of Components from Shrimp (*Xiphopenaeus Kroyeri*) Processing Waste by Enzymatic Hydrolysis", *J. Food Science* 71, pp. C298-C303.
- Gildberg, A. and E. Stenberg (2001), "A New Process for Advanced Utilization of Shrimp Waste", *Process Biochem.* 36, pp. 809-812.
- Guillou, A.; M. Khalil and L. Adam
- bounou (1995), "Effects of Silage Preservation on Astaxanthin Forms and Fatty Acid Profiles of Processed Shrimp (*Pandalus borealis*) Waste", *Aquaculture* 130, pp. 351-360.
- Lin, M. and B. Chen (2005), "Determination of Carotenoids in Spear Shrimp Shell (*Parapenaeopsis hardwickii*) by Liquid Chromatography", *J. Agric. Food. Chem.*, 53, pp. 5144-5149.
- López Cervantes, J.; D. Sánchez Machado and J. Rosas Rodríguez (2006a), "Analysis of Free Amino Acids in Fermented Shrimp Waste by High-Performance Liquid Chromatography", *J. Chromatography A*, 1105, pp. 106-110.

- López Cervantes, J.; D. Sánchez Machado; M. Gutiérrez Coronado and N. Ríos Vázquez (2006b), "Quantification of Astaxanthin in Shrimp Waste Hydrolysate", *Biomedical Chromatography*, 20, pp. 981-984.
- López Cervantes, J.; D. Sánchez Machado and K. Delgado Rosas (2007), "Quantitation of Glucosamine from Shrimp Waste Using HPLC", *J. Chromatography Science*, 45(4), pp. 95-99.
- Sánchez Machado, D.; J. López Cervantes and P. Paseiro Losada (2004), "Fatty Acids, Total Lipid, Protein and Ash Contents of Processed Edible Seaweeds", *Food Chem.*, 85, pp. 439-444.
- Shirai, K.; L. Guerrero; S. Huerta; G. Saucedo; A. Castillo; R. González and G. Hall (2001), "Effect of Initial Glucose Concentration and Inoculation Level of Lactic Acid Bacteria in Shrimp Waste Ensilation", *Enzyme and Microbial Technol.*, 28, pp. 446-452.
- Synowiecki, J. and Al-Khateeb (2000), "The Recovery of Protein Hydrolysate During Enzymatic Isolation of Chitin from Shrimp Crangon Crangon Processing Discards", *Food Chem.*, 68, pp. 147-152.
- Synowiecki, J. and N. Al-Khateeb (2003), "Production, Properties, and Some New Applications of Chitin and Its Derivatives", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43(2), pp. 45-171.
- Zhu X.; J. Cai; J. Yang and Q. Su (2005), "Determination of Glucosamine in Impure Chitin Samples by High-Performance Liquid Chromatography", *Carbohydr. Res.*, 340, pp. 1732-1738.

Producción de perlas de quitosano por hidrólisis alcalina de la quitina como bio-adsorbentes

Production of chitosan beads by alkaline hydrolysis from chitin as bio-adsorbent

*D. I. Sánchez Machado,¹ J. López Cervantes,¹
J. R. Rodríguez Núñez,*

Resumen

El quitosano es un polímero natural obtenido de la deacetilación alcalina de la quitina utilizado como agente quelante de metales pesados. El objetivo de esta investigación fue obtener quitosano y evaluar la capacidad de adsorción de cobre de las perlas de quitosano durante el tratamiento de aguas sintéticas. El quitosano fue obtenido de la quitina recuperada del fermentado de los residuos de camarón. La conversión a quitosano se llevó a cabo con NaOH al 50% durante 5 h a 80 °C; posteriormente, se preparó una solución de quitosano en CH₃COOH al 1% y esta fue goteada en NaOH al 1N para la formación de las perlas. El quitosano obtenido presentó 78.7% de grado de deacetilación. Para determinar la capacidad de adsorción (qm) se adicionan 12.6 g de perlas (200 mg quitosano base seca) a 250 ml de una solución de cobre (25 mg/l) en agitación por 22 h. Finalmente, se cuantificó el cobre en las perlas por espectrofotometría de absorción atómica. El agua tratada presentó un remanente de cobre de 0.065 mg/l indicando una capacidad de remoción

¹ Departamento de Biotecnología y Ciencias Alimentarias, Instituto Tecnológico de Sonora, P.O. Box 541, Ciudad Obregón, Sonora, México, correo electrónico: dsanchez@itson.mx

del 99.74% a pH 5.8. Los resultados indican que las perlas de quitosano son una alternativa de bajo costo para el tratamiento de aguas con altas concentraciones de cobre.

Abstract

Chitosan is a natural polymer obtained by alkaline deacetylation from chitin, this is used as heavy metal chelating agent. The objective of this research was to obtain chitosan and evaluate the copper adsorption capacity of chitosan beads for synthetic wastewater treatment. Chitosan was prepared from the recovered chitin of fermented shrimp by-products. Chitosan conversion was carried out with a 50% NaOH solution for 5 h at 80°C. Then, chitosan solution was prepared by dissolution in 1% CH₃COOH, and this was dropped into 1 N NaOH solution form chitosan beads. Chitosan presented a 78.7% degree of deacetylation. To evaluate the adsorption capacity (q_m) 12.6 g of chitosan beads (200 mg of dry weight chitosan) were added to 250 mL of copper solution (25 mg/L) under stirring for 22 h. Finally, copper in the chitosan beads was quantified by atomic absorption spectrophotometry. The water treated showed a residual copper concentration of 0.065 mg/L, which represented a removal capacity of 99.74% at pH 5.8. Chitosan beads are a low cost alternative for treating wastewater with high concentrations of copper.

Introducción

La contaminación del agua se refiere a la presencia de sustancias u organismos extraños en un cuerpo de agua en tal cantidad y con tales características que impiden su utilización para un propósito determinado (Arellano, 2002); por lo tanto, los objetivos del tratamiento de aguas residuales son básicamente: proteger los cuerpos de agua evitando la descarga de las aguas residuales contaminadas y obtener un agua de calidad adecuada para su reutilización (Henry y Heinke, 1999).

Entre las principales fuentes de contaminación del agua se encuentran los metales pesados (Cd, Cr, As, Hg, Pb, Zn, Ni) provenientes de la industria minera, papelera, fertilizantes, baterías, pesticidas, etc., representando un serio problema para la salud humana y el medio ambiente (O'Connell y otros, 2008). Según Ngha y otros (2008) y Cardenas (2006), el proceso de adsorción es uno de los tratamientos fisicoquímicos más eficientes para la remoción de metales pesados en soluciones acuosas,

ofreciendo flexibilidad, simplicidad operacional y en algunos casos permite la eliminación de olor y color de los efluentes.

El carbón activado es usualmente utilizado como adsorbente, sin embargo, tiene un alto costo y su eficiencia disminuye después de cada regeneración (Bailey y otros, 1998). Al mismo tiempo, se han implementado diversos agentes químicos como las silicas modificadas, bentonitas modificadas (Volzone y Garrido y otros, 2008) y polímeros de esteres acrílicos (Pan y otros, 2008). Debido a lo anterior, se ha observado una mayor preferencia por el desarrollo de adsorbentes de origen biológico que abaraten el proceso y permitan la reutilización de los mismos (Flores y otros, 2005).

El quitosano poli(2-glucosamina), es un polímero natural de alto peso molecular, insoluble en agua pero soluble en soluciones ácidas, comportándose en este medio como un polielectrolito catiónico. El quitosano se ha obtenido por deacetilación de la quitina mediante la hidrólisis de los grupos acetamida en un medio fuertemente alcalino a altas temperaturas. Generalmente la reacción se realiza en fase heterogénea empleando soluciones concentradas de NaOH o KOH (40-50%) a temperaturas superiores a 100°C y las condiciones específicas de la reacción dependerán de diversos factores, tales como el material de partida, el tratamiento previo y el grado de deacetilación deseado (Peniche, 2006; Percot, y otros, 2003).

Debido a su estructura química el quitosano es un excelente adsorbente, presentando una alta eficiencia de adsorción de metales pesados como, Cu^{+2} , Hg^{+2} , Ni^{+2} y Zn^{+2} a bajas concentraciones (Gaffar y otros, 2004). Esta propiedad se debe al elevado número de grupos amino libres en su estructura, los cuales son muy reactivos permitiendo la quelación de cationes metálicos (Días y otros, 2007). Asimismo, se ha reportado que el quitosano puede ser utilizado en gel (perlas) y en hojuelas pequeñas, siendo las perlas las que presentan mayor eficiencia, debido a su superficie de contacto (Flores y otros, 2005).

El objetivo de la presente investigación fue la obtención de perlas de quitosano para evaluar su capacidad de adsorción de cobre durante el tratamiento de aguas sintéticas. Adicionalmente, se presenta el proceso de obtención del quitosano a partir de quitina extraída de los residuos de la industrialización del camarón, así como la caracterización fisicoquímica del quitosano.

Metodología

Obtención de las perlas de quitosano

Para la obtención de la quitina se siguió la metodología propuesta por Sánchez Machado y otros (2008). Esta metodología implica la fermentación láctica de los

residuos de camarón para facilitar la separación y purificación de la quitina. La conversión de la quitina a quitosano se realizó por el método químico de hidrólisis alcalina. El tratamiento se llevó a cabo con NaOH al 50% durante 4 h a 80°C con agitación cada 30 minutos, y la relación de quitina a NaOH fue de 1:10 masa/volumen. Después, el quitosano se lavó con agua común hasta pH neutro y se trituró en un molino eléctrico (Krups 203). Una vez obtenido el quitosano se procedió a preparar las perlas, para ello se disolvió 1 g de quitosano en 45 ml de ácido acético al 1%, resultando una solución de consistencia viscosa y de coloración café claro. Posteriormente, se tomó la solución con una pipeta Pasteur y se adicionó gota a gota en cajas de vidrio con NaOH al 1 N (formación de perlas uniformes), se dejaron reposar durante 24 h, con la finalidad de obtener perlas más resistentes. Después, las perlas fueron recuperadas, se lavaron con agua ultrapura hasta pH neutro, y se almacenaron en agua ultrapura hasta su utilización. La materia seca de las perlas de quitosano se determinó en base a la metodología establecida por la AOAC (1984) con algunas modificaciones. Se pesaron 0.5 g de perlas y se añadieron a un filtro Wattman # 41 (peso constante) y se llevaron a sequedad a 60°C durante 5 horas, hasta peso constante.

Caracterización fisicoquímica del quitosano

Composición proximal

A las muestras de quitosano se determinó humedad, cenizas y proteína, en base a las metodologías establecidas por la AOAC (1984) con algunas modificaciones. Para la determinación de humedad la muestra fue secada a 120 °C en una estufa eléctrica (Felisa, FE-291D, México) durante toda la noche. El análisis de cenizas se realizó en una mufla (Branstead, FD1535M, USA) a 550 °C durante 5 horas. La determinación de proteína se llevó a cabo por el método de Biuret utilizando un estándar de seroalbumina de bovino, a 540 nm con un espectrofotómetro (Thermo Scientific, Genesys 10uv, USA).

Prueba de solubilidad

Para la determinación de solubilidad del quitosano se preparó una solución de quitosano/ ácido acético al 1% (p/v), la cual se filtró a vacío en papel Wattman # 41 (llevado previamente a peso constante). Posteriormente, el filtró con el residuo, se secó a

60°C durante toda la noche. Finalmente, se registró la porción insoluble mediante diferencia de peso (Agulló y otros, 2004).

Prueba de viscosidad

El quitosano obtenido se lavó con agua destilada hasta alcanzar un pH cercano a la neutralidad. A continuación, se preparó una solución en proporción 1:10 quitosano/ácido acético al 1%, la cual se agitó durante 5 minutos en un agitador magnético y se midió la viscosidad (viscosímetro, Brookfield DV-II) a 50 rpm a temperatura ambiente utilizando el disco # 1.

Grado de acetilación

El grado de acetilación se determinó en base al método de espectrofotometría UV propuesto por Liu y otros (2006). Específicamente, 6 mg de quitosano se disolvieron en 50 ml de HCl 0.1 N y la mezcla se sonificó durante 15 minutos. Después, la solución se filtró por gravedad en papel Wattman # 41 y se midió la absorbancia a 201 nm. Las mediciones se realizaron por triplicado. Previamente, se preparó una curva estándar de D(+)-glucosamina y N-acetil-glucosamina para obtener la ecuación de la recta necesaria para realización de los cálculos.

Determinación de tamaño de partícula

Se pesaron 46.88 g de quitosano y se colocaron en una torre de tamices con porosidades de 30, 40, 70, 80, 140 y 200 mesh (Sieve Shaker, modelo RX-86), el proceso se llevó a cabo por espacio de 5 minutos, finalmente se recolectaron las muestras de quitosano que fueron retenidos en cada tamiz para posteriormente registrar el peso.

Medición de la capacidad de adsorción de las perlas de quitosano

Para medir la capacidad de adsorción de cobre (Cu^{+2}) de las perlas de quitosano se siguió el método propuesto por Osifo y otros (2008) con algunas modificaciones. Específicamente, a 250 ml de la solución de sulfato de cobre (25 mg/l, pH 5.8), considerada como el agua sintética, se le adicionaron 200 mg de perlas de quitosano

(12.6 g) todo en un matraz de 500 ml, el ensayo se realizó por triplicado. La mezcla se mantuvo en agitación constante durante 22 h a 25°C. Posteriormente, se decantó el sobrenadante y se cuantificó el cobre en el líquido sobrenadante mediante un espectrofotómetro de absorción atómica (Varian, Spectra AA-220) con una lámpara de cátodo hueco múltiple (Ag/Cr/Cu/Fe/Ni) a una longitud de onda de 324.7 nm en un rango de trabajo de 0.03 ppm con una flama aire/acetileno.

Resultados y discusión

En la presente investigación se presenta la utilización de las perlas de quitosano como un material natural bioabsorbente para su utilización en aguas con presencia de metales. En la primera etapa, se obtuvo el quitosano por tratamiento termoalcalino y se realizó su caracterización fisicoquímica; en la segunda etapa, se prepararon las perlas de quitosano, y finalmente se evaluó la capacidad de adsorción de cobre de las perlas en muestras de agua sintéticas con sulfato de cobre (CuSO_4).

Obtención y caracterización de quitosano

Para la obtención del quitosano con las características deseadas fue necesaria la experimentación con diversos métodos. Primeramente, se siguió el método propuesto por Rege y otros (1999), quienes proponen una hidrólisis con NaOH al 45% a 80°C durante 24 h, obteniéndose un quitosano con poca solubilidad y baja viscosidad que no permitía la formación de perlas. Posteriormente, se modificó éste método y se empleó NaOH al 45% a 80°C durante 6 h, resultando un quitosano con características muy similares a las reportadas anteriormente. También, se experimentó con el método propuesto por Peniche (2006) con algunas modificaciones, el cual utiliza un tratamiento térmico en dos etapas. Este método se realizó con NaOH al 45% a 100°C durante 30 min (cada una de 15 minutos), pero la solubilidad del polímero obtenido fue nula al igual que su capacidad para la formación de perlas. Finalmente se logró obtener el quitosano con la calidad deseada, al tratar la quitina con NaOH al 50% a 80°C durante 4 h en una proporción 1:10 (m/v), con agitación durante 20 segundos cada 30 minutos. El quitosano obtenido presentó los parámetros de viscosidad, solubilidad y grado de deacetilación requeridos.

Las características óptimas del quitosano son difíciles de lograr debido al efecto de los parámetros de la hidrólisis en el grado de deacetilación. Mármol y otros

(2004), indican que para la preparación de quitosano con alto grado de deacetilación es necesario controlar la temperatura, tiempo de reacción y concentración de NaOH. De igual forma, Peniche (2006), señala que los tratamientos considerados como agresivos, con respecto al tiempo de reacción, pueden degradar el polímero sin aumentar el grado de deacetilación, también señala que es importante obtener un quitosano deacetilado homogéneamente ya que esto facilita su solubilidad.

La tabla 1 presenta las propiedades fisicoquímicas del quitosano obtenido por deacetilación termoalcalina de la quitina. Mármol y otros (2004) reportan valores similares de humedad (6.74%) y nitrógeno total (6.84%), sin embargo, difieren con los valores de viscosidad (521 cps) y contenido de cenizas (0.08%).

Tabla 1. Caracterización fisicoquímica del quitosano

<i>Análisis</i>	<i>Resultados</i>
Humedad	5.36%
Cenizas	6.64%
Tamaño de partícula	106 micrometros
Proteína (Biuret)	3.57%
Viscosidad	175 cp

Fuente: elaboración propia.

Por otra parte, Ohtakara y otros (1998) reportan valores de cenizas (0.08%), viscosidad (480 cps) y contenido de humedad de 4.75% en quitosano preparado con NaOH al 50%; mientras que, Bough y otros (1978) obtuvieron quitosano bajo en cenizas (0.62-0.75%) y rangos de viscosidad entre 311 y 511 cps, con tratamientos alcalinos a 145-150°C. Para los últimos investigadores, la diferencia en el contenido cenizas del quitosano se atribuye al proceso adicional de desmineralización con HCl 0.6 N, el cual reduce el contenido de minerales en las muestras, y la diferencia de viscosidad son influenciadas por el tratamiento térmico, especie de crustáceo y el método de obtención utilizado.

El grado de solubilidad es un índice de la conversión de quitina a quitosano, lo cual corresponde al 98.8%, debido a casi total disolución en ácido acético al 1%, y el resto es quitosano con menos del 50% de deacetilación, y este corresponde a la fracción insoluble. Liu y otros (2008) señalan que la solubilidad está estrechamente relacionada con el grado de acetilación y reportan que para obtener quitosano con buena solubilidad es necesario que la acetilación sea mayor al 85

por ciento. Rinaudo (2006) menciona que hay otros factores importantes que intervienen en el grado de solubilidad tales como la distribución de los grupos acetilos en la cadena principal, el peso molecular, la naturaleza del ácido y la fuerza iónica.

Ensayo de las perlas de quitosano como bioabsorbente

Las perlas de quitosano se prepararon según el método propuesto por Flores y otros (2005) con algunas modificaciones, encontrándose que las condiciones óptimas para la formación de las perlas se consiguen al disolver 1 g de quitosano en 45 ml de ácido acético al 1%, agitando hasta obtener una solución viscosa, finalmente la solución se gotea en NaOH al 1N y se dejan las perlas en reposo sin agitación durante 24 h.

Las perlas de quitosano obtenidas presentan una coloración amarilla semitransparente de consistencia suave y superficie brillante, con óptimas características de viscosidad en ácido acético al 1 por ciento. Estas características son similares a las reportadas por Shepherd y otros (1997), quienes mencionan que los geles realizados con quitosano comercial (grado analítico, Sigma) resultan en un gel de consistencia amarilla transparente, con superficie suave y flexible; también, reportan que estas propiedades son similares para las perlas preparadas con quitosano Profloc 340. Asimismo, señalan que los geles de quitosano extraído de las plumas de calamar son los únicos que tienen coloración blanca transparente.

Tabla 2. Porcentaje de adsorción de las perlas de quitosano

<i>Repeticiones</i>	<i>Cu(mg/L)</i>	<i>(%)</i>
1	0.067	99.73
2	0.076	99.69
3	0.047	99.81

Fuente: elaboración propia.

La adsorción de Cu^{+2} de las perlas de quitosano se observó de manera rápida, ya que en los primeros 30 minutos de contacto con la solución de cobre las perlas tomaron una coloración azul tenue, y posterior a las 6 h el color azul se tornó más intenso. Después de 22 h de inmersión de las perlas en el agua sintética, se separaron las perlas por decantación del líquido y se determinó la concentración de cobre en el

sobrenadante. La eficiencia de remoción de cobre de perlas de quitosano fue del 99.74% en muestras de agua con 25 mg/l de Cu^{+2} , lo que equivale a una capacidad de adsorción de 126.1 mg/g. Estos valores son similares a los de Flores y otros (2005) quienes reportan que la capacidad de adsorción de las perlas de quitosano es de 200 mg/g de Cu^{+2} (pH 5.3). Asimismo, Babel y Kurniawan (2003) reportan perlas de quitosano con capacidad de adsorción de 222 mg/g para Cu^{+2} . En la tabla 2 se muestra la concentración de Cu^{+2} en el sobrenadante y el porcentaje de Cu^{+2} adsorbido por las perlas de quitosano, en las tres repeticiones.

La capacidad de adsorción de las perlas está influenciada por el pH (5.8, en los ensayos realizados con aguas sintéticas). Según, Rinaudo (2006) a $\text{pH} > 5$ las perlas de quitosano forman complejos con metales como el cobre, e indican que a mayor grado de acetilación mejor será la capacidad de quelación de metales. Esta capacidad de quelación está relacionada con el contenido de grupos amino libres ($-\text{NH}_2$) y con la distribución de estos grupos en la cadena. Por otro lado, Zhao y otros (2007) mencionan que la capacidad de adsorción de las perlas de quitosano varía de 4 mg/g hasta 17 mg/g para Cu^{+2} a pH de 6.2, lo cual difiere de los resultados obtenidos en la presente investigación. Estos cambios en la capacidad de adsorción se deben al pH, el tamaño de partícula, el proceso de preparación del quitosano, y la porosidad de la perla. Una de las desventajas de utilizar quitosano como bioadsorbente es la marcada diferencia que puede existir entre un quitosano y otro, ya que influyen diversos factores como el grado de acetilación, peso molecular, propiedades de la solución, grado de cristalinidad, afinidad por el agua, y el porcentaje de grupos amino en la cadena.

Conclusión

El quitosano obtenido de la hidrólisis alcalina de la quitina extraída de los residuos de camarón posee propiedades fisicoquímicas apropiadas para la preparación de perlas de quitosano. Adicionalmente, las perlas de quitosano mostraron buena capacidad de absorción de cobre en aguas sintéticas. Estos resultados indican el potencial de uso de los residuos de la industrialización del camarón al generar productos con valor agregado tales como el quitosano.

Referencias

AOAC (1984), *Official Method of Analysis of the Association of Official Analytical Chemistry*, Sidney Williams (ed), Fourteenth edition, United States.

- Arellano, D.J. (2002), "Introducción a la ingeniería ambiental", Alfaomega (ed), México, pp. 86-95.
- Bailey, S.E.; J.O. Trudy; R.B. Marck and D.A. Dean (1998), "A Review of Potentially Low-Cost Sorbent for Heavy Metals", *Pergamon*, 33(11), pp. 2469-2479.
- Babel, S. and T.A. Kurniawan (2003), "Low-Cost Adsorbents for Heavy Metals Uptake from Contaminated Water: A Review", *Journal of Hazardous Materials*, 97, pp. 219-243.
- Bough, W.; W. Salter and B. Perkin (1978), "Influence of Manufacturing Variables on the Characteristic and Effectiveness of Chitosan Product. I. Chemical Composition, Viscosity and Molecular-Weight Distribution of Chitosan Product.", *Biotechnology and Bioengineering*, 20, pp. 1931-1943.
- Cardenas, G.; O. Parra and E. Taboada (2001). "Synthesis and Applications of Chitosan Mercaptanes as Heavy Metal Retention Agent", *International Journals of Biological Macromolecules*, 28, pp. 167-174.
- Días J.M.; M.C.M. Alvim Ferraz; M.F. Almeida; J. Rivera Utrilla and M. Sánchez Polo (2007), "Waste Materials for Activated Carbon Preparation and Its Use in Aqueous-Phase Treatment: A Review", *Journal of Environmental Management*, 85, pp. 833-846.
- Flores, J.A.; A.R. Navarro; K.P. Ramos; L. Chang; N. Ale; M. Ly y H.J. Maldonado (2005), "Adsorción de Cu(II) por quitosano en polvo y perlas de gel", *Rev. Soc. Quim. Perú*, 1, pp. 17-25.
- Gaffar, M.A.; M. Safaa; El-Rafie, F. Khaled and El-Tahlawy (2004), "Preparation and Utilization of Ionic Exchange Resin Via Graft Copolymerization of β -CD Itaconate with Chitosan", *Carbohydrate Polymers*, 56, pp. 387-396.
- Henry, J.G. and G.W. Heinke (1999), *Ingeniería Ambiental*, Prentice Hall (Ed), México, pp. 23-25.
- Liu, D.; Y. Wei; P. Yao and L. Jiang (2006), "Determination of Degree of Acetylation of Chitosan by UV Spectrophotometry Using Dual Standards", *Carbohydrate Research*, 341, pp. 782-785.
- Liu, Y.; Z. Liu; W. Pan and Q. Wu (2008), "Absorption Behaviors and Structure Changes of Chitin in Alkali Solution", *Carbohydrate Polymers*, 72, pp. 235-239.
- Mármol, Z.; E. Gutiérrez; G. Paez; J. Ferrer and M. Rincón (2006), "Desacetilación termoalcalina de la quitina de conchas de camarón", *Multiciencias*, 4(2), pp. 1-10.
- Ngh W.W.S.; M.A.K.M Hanafiah (2008), "Removal of Heavy Metal Ions from Wastewater by Chemical Modified Plant Wastes as Adsorbents: A Review", *Bioresource Technology*, 99, pp. 3935-3948.

- O'Connell, D.W.; C. Birkinshaw and T.F. O'Dwyer (2008), "Heavy Metal Adsorbents Prepared from the Modification of Cellulose: A Review", *Bioresource Technology*, 99, pp. 6709-6724.
- Othakara, A.; M. Izume and M. Mitsutomi (1998), "Action of Microbiological Chitinases on Chitosan with Different Degrees of Deacetylation", *Agric. Biol. Chem.*, 52(12), pp. 3181-3182.
- Pan, B.; W. Zhang; Q. Zhang and S. Zheng (2008), "Adsorptive Removal of Phenol from Aqueous Phase by Using a Porous Acrylic Ester Polymer", *Journal of Hazardous Materials*, 157, pp. 293-299.
- Peniche, C.C.A. (2006), "Estudio sobre la quitina y quitosana", *Tesis Doctoral*, Cuba, Universidad de la Habana, Facultad de química.
- Percot A.; C. Viton and A. Domard (2003), "Optimization of Chitin Extraction from Brown Shrimp Shell", *Biomacromolecules*, 4, pp. 12-18.
- Rege, P.R. and L.H. Block (1999), "Chitosan Processing: Influence of Process Parameters During Acidic and Alkaline Hydrolysis and Effect of the Processing Sequence on the Resultant Chitosan's Properties", *Carbohydrate Research*, 321, pp. 235-245.
- Rinaudo, M. (2006), "Chitin and Chitosan: Properties and Applications", *Prog. Polym. Sci.*, 31, pp. 603-632.
- Sánchez Machado D.I.; J. López Cervantes and O. Martínez Cruz (2008), "Quantification of Organic Acids in Fermented Shrimp Waste by HPLC", *Food Technol. Biotechnol*, 46(4), pp. 456-460.
- Sheperherd, R.; S. Reader and A. Falshaw (1997), "Chitosan Functional Properties" *Glycoconjugate Journal*, 14, pp. 535-542.
- Volzone, C. and L.B. Garrido (2008), "Use of Modified Hydroxy-Aluminum Bentonites for Chromium(III) Removal from Solutions", *Journal of Environmental Management*, 88, pp. 1640-1648.
- Zhao, F.; B. Yu; Z. Yue; T. Wang; X. Wen; Z. Liu and C. Zhao (2007), "Preparation of Porous Chitosan Gel Beads for Copper (II) Ion Adsorption", *Journal of Hazardous Materials*, 147, pp. 67-73.

Impacto ambiental de la producción de agrocombustibles

Environmental impact of biofuel production

M. A. Otero Rambla¹

Resumen

Los mayores depósitos de energía descansan en la reducción del consumo de la misma en las actividades económicas. En los países industrializados se gastan no menos de 15 cal para producir y distribuir 1 caloría de alimento. El transporte contribuye en 14% a la emisión de GEI. La agricultura intensiva o industrializada aporta una cantidad similar y es un factor clave después del calentamiento global: en primer lugar los fertilizantes, seguidos por la ganadería y el cultivo del arroz. Los biocombustibles pueden paliar estos impactos, pero tienen un indiscutible impacto ambiental negativo. La vida económica *se alimenta* de la baja entropía, por ejemplo, granos, madera, acero, cobre, aluminio, ropas, computadoras, etc., todas estructuras altamente organizadas. La Termodinámica explica el *valor* económico de la tierra, no puede ser consumida, pero: *a)* permite al ser humano capturar la más vital forma de baja entropía - la luz del sol y, *b)* desde hace millones de años el planeta no hace tierra nueva. Los procesos económicos son altamente entrópicos. Transforman baja entropía en alta entropía. Todo proceso económico, desde el punto de vista termodinámico, transforma la baja entropía en desechos.

Con respecto al bioetanol de maíz, Estados Unidos produce más de 25 mil millones de litros anualmente. Emplea 13% de la cosecha de maíz y requiere tierras

¹ Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA), Vía Blanca 804 y Carretera Central, San Miguel del Padrón, c.p. 11000, La Habana, tel. (537)-765-3686, correo electrónico: miguel.otero@icidca.edu.cu

de alta calidad para su cultivo. La captura y conversión de la energía solar es inferior a otros cultivos empleados como sustrato para bioetanol, su rendimiento energético es de $\sim 100\text{-}130$ GJ/Ha/cosecha (caña de azúcar 400 GJ/Ha), tiene un alto consumo de fertilizante nitrogenado y requiere abundante irrigación. La energía fósil es esencial para la agricultura intensiva (industrializada).

Abstract

The largest energy deposits lie in reducing the consumption of it in economic activities. In Industrialized countries spend at least 15 cal to produce and distribute 1 calorie of food. Transport contributes about 14% of GHG emissions. Intensive and industrialized agriculture contributes a similar amount and is a key factor after global warming: first fertilizer, followed by livestock and rice cultivation. Biofuels can mitigate these impacts, but have a negative environmental impact indisputable. Economic life feeds on low entropy, for example, grains, wood, steel, copper, aluminum, clothes, computers, etc., all highly organized structures. Thermodynamics explains that economic value of land can not be consumed, but a) allows human beings to capture the most vital form of low entropy –the sunlight– and, b) for millions of years the planet have not form new earth. Economic processes are highly entropic. Transform low entropy into high entropy. Every economic process, from the thermodynamic standpoint, transforms the low entropy into waste. With regard to corn ethanol, the U.S. produces more than 25 billion liters annually. Employs 13% of the corn crop and requires high quality land for cultivation. The capture and conversion of solar energy is lower than other crops used as substrate for bioethanol, the energy efficiency is $\sim 100\text{-}130$ GJ / ha / crop (sugar cane 400 GJ / ha), has a high nitrogen fertilizer consumption intensive and intensive irrigation. Fossil energy is essential for agriculture (industrial).

Introducción

La ecuación energética

Muchos expertos consideran que los mayores depósitos de energía descansan en la reducción del consumo de esta. Aun cuando se produzcan autos cada vez más eficientes su número aumenta constantemente y es un imperativo inaplazable reducir

el consumo de energía. La agricultura desarrollada es una alta consumidora de energía (básicamente de fuentes fósiles) para producir fertilizantes, agroquímicos y la operación de toda la maquinaria que se emplea en las labores agrícolas.

A pesar de estos gastos energéticos, el sector agrícola, sin embargo, consume sólo 25% de la energía para llevar el alimento a nuestras mesas, el resto se gasta en: procesamiento, empaque, congelación, cocción y transportación, así, se gastan en los países industrializados no menos de 15 cal para producir y distribuir 1 caloría de alimento. El transporte global contribuye en 14% a la emisión de GEI. La agricultura aporta una cantidad similar sin tomar en cuenta el desmonte de tierras y el cambio de cultivos. No es de extrañar entonces, que la agricultura intensiva sea un factor clave tras el calentamiento global. Dentro de los consumidores más importantes de energía fósil en la agricultura industrializada se encuentran los fertilizantes. Esta es la fuente simple mayor de emisiones de la agricultura, seguido por las ganadería (emisión de metano por la digestión anaeróbica de los rumiantes) y el cultivo del arroz (anegación de tierras, emisión de metano). Por otra parte, grandes cantidades de nitrógeno que atraen las plantaciones o que se depositan artificialmente en el suelo, son emitidos a la atmósfera como óxido nitroso, unas 329 veces mayor que el efecto invernadero del CO₂.

Energía y medio ambiente

Los enormes gastos energéticos que demanda nuestro modelo civilizatorio conducen al calentamiento global y los cambios climáticos que vemos hoy por doquier. Es una tarea imprescindible reducir las emisiones de gases con efecto invernadero (GEI).

Una buena parte de la humanidad espera hoy un efecto positivo de los agro-combustibles y otras fuentes renovables de energía sobre estos cambios. En este sentido, tomando como ejemplo a la Unión Europea, vemos que se ha propuesto sustituir 10% de sus necesidades de transporte por los agro-combustibles para 2020. Sin embargo, se requiere para ello el suministro ~ 15 mil millones de litros de bioetanol y biodiesel para cubrir esa demanda y no hay posibilidades en Europa para siembras energéticas o para incrementos importantes de bioetanol de granos, por tanto, las importaciones serán la fuente principal. Así, la carga de estas producciones tendrá que llevarla el mundo subdesarrollado y por supuesto el impacto ecológico concomitante. La producción de biocombustibles tiene un indiscutiblemente impacto ambiental negativo a pesar de que puede reducir las cantidades de gases de efecto invernadero emitidos.

Impacto del hombre sobre la naturaleza

El impacto humano sobre la naturaleza ha sido con frecuencia un proceso destructivo. Se puede mencionar un grupo de efectos negativos asociados con la actividad antropogénica desde la prehistoria:

- Deforestación y ciclos de inundaciones y sequías durante el sistema de plantaciones romano.
- Consecuencias ecológicas de las guerras púnicas que devastaron la Campania durante años.
- Agotamiento de los suelos y la escasez de agua para la irrigación de las tierras labrantías en la civilización maya y teotihuacana.
- Las poblaciones de salmónidos en el río Columbia en el oeste de norteamérica se vieron impedidas de acceder a sus zonas de desove por los embalses construidos.
- En Egipto, por la construcción de la presa en Asuán (río Nilo) en 1971, las sardinas mediterráneas murieron y los pescadores de estas especies se quedaron sin ingresos. Asimismo, los agricultores de estas localidades tuvieron que recurrir a los fertilizantes químicos, en ausencia de las crecidas primaverales del Nilo y con ello el depósito de la capa anual de limo fértil sobre las tierras ribereñas del río.
- El mar de Aral, en Asia Central, casi se secó totalmente por el desvío de Amu Daria y Sir Daria, ríos que lo alimentaban para regar los campos de algodón en Kasajtan antigua Unión Soviética. La tabla 1 muestra un resumen de los GEI de mayor importancia.

Tabla 1. Resumen de gases con efecto invernadero

<i>GEI</i>	<i>Concentración 1750</i>	<i>Concentración 2009</i>
Dióxido de carbono	280 ppmv*	370 ppmv
Metano	0,8 ppmv	1.77 ppmv
Oxido nitroso	275 ppbv**	314 ppbv

Fuente: elaboración propia.

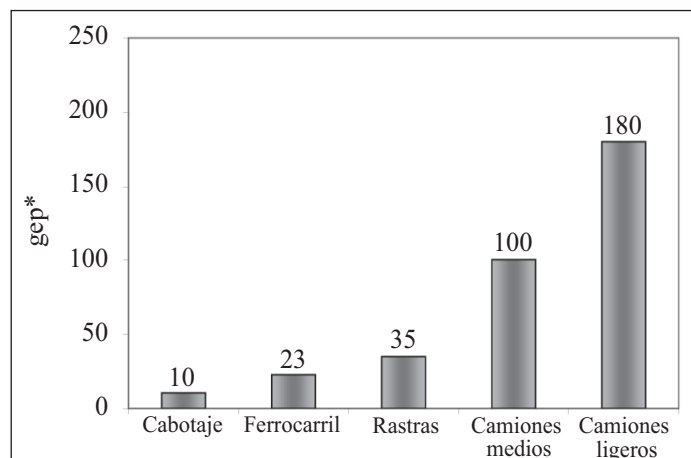
Tabla 2. Emisiones totales de gases de efecto invernadero en los países industrializados y semiindustrializados más contaminadores²

<i>País</i>	<i>Emisiones totales, millones ton/año</i>	<i>Año de referencia</i>
China	7200.0	2009
USA	6049.4	2008
Rusia	2192.0	2007
India	1342.92	2004
Japón	1371.9	2006
Alemania	860.5	2004
Reino Unido	587.3	2004
Sudáfrica	437.0	2004
Francia	373.7	2004
Brazil	331.8	2004

Fuente: elaboración propia.

Por otra parte, la figura 1 muestra el impacto de un automóvil en nuestra civilización.

Figura 1. Consumo promedio por unidad de carga de diferentes medios de transporte (t/Km)



Fuente: elaboración propia.

² National Geographic News Friday, April 24, 2009, 2. India debe ser en este momento el tercer emisor de gases de efecto invernadero en el mundo, IANS septiembre 25 de 2008.

Retos fundamentales de la humanidad en el siglo XXI

El mayor reto es el aseguramiento de la alimentación para más de 6 mil millones de seres humanos (el más acuciante a corto plazo) en un planeta en vías de agotamiento y con reservas limitadas de tierras. Por otra parte, y no menos importante, se encuentra el deterioro ecológico expresado en los cambios climáticos producto del calentamiento global que avanza inexorablemente. Finalmente, la búsqueda de fuentes alternativas de energía para sostener una humanidad con una terrible adicción por los combustibles fósiles que a pasos agigantados viene envenenando el planeta. La tabla 2 muestra la lista de países más contaminantes en la actualidad.

Leyes de la termodinámica y sostenibilidad

La termodinámica, como todos sabemos es el campo de la física que describe y relaciona las propiedades físicas de la materia de los sistemas macroscópicos, así como sus intercambios energéticos. Los principios de la termodinámica tienen una importancia fundamental para todas las ramas de la ciencia y la ingeniería. En la actualidad también lo tienen desde el punto de vista ecológico.

Un concepto esencial de la termodinámica es el de sistema macroscópico y este se define como un conjunto de materia que se puede aislar espacialmente y que coexiste con un entorno *infinito e imperturbable*. La termodinámica se compone por un sistema de leyes o principios, a saber:

- *Primera ley o de la conservación de la energía (Joule, Clausius, Thompson):* La energía no puede ser creada o destruida; o lo que es lo mismo, la energía del universo permanece constante y por tanto lo único que se puede hacer es transformar una en otra, es decir, no se puede crear energía nueva.
- *Segunda ley o ley de la entropía (Clausius):* Sin la compensación de los cambios en alguna otra parte, el calor solo puede fluir de un cuerpo más caliente a uno más frío. En este sentido, con el transcurrir del tiempo cronológicamente, la entropía del universo tiende a ser máxima, es decir, toda se disipa como calor; o lo que es lo mismo, una vez convertida en calor no hay posibilidad de usarla nuevamente.
- *Tercera ley: (Nernst y Planck):* La entropía de cualquier sustancia condensada, por ejemplo, líquido o sólido es cero en el cero absoluto de temperatura. Pero, la temperatura del cero absoluta es inalcanzable por lo que no se puede detener

la conversión espontánea de energía en calor. De acuerdo con esto, la producción de biocombustibles va a tener indefectiblemente impacto ambiental negativo a pesar de que puede reducir, en algunos casos, las cantidades de GEI.

A partir del enunciado de las leyes anteriores pueden hacerse algunas consideraciones de importancia ecológica.

La vida económica *se alimenta* de la baja entropía, por ejemplo, granos, madera, acero, cobre, aluminio, telas, computadoras, etc., todas ellas estructuras altamente organizadas. Si se analiza el *valor* económico de la tierra de acuerdo con la termodinámica, aún cuando la tierra no puede ser consumida, este valor se deriva de dos hechos fundamentales:

- La tierra permite al ser humano capturar la más vital forma de baja entropía la luz del sol.
- Nuestro planeta dejó de hacer nueva tierra en grandes cantidades hace muchos millones de años, por tanto la que existe actualmente es la única que tenemos y tendremos hasta el fin de nuestra civilización.

Si se tiene en cuenta que todo proceso económico es altamente entrópico, ni crea ni destruye masa o energía, sino solamente transforma baja entropía en alta entropía, *todo proceso económico, desde el punto de vista termodinámico, transforma la baja entropía en desechos*. Una vez que ya sabemos que los procesos de producción de biocombustibles son generadores de alta entropía, analicemos las alternativas presentes de su producción y su impacto en nuestros ecosistemas.

Bioetanol de maíz

Desde 2006 Estados Unidos es el mayor productor de bioetanol, y sigue aumentando sus escalas de producción en busca de la autosuficiencia energética. Más de 25 mil millones de litros anualmente son producidos a partir del maíz del Medio Oeste norteamericano (Sasson 2008). El 40% de la producción del grano está en manos de granjeros que a su vez son dueños de destilerías. Esta producción consume 13% de la cosecha de maíz en Estados Unidos.

El maíz como cultivo agrícola exhibe algunas características importantes (Patzek, 2004):

- Requiere de tierras de alta calidad para su cultivo.
- La captura y conversión de la energía solar es inferior a otros cultivos empleados como sustrato para la fermentación alcohólica.
- La estación de cultivo es mucho más corta que en los cultivos perennes dedicados a este propósito como la caña de azúcar por ejemplo.
- Su rendimiento energético es ~ 100-130 GJ/Ha/cosecha. La caña de azúcar, está en el entorno de los 400 GJ/Ha.
- Consume más fertilizante nitrogenado que cualquier otro cultivo individual en Estados Unidos, y está fertilizada totalmente su producción.
- Requiere abundante irrigación.

Consumo de energía fósil en la producción de bioetanol de maíz y caña de azúcar

La energía fósil es esencial para la agricultura intensiva (industrializada). Los insumos más importantes de energía en la producción de etanol de maíz son los siguientes:

- Fertilizantes nitrogenados (toda energía fósil).
- Fosfato, potasa y calcio en la industria (toda energía fósil).
- Herbicidas e insecticidas (toda energía fósil).
- Combustibles fósiles: diesel, gasolina, gas natural.
- Electricidad (casi toda energía fósil).
- Transporte (toda energía fósil).
- Siembra y regadío (mayormente energía fósil).
- Infraestructura (mayormente energía fósil).
- Mano de obra (mayormente energía fósil).

Finalmente, este maíz es transformado, con el auxilio de más energía fósil, en bioetanol puro. En el caso de la caña de azúcar, el mayor productor mundial es Brasil.

Este país produjo más de 23.4 mil millones de litros en 2009 (*Biofuel Digest* Ene 2010).

- De la producción 95% en modo discontinuo con recirculación de levadura.
- La totalidad del área sembrada de caña es de ~7 millones de Ha.
- Requiere de tierras de calidad media para su cultivo.

- La captura y conversión de la energía es muy alta.
- Su cultivo es anual y no requiere resiembra más que cada 5-6 años.
- Rendimiento energético ~ 400 GJ/Ha/cosecha.
- Es también un alto consumidor de fertilizante nitrogenado (~ 70 kg/Ha) y K₂O).
- No requiere abundante irrigación.

El consumo de energía fósil en la producción de bioetanol de caña se desglosa como sigue:

- Fertilizantes nitrogenados (toda energía fósil).
- Fosfato y K₂O (toda energía fósil).
- Lubricantes (energía fósil).
- Electricidad (renovable, proceso auto-sostenible por la combustión del bagazo).
- Transporte (energía fósil).
- Siembra (eventualmente tracción animal), regadío (mayormente energía fósil).
- Infraestructura (energía fósil).
- Mano de obra (mayormente energía fósil aunque menor que el maíz).

Residualidad de ambos procesos

Maíz

- En el remojo del grano, se produce licor de maíz que se utiliza como fuente de nitrógeno en algunas producciones fermentativas especiales.
- El grano no hidrolizado se seca junto con las vinazas de destilación (muy pobres en nutrientes) para la alimentación animal preferentemente rumiantes

Caña

- Genera de 11 a 15 L de vinazas (altamente contaminantes)/ L de bioetanol destilado

Tabla 3. Comparación de la producción de etanol a partir de caña de azúcar y maíz

<i>Caña de azúcar</i>	<i>Maíz</i>
Cinco cortes en seis años	Siembra anual
Rendimiento etanol 80 L/t	Cosecha anual
6 millones de Ha en producción	Rendimientos de 4-4.5 t/Ha
Pudiera competir por tierras	Rendimiento etanol 380 L/t
Cultivo perenne	1 Ha rinde 3028 L etanol
Rendimientos de 70 t/Ha	43 millones de Ha en producción
1 Ha rinde 5542 L etanol	Totalidad de la cosecha mecanizada
Costo producción dólares = 0.21	Costo de producción dólares = 0.27

Fuente: elaboración propia.

Producción de biodiesel

Biodiesel es el nombre dado a un combustible alternativo al diesel convencional y que se fabrica a partir de grasas vegetales o animales a partir de la reacción catalítica de los ácidos grasos con un alcohol alifático de cadena corta (*metanol o etanol*), por medio de un proceso conocido como *transesterificación*. La reacción esquemática de la transesterificación se muestra en la figura 2.

Figura 2. Reacción esquemática de la transesterificación

CO-OCR1
Cat. alcalino
CO-OCR2 $R1COO-Met + R2COOMet + R3COO-Met + C_3H_5(OH)_3$
Metanol ésteres metílicos (biodiesel) glicerol
CO-OCR3
Triglicérido

Fuente: elaboración propia.

Fuentes de aceites para la producción de biodiesel

Es posible la producción de biodiesel a partir de cultivos que producen aceites no comestibles como la *Jatropha curcas* de la familia de las Euphorbiaceas. Esta planta es un arbusto que crece en tierras marginales con muy pocas necesidades de agua,

nativa de Centroamérica. Sus semillas contienen una gran cantidad de aceite. Puede ser cultivada en tierras marginales inadecuadas para otros cultivos. Ha sido empleada en África desde hace cientos de años como cerca viva.

Se ha calculado que una planta de *Jatropha* puede producir 1 L de aceite a partir de sus semillas cada año por espacio de 40 años. Sin embargo, en África ha mostrado algunas propiedades indeseables como hospedera de un virus que ataca la yuca (*Mannihot utilisima*) que destruyó 80% de la producción del sudeste en el continente provocando la muerte de más de 3 mil personas que se alimentaban básicamente de este cultivo. De hecho su cultivo fue abandonado en toda esta región a finales del siglo pasado. En Australia y Nueva Zelanda, se considera una planta perjudicial.

La palma aceitera o palma africana (*Elaeis guineensis*), es un cultivo extendido en todo el sudeste de Asia, especialmente en Malasia e Indonesia, los mayores productores de aceite de palma en el mundo.

El impacto ecológico de estas plantaciones es ya considerable y algunos especialistas avanzan que será un desastre ecológico. El drenaje de las tierras de turba, el secado y la combustión de esta en el sudeste asiático, han emitido y emiten cantidades enormes de GEI³. En 1997 y 1998 casi 12 millones de ha en Indonesia, fueron arrasadas y el dióxido emitido alcanzó el equivalente del 16-20% de todas las emisiones debidas a los combustibles fósiles en el mundo.

Microorganismos oleaginosos como fuente de producción de biodiesel

Microalgas autótrofas

Estos microorganismos utilizan el CO₂ del aire como fuente carbonada y la luz del sol como energía para acumular lípidos bajo ciertas condiciones de cultivo. En la acumulación influye: la especie, los parámetros de cultivo (T, intensidad de luz, pH, salinidad, fuentes de nitrógeno y minerales, entre otros). Sin embargo, el escalado es en extremo complicado. Requiere de áreas extensas si se cultiva en estanques –deben ser someros– de las que hoy no existe disponibilidad en general. Al precisar la luz como fuente de energía, la iluminación natural varía entre el día y la noche y estacionalmente a lo largo del año. La iluminación artificial puede suplir estas necesidades. Por

³ Al drenar, la turba se oxida y emite CO₂. Adicionalmente, con el tiempo se seca y se incendia espontáneamente.

otra parte, las algas con altos contenidos de lípidos no sobreviven fácilmente ni producen eficientemente lípidos en los ambientes contaminados de las lagunas abiertas. La tabla 4 muestra las potencialidades de estos microorganismos.

Tabla 4. Acumulación de lípidos por varias especies de microalgas

<i>Especie</i>	<i>Contenido lípidos, %</i>
<i>C. vulgaris</i>	40
<i>C. emersonii</i>	63
<i>C. protothecoides</i>	23
<i>C. vulgaris</i>	56.6

Fuente: elaboración propia.

Levaduras

Son organismos heterotrófos que requieren de carbono orgánico como fuente de C y energía simultáneamente. Muchas especies de levadura son capaces de acumular lípidos en cantidades significativas bajo ciertas condiciones de propagación: T, pH, fuente de C, etcétera.

Pueden crecer casi sobre cualquier sustrato y su propagación es intensiva pues requieren áreas relativamente pequeñas.⁴

Su tecnología es de complejidad media y tradicional y la producción masiva es sencilla. El potencial de las algas es mayor en la producción de biodiesel pero probablemente las levaduras triunfen finalmente en este propósito por las múltiples ventajas que ofrecen. La tabla 5 muestra la producción de lípidos por diferentes especies y géneros de levaduras.

Cianobacterias

Recientemente se ha sugerido la posibilidad de producir biodiesel a partir de las cianobacterias. Conocidas también como algas verde-azules pueden convertirse en la principal plataforma bioenergética en 2010. Pueden llegar hasta 25% de su peso en forma de lípidos.

⁴ Una fábrica de producción de 20-30 t de biomasa /día precisa de un área de 2-3 ha incluyendo los servicios auxiliares.

Tabla 5. Producción de lípidos por diferentes especies de levadura

<i>Especies</i>	<i>Rendimiento lípidos, g/L</i>	<i>Coficiente lípidos, %</i>
<i>R. toruloides</i>	13.8	22.7
<i>L. starkeyi</i>	5.9	20.4
<i>L. starkeyi</i>	9.99	14
<i>L. starkeyi</i>	6.89	11
<i>R. glutinis</i>	7.19	13
<i>T. fermentans</i>	5.32	8.42
<i>C. curvatus</i>	37.1	NR
<i>R. glutinis</i> ^l	3.78	11.28

Fuente: elaboración propia.

Otras fuentes alternativas de combustible lo conforman las celdas de hidrógeno. En la actualidad se apuesta por ellas como la fuente de energía automotor del futuro. Sin embargo, las celdas combustibles de H₂, presentan múltiples barreras tanto económicas como tecnológicas. De lo que hoy se conoce de ellas se evidencian varios problemas de difícil solución a mediano y corto plazos.

El catalizador que emplean es un metal de las tierras raras, el Rhodio. Este tiene un precio de 30 mil dólares/kg, es decir, tres veces más caro que el oro⁵ y un lantánido, Cerio (nanopartículas, 250 US\$/kg).⁶ La mezcla reaccionante de etanol-agua es ultra pura (~ 99.9999%), porque las trazas de impurezas pueden destruir tanto el catalizador como la celda. La purificación del etanol a ese nivel es en extremo costosa y consume grandes cantidades de energía, generalmente fósil.

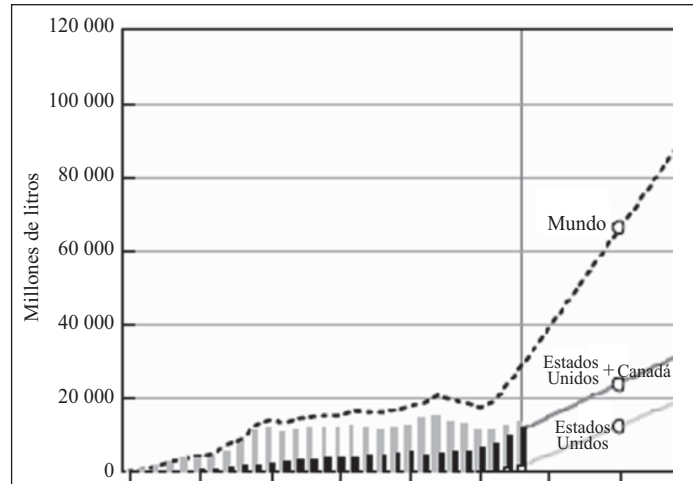
Etanol: alternativa actual

La única alternativa en la actualidad a los combustibles fósiles en el sector automotor es el etanol (el biodiesel en menor escala y básicamente en Europa). Sin embargo, es muy probable que el impacto de todas las energías alternativas —si es que logran implementarse en las proporciones requeridas— no se sienta hasta mediados del siglo actual. La figura 3 muestra la producción mundial de bioetanol hasta 2020.

⁵ Información disponible en <http://www.kitco.com/charts/rhodium.html>.

⁶ Información disponible en <http://www.advancedmaterials.us/58N-0801.html>.

**Figura 3. Producción mundial de bioetanol hasta 2020.
Realidades y perspectivas**



Fuente: elaboración propia.

Sostenibilidad y renovabilidad

La tendencia actual en el cultivo de los agrocombustibles es la utilización de todas las partes de la planta, no solamente aquellas de las que se produce el biodiesel. Ahora bien, cuando se colecta la totalidad de la planta se retira con esta también la mayoría de los minerales del suelo que contribuyeron a su crecimiento. Esto impide que se recicle una parte de la misma al suelo. El reciclaje de las partes de la planta que no se convierten en biocombustibles, podría ser una contribución para mantener la fertilidad y evitar la erosión.

Todos y cada uno de los ecosistemas en la tierra están altamente optimizados para reciclar casi toda la biomasa que generan, de no ser así, la vida asociada a ellos (flora y fauna) degenerará indefectiblemente afectándonos en alguna medida. “Desarrollo Sostenible” y otros términos asociados como “Manejo Sostenible de Ecosistemas”, “Agricultura Sostenible”, etc., se han ido enraizando en nuestra conciencia desde que fueron acuñados en la Cumbre sobre la Tierra de Río de Janeiro en 1992, pero... ¿Existe algo realmente *sostenible* en la naturaleza?, ¿cuán *sostenidos* son los procesos que hoy muchos consideran *sostenibles*?

Un proceso es sostenible, si y solo si, es capaz de sostenerse, es decir, mantenerse sin interrupción, debilitamiento o pérdida de su calidad, “por siempre”; el entorno del que este proceso se alimenta y al que expele sus desechos debe ser igualmente “sostenible por siempre”. Si no se cumplen estas dos condiciones –y raramente se cumplen– no existe sostenibilidad y los discursos oficiales de empresas, ONG, gobiernos y entidades públicas son sólo palabras huecas. Sólo la energía proveniente del sol, los vientos o el agua, pueden ser sostenibles.

La agricultura industrializada no puede ser sostenible porque descansa en el gasto irreversible y la transformación química de combustibles fósiles, y si esto fuera poco, la creciente tendencia de utilizar todas las partes de la planta, cualquiera sea esta, reducen aún más la porción de materia que debía regresar al suelo para reponer su desgaste. La civilización moderna con el consumo creciente de energía que le acompaña, sencillamente no se sostiene. Se impone una nueva armonía con la naturaleza. Si no la hallamos pronto, esta nos pasará factura al final y no será nada agradable por cierto. Recordemos un viejo proverbio de Kenya que reza: “Cuidemos la tierra, nos la dieron en préstamo nuestros hijos”. Esa debe ser nuestra filosofía en el presente o no habrá futuro.

Referencias

- Almazán, O.A.; M.M. Klibansky and M.A. Otero (1981), “Microbial Fat Synthesis in *Rhodotorula glutinis* from Blackstrap Molasses in Continuous Culture”, *Biotechnol. Letters*, 3(11), pp. 663-666.
- Anon (2008), “European Environmental Agency: Greenhouse Gas Emission Trends and Projections in Europe 2008”, *Tracking Progress Towards Kyoto Targets, Executive summary*, ISSN 1725-9177.
- Biofuel Digest Ene* (2010).
- Chisti, Y. (2007), “Biodiesel from Microalgae”, *Biotechnol Adv*, 25, pp. 294-306.
- Han, X.; X.L. Miao and Q.Y. Wu (2006), “High Quality Biodiesel Production from Heterotrophic Growth of *Chlorella protothecoides* in Fermenters by Using Starch Hydrolysate as Organic Carbon”, *J Biotech*, 126(4), pp. 499-507.
- Hiruta, O.; K. Yamamura; H. Takebe; T. Futamura; K. Inuma and H. Tanaka (1997), “Application of Maxblend Fermenter for Microbial Processes”, *J Ferment Bioeng*, 83, pp. 79-86.
- Houtart, F. (2009), *La Agroenergía: Solución para el Clima o Salida de la Crisis para el Capital*, Cuba, Editorial Ciencias Sociales, Instituto Cubano del Libro, ISBN 978-959-06-1172-8.

- Klibansky, M.M.; L.F. González and M.A. Otero (1985), “Comparación de los Sistemas en Doble y Simple Etapa para la Producción de *Rhodotorula glutinis* a partir de Mieles Finales de Caña”, *Sobre los deriv.*, ICIDCA, 19(1), pp. 16-21.
- Kong, X.L.; B. Liu; Z.B. Zhao and B. Feng (2007), “Microbial Production of Lipids by Cofermentation of Glucose and Xylose with *Lipomyces starkeyi* 2#”, *Chin J Bioprocess Eng*, 5(2), pp. 36-41.
- Li, Q.; W. Du and D. Liu (2008), Perspectives of Microbial Oils for Biodiesel Production”, *Appl Microbiol Biotechnol*, DOI, 10.1007/s00253-008-1625-9.
- Li, Y.H.; B. Liu; Z.B. Zhao and F.W. Bai (2006), “Optimized Culture Medium and Fermentation Conditions for Lipid Production by *Rhodospiridium toruloides*”, *Chin J Biotechnol*, 22(4), pp. 650-656.
- Li, Y.H.; Z.B. Zhao and F.W. Bai (2007), “High-Density Cultivation of Oleaginous Yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in Fed-Batch Culture”, *Enzyme Microb Technol*, 41, pp. 312-317.
- Otero, M.A. and O.A. Almazán (2010), “*Rhodotorula* SPP. a Potential Candidate for Biodiesel Production”, *ISSCT Congress*, Veracruz.
- Pan, L.X.; D.F. Yang; L. Shao; W. Li; G.G. Chen; Z.Q. Liang (2009), “Isolation of the Oleaginous Yeasts from the Soil and Studies of Their Lipid-Producing Capacities”, *Food Technol. Biotechnol.* 47 (2), pp. 215-220.
- Pimentel, D. And T.W. Patzek (2005), “Ethanol Production using Corn, Switchgrass and Wood; Biodiesel Production using Soybean and Sunflower”, *Natural Resources Research*, 14, pp. 65-76.
- Sasson, A. (2008) “Bioenergy and Agrofuels. Relevance beyond polemics”, *AGRY-BYS s.a.r.l (a.u.)*, Morocco.

Producción biotecnológica de ácido láctico *Biotechnological lactic acid production*

*N. R. Rodríguez Durán;¹ M.G. Bustos Vázquez;¹
N.A. Rodríguez Durán;¹ J.A. del Ángel^{1*}*

Resumen

El ácido láctico es un producto industrial de gran importancia y con un amplio mercado en expansión debido a sus propiedades y aplicaciones diversas en industria alimentaria, farmacéutica y cosmética entre otras. Recientemente se ha utilizado para producir plásticos biodegradables. El ácido láctico presenta isomería óptica existiendo el D (-) ácido láctico y el L (+) ácido láctico, este último es el empleado en alimentos y en las industrias farmacéuticas. El ácido láctico tiene dos vías de producción, una es por síntesis química, dando como resultado una mezcla racémica, y otra es por fermentación microbiana, con la cual se tiene la ventaja de utilizar como sustrato materia renovable y obtener ácido láctico ópticamente puro (L o D). Se han utilizado diferentes sustratos para la producción biotecnológica de ácido láctico, tales como la glucosa, lactosa, almidón y celulosa con la desventaja de ser costosos y requerir la adición de fuentes nitrogenadas, por lo que es de especial interés el uso de materias primas alternativas, de bajo costo y ampliamente disponibles, para lo cual se han utilizado residuos agrícolas, forestales, industriales y desechos sólidos municipales.

¹ Unidad Académica Multidisciplinaria Mante-Centro - Universidad Autónoma de Tamaulipas, Blvd. Enrique Cárdenaz González 1201 pte., Col. Jardín, CP 89840, Ciudad Mante, Tamaulipas, tel. (831)-233-8100, *email: nrodrigu@uat.edu.mx

Abstract

The lactic acid is an industrial product of great importance and with a market in expansion due to its properties and several applications in food, pharmaceutical and cosmetic industry among others. Recently it has been used to produce biodegradable plastics. The lactic acid presents optical isomerism existing the D (-) lactic acid and the L (+) lactic acid, which is the one used in foods and the pharmaceutical industries. The lactic acid has two production, ways one is by chemical synthesis, giving as to result a racemic mixture, and another one is by microbial fermentation, which uses renewable matter as substrate to obtain optically pure lactic acid (L o D). Different substrates for the biotechnological lactic acid production have been used, such as glucose, lactose, starch and cellulose with the disadvantage of being expensive and requiring the addition of nitrogen sources, reason why it is of special interest the use of alternative raw materials, low cost and widely available, for which agricultural, forest, industrial and municipal solid remainders have been used.

Introducción

El ácido láctico es el ácido carboxílico que más ampliamente se produce en la naturaleza. El químico sueco Carl Scheele lo descubrió por primera vez en 1780 en la leche agria, pero fue producido comercialmente por Charles E. Avery en Littleton, Massachusetts, Estados Unidos en 1881 (Angenault 1999, Narayanan y otros, 2004a).

Importancia y aplicaciones del ácido láctico

El ácido láctico es un producto industrial importante y con un gran mercado en rápida expansión debido a sus propiedades atractivas. Es un ácido orgánico multifuncional, que se utiliza ampliamente como un acidulante, aromatizante, amortiguador de pH o conservante en los productos alimenticios, farmacéuticos, cosméticos, productos de cuero curtido y en la industria textil (Bustos y otros, 2005, Marques y otros, 2008). A diferencia de otros aditivos alimentarios ácidos el ácido láctico tiene un suave sabor ácido. Es no volátil, inodoro y es clasificado como GRAS (generally recognized as safe) por la FDA en Estados Unidos (Bustos y otros, 2007). En la industria química puede ser usado para producir ésteres de lactato de propilenglicol, óxido de propileno, ácido acrílico, 2,3-pentadieno, acidacetaldehído, ácido propanoico,

entre otras (Dumbrepatil y otros, 2008). Su producción está atrayendo una gran cantidad de investigación y desarrollo (Zhan Ying Zhang y otros, 2007).

También ha recibido una gran atención como materia prima para la elaboración del ácido poli-láctico (PLA), un polímero biodegradable usado como plástico biodegradable amigable con el ambiente. Es eficaz para reducir la emisión de gases de CO₂ y para ahorrar recursos fósiles. El ácido poli-láctico puede ser un buen sustituto para el plástico sintético derivado del petróleo en la elaboración de bolsas para basura, empaques para alimentos, e incluso partes de automóviles y computadoras (Narayanan y otros, 2004 a; Patil y otros, 2006; Lei Yu y otros, 2008; Dumbrepatil y otros, 2008; Yuwonoy Kokugan, 2008). El PLA también cuenta con aplicaciones en el campo de la medicina (Serna Cock y Rodríguez, 2007). Debido a la presencia de los grupos carboxilo e hidroxilo, el ácido láctico es altamente reactivo, puede sufrir una variedad de conversiones químicas a sustancias potencialmente útiles, como óxido de propileno, propileno-glicol, ácido acrílico, 2,3-pentanedione y ésteres de lactato (Patil y otros, 2006). La posibilidad de utilizarlo como materia prima en la producción de plásticos biodegradables, ha hecho más valioso al ácido láctico. La producción y uso de los plásticos biodegradables, sin embargo, no se ha extendido mucho debido a su alto costo en relación con los derivados del petróleo (Min-Tian Gao y otros, 2008).

El mercado mundial de ácido láctico está creciendo cada año. El nivel de producción se estimó en alrededor de 150 millones de libras por año y el crecimiento en todo el mundo se cree, por algunos observadores, a 12-15% al año (Romaní y otros, 2008).

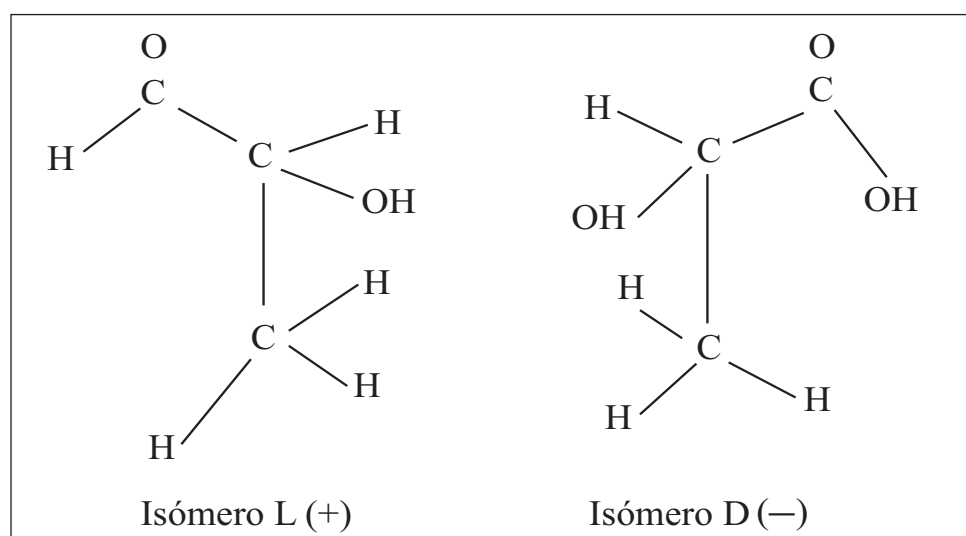
Estructura química del ácido láctico

El ácido láctico o 2-hidroxipropiónico (CH₃CHOHCOOH) es un ácido orgánico de tres carbonos: un átomo de carbono terminal es parte de un grupo ácido o carboxilo, el otro átomo de carbono terminal es parte de un grupo metilo o de hidrocarburo, y el átomo de carbono central tiene un grupo alcohol (Narayanan y otros, 2004a).

El ácido láctico existe naturalmente en dos isómeros ópticos: D (-)-ácido láctico y L (+)-ácido láctico (figura 1). Dado que niveles elevados del D-isómero son perjudiciales para los seres humanos, el L (+)-ácido láctico es el isómero de los alimentos y relacionadas con las industrias farmacéuticas, (Morrison y Boyd, 1998; Zhan Ying Zhang y otros, 2007).

El ácido láctico es soluble en agua y disolventes orgánicos miscibles con agua, pero insoluble en otros disolventes orgánicos. Presenta baja volatilidad.

Figura 1. Estructura químicas de los isómeros del ácido láctico



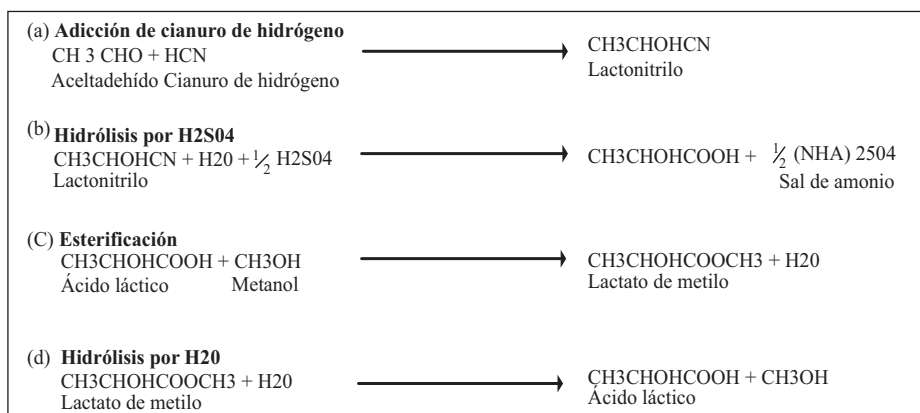
Fuente: elaboración propia.

Métodos de obtención

El ácido láctico se produce comercialmente por síntesis química o por fermentación microbiana. Actualmente, 90% del total del ácido láctico que se producen anualmente en el mundo está fabricado por fermentación y el resto es producido sintéticamente por hidrólisis de lactonitrilo (Parajó y otros, 1996; Patil y otros, 2006; Marques y otros, 2008).

El proceso comercial de síntesis química se basa en lactonitrilo (figura 2). Al acetaldehído se le agrega cianuro de hidrógeno en presencia de una base para producir lactonitrilo. Esta reacción ocurre en fase líquida a altas presiones. El lactonitrilo crudo se recupera y se purifica por destilación. A continuación se hidroliza a ácido láctico, ya sea por HCl concentrado o por H_2SO_4 para producir la correspondiente sal de amonio y ácido láctico. El ácido láctico se esterifica con metanol para la producción de lactato de metilo, que se separa y se purifica por destilación y es hidrolizado por agua para producir ácido láctico y el metanol, que se recicla (Narayanan y otros, 2004a).

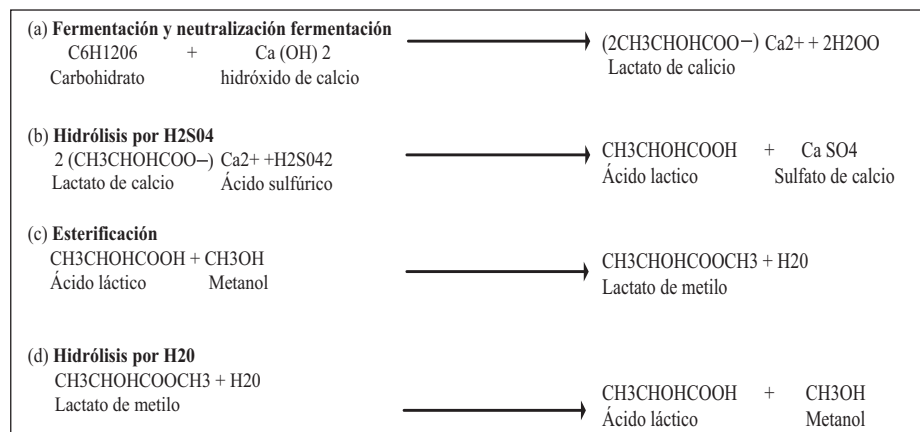
Figura 2. Reacciones en la síntesis química del ácido láctico



Fuente: Narayanan y otros, 2004a.

La síntesis química del ácido láctico siempre resulta en una mezcla racémica de ácido láctico, lo cual es una desventaja importante (Patil y otros, 2006, Zhan Ying Zhang y otros, 2007). Dos empresas: Musashino, Japón y Sterling Chemicals, Inc., Estados Unidos están utilizando esta tecnología (Narayanan y otros, 2004a).

Figura 3. Reacciones en la recuperación ácido láctico obtenido por fermentación



Fuente: Narayanan y otros, 2004a.

Otras posibles vías se basan en la degradación catalítica de azúcares, la oxidación de propileno glicol, la reacción de acetaldehído, monóxido de carbono y agua a altas temperaturas y presiones, la hidrólisis de ácido cloropropionico y la fermentación de hidratos de carbono (figura 3, Narayanan y otros, 2004a).

La producción fermentativa de ácido láctico ofrece las ventajas de utilizar carbohidratos renovables y la producción de ácido láctico ópticamente puro (L- o D-) dependiendo de la cepa seleccionada. Las propiedades físicas del ácido poli-láctico dependen de la composición isomérica del ácido láctico (Narayanan y otros, 2004a; Patil y otros, 2006; Zhan Ying Zhang y otros, 2007).

El caldo que contiene lactato de calcio se filtra para eliminar las células, es tratado con carbono, se evapora y se acidulada con ácido sulfúrico para obtener ácido láctico y sulfato de calcio. El sulfato de calcio insoluble se elimina por filtración. El ácido láctico se obtiene de la hidrólisis, esterificación, destilación e hidrólisis (Narayanan y otros, 2004a).

Microorganismos productores de ácido láctico

Se han utilizado hongos y bacterias para producir ácido láctico por vía fermentativa. Las bacterias lácticas se encuentran entre los microorganismos más estudiados. Los microorganismos productores de ácido láctico pueden utilizar diversas fuentes de carbono y de medios de cultivo (tabla 1). Las características deseables de los microorganismos industriales son su capacidad de fermentar rápida y completamente materias primas baratas, requiriendo una mínima cantidad de sustancias nitrogenadas, la obtención de rendimientos elevados del isómero de ácido láctico preferido, en condiciones de bajo pH y alta temperatura, produciendo bajas cantidades de biomasa y una insignificante cantidad de otros subproductos (Narayanan y otros, 2004a).

A pesar de las ventajas, las tecnologías de fermentación deben ser competitivas con productos de síntesis química para llevar a cabo el procedimiento biotecnológico a escala industrial. La viabilidad económica de los procesos de la fermentación de la biomasa está limitada por el costo del medio de fermentación, que puede representar casi 30% del total de los costos de producción (Marques y otros, 2008). Investigaciones reportadas sobre la bioquímica y el metabolismo de las bacterias del ácido láctico generalmente describen experimentos que toman en medios enriquecidos tal como el caldo Man-Rogosa-Sharpe (MRS) o medios sintéticos con teniendo altas concentraciones de carbono y fuentes de energía, para periodos cortos de incubación (Malik y otros, 2009).

Tabla 1. Microorganismos, fuentes de carbono y tipos de medios empleados en la producción de ácido láctico

<i>Microorganismo</i>	<i>Fuente de carbono</i>	<i>Medio</i>
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Glucosa	Sintético
		Hidrolizados de almidón
		Residuo celulósico
	Fructosa	Sintético
	Sacarosa	Sintético
		Melazas
	Lactosa	Sintético
		Sueros lácteos
		Leche de vaca y camello
	Polisacáridos	Hidrolizados de harina de trigo
		Fibra de soja y alfalfa
		Biomasa lignocelulósica
Maltosa	Sintético	
	Hidrolizado de almidón	
<i>Lactobacillus casei</i>	Glucosa	Sintético
	Lactosa	Hidrolizados de almidón
		Sueros lácteos
<i>Lactobacillus amylophilus</i>	Glucosa	Sintético
		Hidrolizados de almidón
		Salvado de trigo
	Almidón	Extractos maíz
<i>Lactobacillus lactis</i>	Glucosa	Hidrolizados de almidón
	Sacarosa	Melazas
	Glucosa, xilosa y lactosa	Sintético
<i>Lactococcus lactis</i>	Glucosa	Sintético
	Lactosa	Sintético
		Sueros lácteos
	Sacarosa	Jarabe de piña
<i>Lactococcus lactis</i>	Maltosa	Hidrolizados de almidón
	Xilosa	Sintético

Continúa...

...continuación

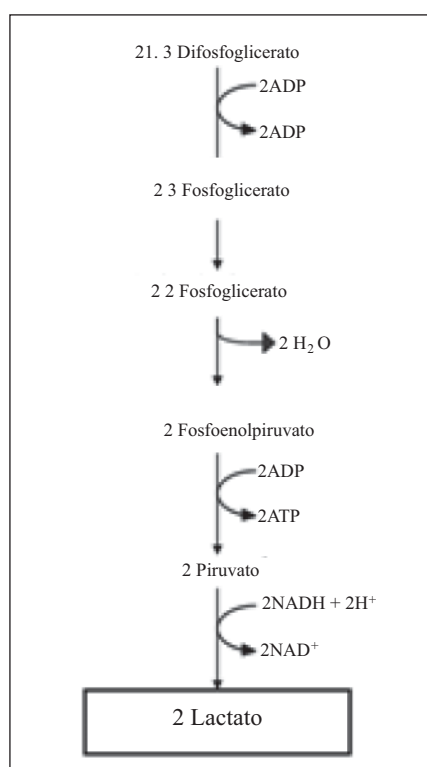
		Hidrolizados de harina de trigo
		Sueros lácteos
<i>Lactobacillus coryniformis</i>	Glucosa	Sintético
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Glucosa	Hidrolizados de almidón
		Sueros lácteos
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Glucosa	Hidrolizados de almidón
	Glucógeno	Agua del procesado de mejillón

Fuente: Bustos y otros, 2005.

Para la producción biotecnológica de ácido láctico se han utilizado diferentes sustratos puros tales como glucosa, lactosa, almidón y celulosa, sin embargo estos sustratos son económicamente desfavorables, no sólo porque los sustratos puros son costosos y requieren la adición de fuentes nitrogenadas complejas para producir ácido láctico en un tiempo razonable sino porque también se requiere de un pretratamiento de los polisacáridos naturales para su posible fermentación. (Serna Cock y Rodríguez, 2007; Romá y otros, 2008).

Varios autores han reportado la producción biotecnológica de ácido láctico a partir de materiales lignocelulósicos, particularmente utilizando bacterias *Lactobacillus*. Se obtiene un producto más puro cuando son fermentados únicamente azúcares monoméricos, porque se requieren pocas etapas de purificación, pero esto no es económicamente favorable, porque los azúcares puros son caros y el ácido láctico es un producto relativamente barato (Bustos y otros, 2004d). El uso de materias primas alternativas, de bajo costo y ampliamente disponibles, se convierte, por tanto, de especial interés. Por esta razón, se han utilizado desechos de la agricultura, forestales, de la industria o desechos sólidos municipales (Marques y otros, 2008). El suero, un producto de desecho de la producción de queso, es el sustrato más común para la producción de ácido láctico. Este ha sido utilizado con *Lb. delbrueckii subsp bulgaricus*, *Lb. helveticus* y *Lb. casei*. La melaza de caña de azúcar, ha sido utilizado con *Lb. delbrueckii* y *Lactobacillus salivarius* (Bustos y otros, 2004d; Narayanan y otros, 2004a), almidón de maíz con *Rhizopus oryzae*, fibra de alfalfa con *Lb. plantarum* y *Lb. delbrueckii*, desechos sólidos de pulpa de molino con *Lb. delbrueckii* (Moldes y otros, 1998), fibra de soya con *Lb. plantarum* y *Lb. delbrueckii*, paja de trigo con *Lb. plantarum* y *Lb. delbrueckii* y deshecho de papel, un residuo urbano, con *Lb. delbrueckii*. *Lb. pentosus* ha sido utilizado con desechos de lías de vinificación en lote alimentado (feedstock) (Bustos y otros, 2004b, c, d). Se ha empleado salvado de arroz fermentado por *Lb rhamnosus* (Min-Tian Gao y otros, 2008).

Figura 4. Etapas bioquímicas de la fermentación homoláctica



Fuente: elaboración propia.

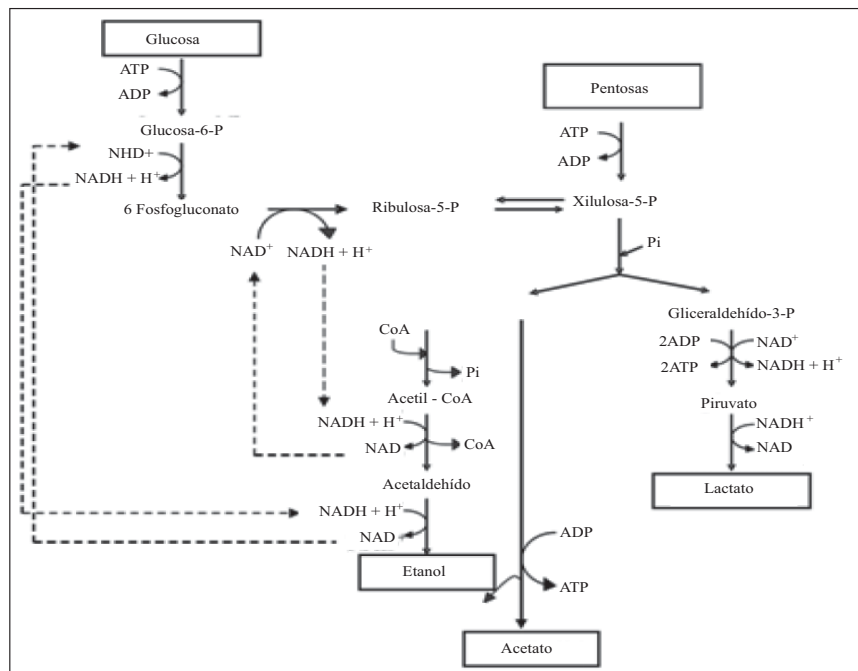
Las bacterias lácticas son capaces de generar ácido láctico por degradación de azúcares homo y hetero fermentativa. Durante el crecimiento anaeróbico de las bacterias lácticas obligatoriamente homo fermentativas (figura 4) en presencia de un exceso de sustrato, las fuentes de energía tales como la glucosa son convertidas a piruvato por la vía de Embden Meyerhoff Parnas (EMP) y el piruvato es en un futuro metabolizado a lactato. Bajo condiciones óptimas el *Lactobacillus* puede convertir diferentes fuentes de carbono, principalmente hexosas, a ácido láctico con rendimientos del 100% así (Bustos y otros, 2004) usando *Lactobacillus pentosus* CECT-4023T (ATCC-8041) reportaron 84.7 g/L de ácido láctico utilizando 91.1 g/L de glucosa comercial, siguiendo exclusivamente la ruta de EMP, no siendo detectado ácido acético o etanol. Durante la ruta heterofermentativa (figura 5), la degradación de azúcares es metabolizada por la vía de *phosphoketolase*, la cual resulta en cantidades equimoleculares de

CO₂, y lactato o etanol. Las bacterias heterolácticas pueden ser separadas en especies obligatoriamente heterofermentativas, en las cuales ambas hexosas y pentosas son fermentadas por la ruta de las pentosas fosfato, y en organismos heterofermentativos facultativos, los cuales degradan hexosas por la ruta EMP y pentosas por la ruta de las pentosas fosfato (Bustos y otros, 2005).

Tecnologías de fermentación

Los sistemas discontinuos de fermentación con células libres que utilizan un único microorganismo permiten alcanzar productividades razonables en la fermentación láctica (en el intervalo 2-5 g/L·h), por lo que se han utilizado frecuentemente. Alternativamente, los sistemas continuos de mezcla completa con células libres permiten mejorar las productividades, habiéndose publicado datos de éstas en el intervalo 6- 8.9 g/L·h. (Parajó 1996, Bustos 2005).

Figura 5. Etapas bioquímicas de la fermentación heteroláctica



Fuente: elaboración propia.

La retención de células viables en el fermentador por medio de atrapamiento en el, permite operar en continuo con reducidos volúmenes de reactor (Parajó, 1996; Bustos, 2005). La utilización de tecnologías de membrana en la fermentación láctica puede perseguir la retención de células en el reactor, la recuperación del producto o ambos fines simultáneamente. En relación con la retención de células, el procesamiento por ultrafiltración (UF) de los efluentes procedentes de fermentadores de mezcla completa con células libres permite separar las células del medio fermentativo y devolverlas al medio de reacción. (Parajó, 1996; Bustos, 2005; Gonzalez y otros, 2007).

Referencias

- Angenault, J. (1999), *Diccionario enciclopédico de química*, Editorial C. E. C. S. A., pág. 395.
- Bustos, G. (2005), “Aprovechamiento de residuos agroindustriales para la obtención de medios nutritivos económicos y de ácido láctico”, *Tesis doctoral*, España, Universidad de Vigo, Ourense.
- Bustos, G.; N. de la Torre; M. Martínez; A. Cásares y Y. Domarco (2004a), “Evaluación de azúcares hemicelulósicos de las podas de sarmiento y lías de vinificación como medio nutritivo para la producción de ácido láctico por *LACTOBACILLUS PENTOSUS*”, *Cienc. Tecnol. Aliment.*, vol. 4, núm 4, pp. 283-291.
- Bustos, G.; N. de la Torre; A.B. Moldes; J.M. Cruz and J.M. Dominguez (2007), “Revalorization of Hemicellulosic Trimming Vine Shoots Hydrolyzates Trough Continuous Production of Lactic Acid and Biosurfactantes by *L. pentosus*”, *Journal of Food Engineering*, 78, pp. 405-412.
- Bustos, G.; A.B. Moldes; J.M. Cruz and J.M. Dominguez (2004b), “Evaluation of Vinification Lees as a General Medium for *Lactobacillus* Strains”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, pp. 5233-5239.
- _____ (2004c), “Formulation of Low-Cost Ermentative Media for Lactic Acid Production with *Lactobacillus rhamnosus* Using Vinification Lees as Nutrients”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 5, pp. 801-808.
- _____ (2004d), “Production of Fermentable Media from Vine-Trimming Wastes and Bioconversion into Lactic Acid by *Lactobacillus pentosus*”, *J Sci Food Agric*, 84, pp. 2105-2112.
- _____ (2005), “Influence of the Metabolism Pathway on Lactic Acid Production from Hemicellulosic Trimming Vine Shoots Hydrolyzates using *Lactobacillus pentosus*”, *Biotechnology Progress*.

- Dumbrepatil, A.; M. Adsul; S. Chaudhari; J. Khire and D. Gokhale (2008), "Utilization of Molasses Sugar for Lactic Acid Production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* Mutant Uc-3 in Batch Fermentation", *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 74, núm. 1, pp. 333-335.
- Gonzalez, M. I.; S. Alvarez; F. Riera and R. Alvarez (2007), "Economic Evaluation of an Integrated Process for Lactic Acid Production from Ultrafiltered Whey", *Journal of Food Engineering*, 80, pp. 553-561.
- Hofvendahl, K and B. Hahn Hagerdal (2000), "Factors Affectin the Fermentative Lactic Acid Production from Renewable Resources", *Enzyme and Microbial Technology*, 26, pp. 87-107.
- Kobayashi, T.; M. Kajiwara; M. Wahyuni; N. Hamada Sato; C. Imada and E. Watanabe (2004), "Effect of Culture Conditions on Lactic Acid Production of Tetragenococcus Species", *Journal of Applied Microbiology*, 96, pp. 1215-1221.
- Lei Yu, Ting Lei, Xiaodong Ren, Xiaolin Pei and Yan Feng (2008), "Response Surface Optimization of L-(+)-Lactic Acid Production Using Corn Steep Liquor as an Alternative Nitrogen Source by *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1466", *Biochemical Engineering Journal*, 39, pp. 496-502.
- Malik A. Hussain; Duncan A. Rouch and Margaret L. Britz (2009), "Biochemistry of Non-Starter Lactic Acid Bacteria Isolate *Lactobacillus casei* GCRL163: Production of Metabolites by Stationary-Phase Cultures", *International Dairy Journal*, vol. 19, ISSN 0958-6946, pp. 12-21.
- Marques, S.; J. Santos; F. Girio and J.C. Roseiro (2008), "Lactic Acid Production from Recycled Paper Sludge by Simultaneous Saccharification and Fermentation", *Biochemical Engineering Journal*, 41, pp. 210-216.
- Min-Tian Gao, Mio Kaneko, Makoto Hirata, Eiichi Toorisaka and Tadashi Hano (2008), "Utilization of Rice Bran as Nutrient Ource for Fermentative Lactic Acid Production", *Bioresource Technology*, 99, pp. 3659-3664.
- Moldes, A.B.; J.L. Alonso y J.C. Parajó (1998), "Bioconversión de Madera Pretratada por Hidrólisis y Fermentación Simultaneas: Obtención de Ácido Láctico en Sistemas con Alimentación de Sustrato en Varias Etapas", *Afinidad LV*, 478, pp. 407-412.
- Morrison, R.T. y R.N. Boyd (1998), *Química Orgánica*, 5a. ed., Pearson educación, p. 1278.
- Narayanan, N.; P.K. Roychoudhury and A. Srivastava (2004a), "Isolation of Adh Mutant of *Lactobacillus rhamnosus* for Production of L(+) Lactic Acid", *Electronic Journal of Biotechnology*, vol. 7, núm. 1, ISSN: 0717-3458.

- Narayanan, N.; P.K. Roychoudhury and A. Srivastava (2004b), “L (+) Lactic Acid Fermentation and Its Product Polymerization”, *Electronic Journal of Biotechnology*, ISSN: 0717-3458, vol.7, núm 2.
- Parajó, J.C.; J.L. Alonso; V. Santos y A.B. Moldes (1996), “Producción Biotecnológica de Ácido Láctico: Cinética y Tecnologías de Fermentación”, *Alimentaria*, 267, pp. 121-129.
- Patil, S.S.; S.R. Kadam; S.S. Patil; K.B. Bastawde; J.M. Khire and D.V. Gokhale (2006), “Production of Lactic Acid and Fructose from Media with Cane Sugar using Mutant of *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2365”, *Letters in Applied Microbiology*, 43, pp. 53-57, ISSN 0266-8254.
- Romaní, A; R. Yañez; G. Garrote and J.L. Alonso (2008), “SSF Production of Lactic Acid from Cellulosic Biosludges”, *Bioresource Technology*, 99, pp. 4247-4254.
- Serna Cock, L. and A. Rodríguez (2006), “Lactic Acid Production by a Strain of *Lactococcus lactis* Subs Lactis Isolated from Sugar Cane Plants”, *Electronic Journal of Biotechnology*, vol. 9, núm. 1.
- Serna Cock, L. y A. Rodríguez (2007), “Producción económica de ácido láctico utilizando residuos de cosecha y jugos de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.)”, *Agricultura técnica*, 67(1), pp. 29-38.
- Yuwono, S.D. y T. Kokugan (2008), “Study of the Effects of Temperature and pH on Lactic Acid Production from Fresh Cassava Roots in Tofu Liquid Waste by *Streptococcus bovis*”, *Biochemical Engineering Journal*, 40, pp. 175-183.
- Zhan Ying Zhang, Bo Jina and Joan M. Kelly (2007), “Production of Lactic Acid from Renewable Materials by *Rhizopus Fungi*”, *Biochemical Engineering Journal*, 35, pp. 251-263.

**Evaluación de un proceso de inversión
en melaza de caña de azúcar para la obtención
de ácido láctico utilizando
*Lactobacillus rhamnosus***
*Evaluation process of inversion
in sugar cane molasses
for obtaining lactic acid
using *Lactobacillus rhamnosus**

*E. Vizcaino Guerrero,¹ G. Bustos Vázquez,¹
N.A. Rodríguez Durán,¹ N.R. Rodríguez Durán¹*

Resumen

Aproximadamente 80% del ácido láctico producido en el mundo se emplea en la campo alimentario como acidulante y conservante. Su producción industrial puede abordarse por vía química o por vía fermentativa. La melaza contiene gran cantidad de componentes disueltos entre los que se encuentran, en su mayor parte, azúcares (sacarosa, glucosa y fructuosa), cenizas, etcétera. Para la realización de este trabajo se utilizó *Lactobacillus rhamnosus* usando como fuente de carbono la melaza de caña de azúcar, mediante un proceso de inversión enzimática a las 0 y 48 h de incubación, con una concentración final de miel de 120 g/L. Los valores más altos alcanzados de ácido láctico fueron con soluciones de melaza con inversión después de 48 h con P_{max} de 67.43 ± 6.91 y Q_p de 0.7 después de 96 h de incubación.

¹ Unidad Académica Multidisciplinaria Mante, Universidad Autónoma de Tamaulipas, blvd. Enrique Cárdenas González, núm. 1201, col. Jardín, c.p. 89840, Ciudad Mante, Tamaulipas, México, tel y fax: (831)-233-8100, correo electrónico: kika-321@hotmail.com

Abstract

Approximately 80% of lactic acid produced worldwide is used in the food industry as acidulant and preservative. Its industrial production can be addressed by chemical or by fermentation. Molasses contains lots of dissolved components among which are mostly sugar (sucrose, glucose and fructose), ashes. In this work using *Lactobacillus rhamnosus* was grown using sugarcane molasses as substrate through a process of enzymatic inversion at 0 and 48 hours of incubation, with a final concentration of molasses 120 g / L. Higher values of lactic acid were achieved with solutions of molasses with inversion after 48 hours 67.43 ± 6.91 Pmax and QP of 0.7 after 96 hours of incubation.

Introducción

En México una de las principales actividades económicas, generadora de empleo, es la agricultura, entre los principales cultivos se encuentran, los granos, especialmente maíz, las fibras textiles como el algodón, las plantas oleaginosas, forrajeras, alimenticias y frutales, ocupando el sexto lugar con 3.8% a nivel mundial en la producción de caña de azúcar. Los residuos y subproductos de la industria azucarera son relativamente contaminantes, al mismo tiempo que contienen una gran cantidad de nutrientes orgánicos e inorgánicos que permiten su reciclaje en la elaboración de otros productos como son alimento para ganado, la producción industrial de papel, cartón, etc., estos residuos pueden ser aprovechados mediante su transformación biotecnológica proporcionando un valor agregado al cultivo y representando una alternativa para la obtención de aditivos alimenticios de gran importancia comercial. Uno de los principales residuos del proceso de la caña de azúcar, es la melaza o miel final o residual que es el subproducto de la refinación del azúcar crudo y que es ampliamente utilizada como materia prima para las fermentaciones tales como la producción del etanol y ácido láctico, debido a su abundancia y bajo precio comparado con otras materias primas disponibles. Las fuentes del carbono para el proceso de fermentación del ácido láctico pueden ser la glucosa, la maltosa, la sucrosa o materias primas como melaza y suero de queso o algunos subproductos agrícolas (Bulut y otros, 2004).

El ácido láctico, ácido 2-hidroxipropanoico, tienen muchas aplicaciones en la industria alimentaria, química y farmacéutica. Más del 50% del ácido láctico producido en el mundo se emplea en la industria alimentaria como acidulante y conservante de

alimentos (Salminen y otros; Von Wright y otros, 1993). Las industrias químicas lo utilizan como solubilizador y como agente controlador de pH. El ácido láctico es un polímero biodegradable con interesantes usos en la industria y en la medicina; se considera que esta es la principal aplicación del ácido y la causa por la cual ha aumentado considerablemente su demanda.

En esta investigación se estudió el aprovechamiento biotecnológico de la melaza o miel final para la producción de ácido láctico, mediante un proceso de inversión, determinando las condiciones adecuadas de fermentación que permitan un alto rendimiento, utilizando el *Lactobacillus rhamnosus*.

Materiales y métodos

Materia prima

La melaza fue proporcionada por el ingenio Aarón Sáenz Garza de Cd. Mante, Tamaulipas de la zafra 2008-2009, almacenada a 4°C, hasta su uso.

Enzima: La enzima invertasa 4x fue cedida amablemente por Enzimas y Productos Químicos S.A de C.V., se almacenó a temperatura ambiente.

Microorganismo: El microorganismo utilizado fue *Lactobacillus rhamnosus*, NRRL B-442 proporcionado por National Center for Agricultural Research Service Culture Collection (Peoria Illinois, Estados Unidos).

Humedad y cenizas: El contenido de humedad y cenizas se realizó utilizando crisoles de porcelana con 2 y 1g de muestra en estufa (105°C por 72 h) y mufla (a 550°C por 5h) respectivamente.

Determinación de sacarosa, glucosa y fructosa: La determinación de la composición de azúcares simples (sacarosa, glucosa y fructosa) de la melaza fue analizada por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficacia (CLAE), con diluciones 1:10 y filtradas por membranas de poro de 0.45 micras de diámetro.

Proceso de inversión de sacarosa: La literatura reporta que *L. rhamnosus* no metaboliza eficientemente la sacarosa para la producción de ácido láctico (Bustos y otros, 2008), debido a esto se decidió estudiar diversas condiciones de inversión enzimática con el fin de aprovechar eficientemente la sacarosa en procesos de fermentación. Las condiciones experimentadas fueron 0, 1 y 2% de enzima invertasa 4X; con un tiempo de contacto de 20, 40 y 60 minutos; pH 4.5 y 6.2.

Preparación del inóculo: *Lactobacillus rhamnosus* fue crecido en caldo MRS. Las condiciones de incubación fueron 41.5°C durante 24 horas. La concentración del

inóculo se determinó a partir de la recta de calibrado que relaciona valores de absorbancia medidos espectrofotométricamente a 600 nm.

Preparación de los medios de cultivo: Para las fermentaciones lácticas se prepararon medios de cultivo en los que se utilizaron como fuente de carbono azúcares sintéticos o melaza. Los medios consistieron en soluciones en frascos Erlenmeyer de 250 mL. Las soluciones estuvieron compuestas por 68 g de sacarosa/L, 34 g de glucosa/L, 17 g de fructosa/L, 51 g de MRS/L y 100g de CaCO_3 /L y las soluciones de melaza por 120 g de melaza/L, 51 g de MRS/L y 100 g de CaCO_3 /L. Los medios de cultivo se esterilizaron cada uno por separado, para evitar reacciones de *Maillard*.

Fermentaciones aplicando las mejores condiciones del proceso de inversión: Para estimar el efecto de la inversión enzimática sobre la producción de ácido láctico, se llevaron a cabo fermentaciones en las que se aplicaron las condiciones óptimas determinadas en un estudio anterior. La adición de la invertasa se probó al inicio de la fermentación y a las 48 horas de incubación, este último tiempo debido a que se ha reportado que en fermentaciones de melaza para la producción de ácido láctico utilizando *L. rhamnosus* la sacarosa queda como sustrato residual. Los seis tratamientos consistieron en tres fermentaciones en solución de azúcares sintéticos compuesta por 68 g de sacarosa/L, 34 g de glucosa/L, 17 g de fructosa/L, 51 g de MRS/L y 100 g de CaCO_3 /L y tres en solución de 120 g de melaza/L, 51 g de MRS/L y 100 g de CaCO_3 /L, en las que los tratamientos 1 y 4 fueron sin enzima, 2 y 5 con inversión desde un inicio 3 y 6 con inversión a las 48 horas de incubación. En cada una de las fermentaciones se adicionó 10 mL de inóculo, con concentraciones de biomasa aproximadas de 2.8 g/L, todo ello bajo campana en condiciones asépticas. Los experimentos fueron llevados a cabo en agitadores orbitales a 150 rpm y a 41.5 °C. Una vez iniciadas las fermentaciones se tomó 1 ml de muestra desde las 0 hasta las 120 horas cada 24 horas. El tratamiento de las muestras consistió en vaciar 1 ml de medio fermentado en tubos para centrifuga marca Ependorf numerados. Se centrifugaron durante tres minutos a 3 mil rpm. El líquido sobrenadante se vertió en tubos de ensayo y sobre balanza se diluyó con agua destilada con un factor de dilución 1:10. La muestra diluida se filtró mediante membranas con poro de 0.4 μm (Watman) y se pasó a viales con capacidad de 1.5 ml para el análisis de glucosa, fructosa, sacarosa ácido láctico, ácido acético y etanol por cromatografía de líquidos de alta eficacia (CLAE).

Resultados y discusión

El porcentaje de sólidos fue 90.29, la humedad de 9.71 y el porcentaje de cenizas determinado a partir de fracción sólida fue de 7.80. El contenido de azúcares totales

fue de 40.5 g/L que es menor que los recogidos por Bustos y otros, 2008, para la melaza de caña de azúcar, la cual fue utilizada en la producción de ácido láctico por *Lactobacillus rhamnosus* (microorganismo utilizado anteriormente en fermentaciones lácticas en las que los sustratos son puros como la glucosa (Goncalves y otros, 1997; Kwon y otros, 2000; Rivas y otros, 2004; Min tian y otros, 2005).

En los cuadros 1 y 2 se observan las condiciones experimentadas para determinar las condiciones óptimas de inversión enzimática, las cuales fueron el tiempo de contacto (20, 40 y 60 minutos), la concentración de enzima (0, 1 y 2%) y el pH (4.5 y 6.2), la inversión se realizó tanto en soluciones de sacarosa sintéticos como en soluciones de melaza, ya que aunque la melaza es el sustrato que se desea utilizar en la fermentación láctica este no sólo está compuesto por sacarosa debido a su origen (es un subproducto ya sea de la fabricación o de la refinación del azúcar crudo; es un líquido denso y viscoso que se separa de la masa cocida final de bajo grado a partir del que no es posible cristalizar azúcar adicional mediante los métodos corrientes), por lo que puede contener sustancias que interfieren con la actividad enzimática, con la inversión en soluciones de sacarosa pura se puede hacer evidente dicha interferencia.

El pH de 4.5 es el recomendado por el fabricante y el de 6.2 el óptimo para la fermentación láctica. Las condiciones óptimas para la inversión de sacarosa, se determinaron bajo las mismas condiciones anteriores, las cuales fueron a pH 6.2, con 1% de invertasa 4x durante 20 minutos, esto se decidió de acuerdo a lo cuantificado en cada uno de los procedimientos experimentados y a los resultados obtenidos mediante el análisis de varianza realizado. En las siguientes figuras se muestran las cinéticas de fermentaciones utilizando azúcares sintéticos y melaza de caña de azúcar respectivamente como fuente de carbono.

La figura 1, muestran las cinéticas de producción y consumo de sustrato por *Lactobacillus rhamnosus* en medios preparados con azúcares sintéticos (glucosa, fructosa, sacarosa) como fuente de carbono a pH 6.2, 150 rpm y 41.5°C. En la cinética a) sin adición de enzima, se muestra donde la sacarosa no es completamente consumida, b) con adición de 1% de enzima antes de la inoculación se observa la cinética donde la sacarosa llega a una concentración de 0 en las primeras 24 horas; y en la c) con adición de 1% de enzima a las 48 horas de incubación se aprecia la cinética donde hay un descenso de la concentración de sacarosa entre las 48 y 72 horas, así como un aumento en la concentración de glucosa, fructosa y ácido láctico en ese mismo periodo de incubación. Podemos apreciar que en los tres tratamientos hay una concentración inicial de ácido acético y la máxima producción de ácido láctico fue alcanzada a las 96 o 120 horas.

Cuadro 1. Condiciones utilizadas en la inversión de sacarosa sintética y concentraciones obtenidas de sacarosa, glucosa y fructosa

<i>Tiempo de contacto (mins)</i>	<i>Conc. de enzima (%)</i>	<i>pH</i>	<i>Sacarosa (g/l)</i>	<i>Glucosa (g/l)</i>	<i>Fructosa (g/l)</i>
20	0	4.5	36.8 ± 3.0	13.7 ± 1.2	11.3 ± 1.0
40	0	4.5	36.8 ± 3.0	13.7 ± 1.2	11.3 ± 1.0
60	0	4.5	36.8 ± 3.0	13.7 ± 1.2	11.3 ± 1.0
20	1	4.5	0.0 ± 0.0	30.0 ± 0.8	34.1 ± 0.9
40	1	4.5	0.0 ± 0.0	31.0 ± 0.8	35.2 ± 0.9
60	1	4.5	0.0 ± 0.0	30.9 ± 2.1	35.2 ± 2.3
20	2	4.5	0.0 ± 0.0	20.2 ± 0.1	29.1 ± 0.1
40	2	4.5	0.0 ± 0.0	26.2 ± 5.6	32.3 ± 3.4
60	2	4.5	0.0 ± 0.0	29.8 ± 1.3	35.0 ± 0.8
20	0	6.2	45.1 ± 1.9	12.6 ± 0.5	11.8 ± 0.7
40	0	6.2	43.7 ± 0.0	9.8 ± 1.3	12.4 ± 1.1
60	0	6.2	42.7 ± 1.9	21.2 ± 1.0	34.4 ± 1.1
20	1	6.2	0.0 ± 0.0	16.1 ± 0.6	30.4 ± 1.2
40	1	6.2	0.0 ± 0.0	14.8 ± 0.7	29.8 ± 2.4
60	1	6.2	0.0 ± 0.0	15.5 ± 0.2	33.2 ± 0.5
20	2	6.2	0.0 ± 0.0	21.2 ± 1.8	34.4 ± 0.5
40	2	6.2	0.0 ± 0.0	15.5 ± 0.5	33.2 ± 2.8
60	2	6.2	0.0 ± 0.0	23.2 ± 0.0	36.1 ± 0.0

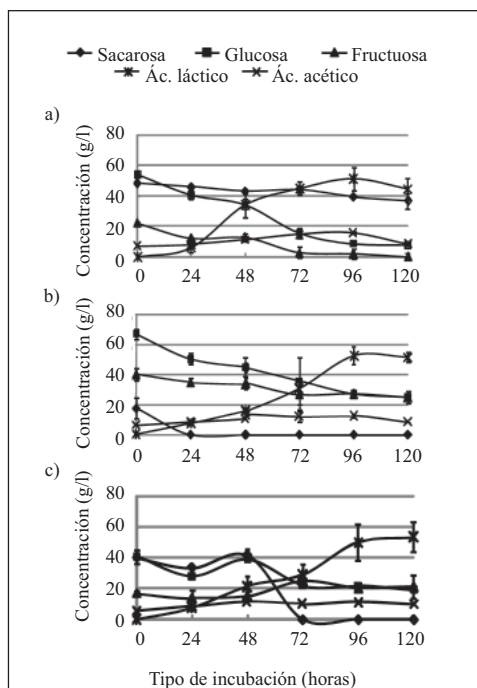
Fuente: elaboración propia.

Cuadro 2. Condiciones utilizadas en la inversión de sacarosa en soluciones de melaza y concentraciones obtenidas de sacarosa, glucosa y fructuosa

<i>Tiempo de contacto (mins)</i>	<i>Conc. de enzima (%)</i>	<i>pH</i>	<i>Sacarosa (g/l)</i>	<i>Glucosa (g/l)</i>	<i>Fructosa (g/l)</i>
20	0	4.5	48.8 ± 1.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
40	0	4.5	52.5 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
60	0	4.5	52.5 ± 0.4	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
20	1	4.5	0.0 ± 0.0	41.8 ± 0.7	51.3 ± 0.8
40	1	4.5	0.0 ± 0.0	42.9 ± 0.4	52.6 ± 0.5
60	1	4.5	0.0 ± 0.0	43.2 ± 0.2	53.2 ± 0.3
20	2	4.5	0.0 ± 0.0	34.9 ± 2.7	49.9 ± 3.0
40	2	4.5	0.0 ± 0.0	41.3 ± 0.5	51.9 ± 1.0
60	2	4.5	0.0 ± 0.0	41.1 ± 0.0	50.7 ± 0.1
20	0	6.2	95.4 ± 3.7	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
40	0	6.2	111.4 ± 5.3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
60	0	6.2	103.9 ± 0.4	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
20	1	6.2	0.0 ± 0.0	56.7 ± 1.3	57.9 ± 1.3
40	1	6.2	0.0 ± 0.0	64.3 ± 0.6	63.7 ± 0.5
60	1	6.2	0.0 ± 0.0	62.7 ± 2.5	62.3 ± 2.4
20	2	6.2	0.0 ± 0.0	42.4 ± 0.9	53.1 ± 1.3
40	2	6.2	0.0 ± 0.0	63.7 ± 0.9	63.6 ± 0.9
60	2	6.2	0.0 ± 0.0	67.6 ± 4.7	63.4 ± 0.9

Fuente: elaboración propia.

Figura 1. Cinéticas de producción y consumo de sustrato (azúcar sintéticos) por *Lactobacillus rhamnosus*



Fuente: elaboración propia.

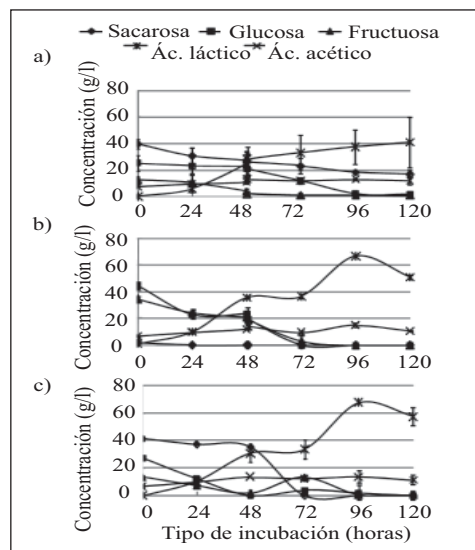
(a) sin adición de enzima, (b) con adición de 1% de enzima antes de la inoculación y (c) con adición de 1% de enzima a las 48 horas de incubación.

Los resultados observados en las cinéticas de las fermentaciones realizadas en soluciones de melaza siguieron la misma tendencia que las de las soluciones de azúcares sintéticos.

La figura 2 muestra las cinéticas de producción y consumo de sustrato por *Lactobacillus rhamnosus* en medios preparados con melaza como fuente de carbono a pH 6.2, 150 rpm y 41.5°C, la figura a) sin adición de enzima, se muestra donde la sacarosa no es completamente consumida; la cinética b) con adición de 1% de enzima antes de la inoculación se puede ver que la sacarosa ya no está presente en las primeras 48 horas; y en la cinética c) con adición de 1% de enzima a las 48 horas de incubación en la cual se puede apreciar que disminuye considerablemente la

concentración de sacarosa entre las 48 y 72 horas. Asimismo se observa un incremento en la concentración de glucosa, fructosa y ácido láctico. También, en estos tratamientos, el ácido acético está desde un inicio de la fermentación, por lo que se deduce que estaba presente en el inóculo utilizado, y la mayor concentración de ácido láctico se obtiene entre las 96 y 120 horas de fermentación.

Figura 2. Cinéticas de producción y consumo de sustrato por *Lactobacillus rhamnosus* con melaza de caña de azúcar a pH 6.2, 150 rpm y 41.5°C, (a) sin adición de enzima, (b) con adición de 1% de enzima antes de la inoculación y (c) con adición de 1% de enzima a las 48 horas de incubación



Fuente: elaboración propia.

Los resultados en P_{max} , $Y_{p/S}$ y Q_p para ácido láctico y ácido acético se muestran en el cuadro 3. Los cálculos fueron realizados a 96 o 120 horas de incubación, esto de acuerdo al tiempo en el que se obtuvo la mayor cantidad de ácido láctico en cada uno de los tratamientos. La fermentación con mayor P_{max} y Q_p en ácido láctico con valores de 67.43 ± 6.91 y 0.7, respectivamente fue en la solución de melaza con inversión a las 48 horas de incubación sin embargo los valores son muy cercanos a los obtenidos en solución de melaza pero con inversión desde un inicio de la fermentación. En general se puede observar que tanto en solución de azúcares sintéticos como en la de melaza los resultados de la fermentación fueron superiores cuando se utilizó melaza como sustrato.

Cuadro 3. Resultados de los seis tratamiento P_{max}, Y_{p/s} y Q_p para ácido láctico y ácido acético

Tratamiento	Ácido láctico			Ácido acético		
	P _{max}	Y _{p/s} (g/g)	Q _p (g/l*h)	P _{max}	Y _{p/s} (g/g)	Q _p (g/l*h)
1*	51.10 ± 6.75	0.68	0.53	15.32 ± 0.06	0.11	0.09
2*	52.82 ± 5.94	0.74	0.54	12.63 ± 1.25	0.08	0.06
3**	53.02 ± 9.83	0.92	0.44	9.01 ± 0.70	0.02	0.03
4**	40.88 ± 19.8	0.70	0.34	11.45 ± 2.29	0.07	0.04
5*	67.06 ± 1.72	0.81	0.69	14.89 ± 1.66	0.10	0.09
6*	67.43 ± 6.91	0.85	0.70	13.72 ± 3.34	0.09	0.07

Fuente: elaboración propia.

Conclusiones

Se determinaron los porcentajes de sólidos, humedad y cenizas siendo su composición de 90.29, 9.71 y 7.80%, respectivamente. Además se cuantificó el contenido de azúcares totales por un método cromatográfico obteniéndose un valor de 40.5 g/L que es menor que los recogidos por Bustos O y otros, 2008, para la melaza de caña de azúcar, la cual fue utilizada en la producción de ácido láctico por *Lactobacillus rhamnosus*. Se lograron determinar las condiciones óptimas para la inversión de sacarosa, las cuales fueron a pH 6.2, con 1% de invertasa 4x durante 20 minutos, esto se decidió de acuerdo a lo cuantificado en cada uno de los procedimientos experimentados y a los resultados obtenido mediante el análisis de varianza realizado.

En cuanto a la estimación del efecto de la inversión enzimática sobre la producción de ácido láctico en medios inoculados con *L. rhamnosus*, se obtuvo que la fermentación con mayor P_{max} y Q_p fue en la que se utilizó como fuente de carbono una solución de melaza con inversión a las 48 horas de incubación con valores de 67.43±/6.91 y 0.7, respectivamente, sin embargo los valores son muy cercanos a los obtenidos en solución de melaza con inversión desde un inicio de la fermentación. Los tiempos de incubación en los que la producción es mayor, fueron a las 96 y a las 120h y tanto la adición de 1% de invertasa al inicio como a las 48h de fermentación se obtienen valores similares de ácido láctico. Finalmente, se estimó que utilizar invertasa 4X al 1% a pH 6.2 en soluciones estériles de 120g de melaza/L inoculadas con *L. rhamnosus* e incubadas a 41.5°C y 150 rpm si tiene un efecto estadísticamente significativo del 95% sobre la concentración de ácido láctico producido.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo financiado de Fondos Mixtos, Conacyt, gobierno del estado de Tamaulipas (Convenio 2007-13-73605).

Referencias

- Bulut, S; Elibol; D. My Ozer (2004), "Effect of Different Carbon Source on L(+)-Lactic Acid Production by *Rhizopus oryzae*", *Biochemical Engineering Journal*, 21, pp. 33-37.
- Bustos, G.; A.B. Moldes; J.L. Alonso and M. Vazquez (2004), "Optimization of D-lactic Acid Production by *Lactobacillus coryniformis* using Response Surface Methodology", *Food Microbiol*, 21(2), pp. 143-148.
- Bustos, O. (2008), "Aprovechamiento biotecnológico de melaza de caña de azúcar y proteína de maíz para la obtención de ácido láctico utilizando *Lactobacillus rhamnosus*", *Tesis de maestría*,
- Goncalves, L.M.; A. Ramos; J.S. Almeida; A. Xavier and M. Carrondo (1997), "Elucidation of the Mechanism of Lactic Acid Growth Inhibition and Production in Batch Cultures of *Lactobacillus rhamnosus*", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48, pp. 346-350.
- Kwon, S; P. Lee; E. Lee; Y. Chang and N. Chang (2000), "Production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus* with vitamin-supplemented soybean hydrolysate", *Enzyme and Microbial Technology*, 26, pp. 209-215.
- Min-Tian, G; M. Koide; R. Gotou; H. Takanashi; M. Hirata and T. Hano (2005), "Development of a Continuous Electrodialysis Fermentation System for Production of Lactic Acid by *Lactobacillus rhamnosus*", *Process Biochemistry*, 40, pp. 1033-1036.
- Rivas, B; A. Moldes; J. Dominguez and J. Pajaró (2004). "Development of culture media containing spent yeast cell of *Debaryomyces hansenii* and corn step liquor for lactic acid production with *Lactobacillus rhamnosus*", *Internacional Journal of Food Microbiology*, 97, pp. 93-98.
- Salminen, S. and A. Von Wright (1993), *Lactic Acid Bacteria*, Marcel Dekker Inc. (ed), Nueva York.

**Evaluación de la melaza de caña y destilado de maíz
para la obtención de ácido láctico
a partir de *Lactobacillus rhamnosus***
*Evaluation of sugar cane molasses and distilled
corn for obtaining lactic acid
from *Lactobacillus rhamnosus**

O. Bustos Vázquez,¹ G. Bustos Vázquez,² S.J. Téllez Luis,¹
J.A. Ramírez de León,¹ N.A. Rodríguez Durán²

Resumen

El objetivo de esta investigación fue evaluar la melaza de caña para la producción de ácido láctico en condiciones de fermentación optimizadas. Se realizaron fermentaciones en discontinuo empleando como controles soluciones de 60, 90 y 100 g de glucosa L⁻¹ y medio MRS. Los tratamientos de melaza se suplementaron con el medio sintético (medio MRS) o con 15 g L⁻¹ de destilado de maíz inoculadas con *Lactobacillus rhamnosus* NRRL B-445, incubados con agitación a 150 rpm y a 41 °C. La mayor producción de ácido láctico en los tratamientos que contenían medio MRS fue de 79.42 g L⁻¹ y en los tratamientos adicionados con el destilado de maíz fue de 46.89 g L⁻¹, ambos en medios que contenían 100g de melaza L⁻¹ y 48 h de incubación. Los resultados obtenidos determinaron que el tiempo de fermentación

¹ Departamento de Tecnología de Alimentos. UAM-Reynosa-Aztlán, Universidad Autónoma de Tamaulipas, Calle 16 y Lago de Chapala s/n. col. Aztlán, c.p. 88740, Reynosa, Tamaulipas, México.

² Departamento de Biotecnología UAM-Mante, Universidad Autónoma de Tamaulipas, blvd. Enrique Cárdenas González, núm. 1201, col. Jardín, c.p. 89840, Ciudad Mante, Tamaulipas, México, correo electrónico: gbustos@uat.edu.mx

puede reducirse de 120 a 48 h y que es posible la sustitución del medio sintético por proteína de maíz reduciendo así los costos de producción.

Abstract

The purpose of this investigation was to evaluate the use of sugar cane molasses for lactic acid production in optimized conditions of fermentation. Batch fermentations were conducted using as controls solutions 60, 90 and 100 g glucose L⁻¹ and MRS broth as control. Molasses treatments were supplemented with synthetic medium (MRS broth) or 15 g L⁻¹ of corn distilled inoculated with *Lactobacillus rhamnosus* NRRL B-445 and incubated with agitation at 150 rpm and 41 °C. The production of lactic acid in treatments containing MRS was 79.42 g L⁻¹; in treatments with added corn distilled was 46.89 g L⁻¹, both in media containing 100 g molasses L⁻¹ and 48 hours of incubation. The results showed that fermentation time can be reduced from 120 to 48 hours and that it is possible to replace the synthetic medium by corn distilled reducing production costs.

Introducción

La industria azucarera tiene gran importancia económica y relevancia social, debido a sus características de agroindustria, esto aunado a que la caña de azúcar es uno de los principales cultivos de nuestro país, representando la producción de grandes cantidades de subproductos orgánicos. Teniendo en cuenta que durante el proceso de obtención de azúcar surge un conjunto de productos secundarios como el bagazo, la cachaza, las cenizas en estado sólido, las melazas de muy alto valor en la industria biotecnológica como fuente de azúcares y otros elementos esenciales como los jugos de caña ricos en azúcares disponibles para su bioconversión; estos residuos pueden ser aprovechados mediante su transformación biotecnológica proporcionando un valor agregado al cultivo y representando una alternativa para la obtención de aditivos alimenticios de gran importancia comercial ya que son relativamente contaminantes, al mismo tiempo que contienen una gran cantidad de nutrientes orgánicos e inorgánicos que permiten su reciclaje en la elaboración de otros productos como son alimento para ganado, en la producción industrial de tableros aglomerados, papel, cartón, etcétera. Uno de los principales residuos de esta industria son las melazas o mieles finales, que son el subproducto de la fabricación o refinación del azúcar crudo a partir de la cual ya no es posible cristalizar azúcar adicional bajo métodos corrientes

(Chen y Chung, 1993), la melaza es ampliamente utilizada como materia prima para las fermentaciones tales como la producción del etanol (Cazetta y otros, 2007) y ácido láctico (Arti y otros, 2008), debido a su abundancia y bajo precio cuando está comparada con otras materias primas disponibles.

El ácido láctico es un hidroxiaácido orgánico natural, fue descubierto en 1780 por el químico sueco C. W. Scheele en la leche cortada. Su obtención industrial tiene una larga tradición que data de 1881 (Chahal, 1989), anualmente su producción a nivel mundial excede de las 80 mil TM (Hofvendahl y Hahn-Hagerdal, 2000). Su interés radica en varios aspectos, siendo uno de los más destacados su aplicación en la industria alimentaria, debido a sus propiedades como acidulante o también a su intervención durante la fermentación láctica en procesos como la fabricación del yogurt (Parajó y otros, 1995a) o la elaboración de quesos. Aproximadamente 80% del ácido láctico producido en el mundo se emplea en el campo alimentario donde frecuentemente encuentra un amplio uso como conservador en productos alimentarios tan diversos como vegetales, carne, pescado, legumbres, cereales, pastelería, bebidas fermentadas y en la industria láctea, actividad en la que se cuenta con una experiencia de más de medio siglo a escala industrial, su uso como vehículo portador de calcio en dietas de terneros destetados y eventualmente en el consumo humano reporta igualmente ventajas evidentes por su mayor compatibilidad nutricional que los portadores inorgánicos. La producción del ácido láctico por fermentación es interesante debido a la perspectiva de usar las materias primas baratas. Las fuentes de carbono para el proceso de fermentación del ácido láctico se basan en sustratos que contienen glucosa, maltosa, sacarosa entre otros azúcares u otras materias primas como melaza y suero de queso o algunos subproductos agrícolas (Bulut y otros, 2004). El objetivo de esta investigación es el estudio y aprovechamiento biotecnológico de la melaza o miel final subproducto de la industrialización de la caña de azúcar para la producción de ácido láctico, determinando las condiciones adecuadas de fermentación que permitan un alto rendimiento, utilizando *Lactobacillus rhamnosus*.

Materiales y métodos

Materia prima

La melaza (miel final), fue proporcionada por el ingenio Aaron Sáenz Garza de la Cd. Xicoténcatl, Tamaulipas y almacenada a temperatura ambiente. En las fermentaciones con melaza de caña, se utilizó el destilado de maíz como fuente de nitrógeno, el cual fue otorgado cordialmente por *Lingolnland Agri-Energy de Palestine Illinois*, y se

mantuvo almacenado a temperatura ambiente hasta su posterior uso, utilizando las mismas concentraciones del extracto de levadura y la peptona del medio general de *Lactobacillus* MRS broth.

Microorganismo

El microorganismo utilizado fue el *Lactobacillus rhamnosus*, NRRL B-445 proporcionada por National Center for Agricultural Research Service Culture Collection (Peoria Illinois, Estados Unidos). La cepa se hizo crecer en frascos Erlenmeyer por 24 h usando el medio completo propuesto por Mercier y otros (1992), que contiene: 20 g/L glucosa; 4 g/L extracto de levadura; 10 g/L peptona; 8 g/L extracto de carne; 5 g/L acetato sódico; 2 g/L citrato de sodio; 2 g de K_2HPO_4 ; 0.12g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0.05g de $MnSO_4 \cdot H_2O$; 0.05 g de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; y 20g de agar. La biomasa en el inóculo se midió por densidad óptica a 600 nm y se ajustó con agua esterilizada.

Caracterización de la melaza

- a) *Sólidos*: Considerando que la miel es un líquido viscoso, y por lo tanto con un contenido de humedad considerable, para determinar la humedad se pesaron 2 g de muestra (melaza) en crisoles pesados y tarados (PCS), se metieron al horno durante 48 horas a 105°C, y se determinó el peso de los crisoles con la muestra seca (PCMS). Utilizando las siguientes ecuaciones se calculó en porcentaje de sólidos totales y por lo tanto el contenido de humedad.

$$PS = PCMS - PCS \quad (Ec. 1)$$

$$\% \text{ sólidos} = (PS \cdot 100) / (PCMH - PCS) \quad (Ec. 2)$$

Donde: *PS* = Peso de la muestra seca. *PCMS* = Peso del crisol con muestra seca. *PCS* = Peso del crisol seco. *PCMH* = Peso del crisol con muestra húmeda.

- b) *Cenizas*: Las cenizas se determinaron a 550 °C en una mufla hasta peso constante. Los recipientes utilizados fueron crisoles de porcelana secados en estufa a 105 °C durante 12 horas y la cantidad de muestra utilizada fue de 1 g. Tanto el análisis de porcentaje de cenizas como de sólidos se realizaron por triplicado para minimizar errores. Las ecuaciones utilizadas para la determinación de cenizas fueron:

$$C = PCMI - PC \quad (Ec. 3)$$

$$\% \text{ Cenizas} = (C \cdot 100) / (PMSI - PC) \quad (Ec. 4)$$

Donde: C = Cenizas. $PCMI$ = Peso del crisol con muestra incinerada. PC = Peso del crisol. $PMSI$ = Peso de muestra sin incinerar.

- c) *Compuestos orgánicos*: Para la determinación de los compuestos orgánicos de la miel final: glucosa, fructosa y sacarosa se hizo una dilución de melaza aproximadamente de 2 g/L, estas diluciones se analizaron por cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE, marca Hewlett Packard), utilizando las siguientes condiciones: un flujo de 0.4 mL·min., 10 µL de muestra, temperatura 20°C y 93 bar de presión, columna cromatografía de intercambio iónico ION-300. Utilizando la ecuación 5 se calculó la concentración de glucosa, fructosa, sacarosa, ácido láctico, ácido acético y etanol en g L⁻¹.

$$CC = (AC) (PMSD. PMD) (CPC / APC) \quad (Ec. 5)$$

Donde: CC = Concentración de compuesto. AC = Área del compuesto. $PMSD$ = Peso de la muestra sin diluir. PMD = Peso de la muestra diluida. CPC = Concentración del patrón del compuesto. APC = Área del patrón del compuesto.

- d) *Determinación de la concentración de los compuestos orgánicos*: Se realizaron rectas de calibración para cada uno de los compuestos orgánicos, relacionando las áreas de los compuestos y su respectiva concentración, esto con la finalidad de calcular con mayor facilidad la concentración de estos compuestos en una solución problema. Para las rectas de calibración se prepararon soluciones de glucosa, fructosa, sacarosa, ácido láctico, ácido acético y etanol, utilizando concentraciones para cada uno de los compuestos de: 0,2, 0,4, 0,8, 1,0 y 2,0 g/L y se analizaron por “cromatografía líquida de alta eficacia” (HPLC).

- e) *Fermentación de ácido láctico*: Los fermentaciones se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer de 250 mL, con un volumen final de 100 mL usando diferentes medios que contenían 60, 90 y 100 g de glucosa L⁻¹ utilizados como control (de acuerdo a la literatura) que contenía el medio completo para *Lactobacillus* propuesto por Mercier y otros (1992) (descrito en el texto como “MRS broth”). En otras dos series de experimentos se utilizaron concentraciones de 60, 90 y 100 g de melaza L⁻¹ suplementados con medio MRS broth y 15 g L⁻¹ de proteína de maíz respectivamente. Para neutralizar el ácido láctico producido, en todos los casos se adicionó carbonato de calcio (30 g L⁻¹). Después de la inoculación (10 mL), la fermentación se llevó a cabo en una incubadora con agitación a 150 rpm y temperatura de 41 °C.

Método analítico

Se tomaron muestras (0.5 mL) a diferentes tiempos de fermentación 0, 24, 48, 72, 96 y 120 h, las cuales se centrifugaron a 3 mil rpm durante 20 minutos, y se filtraron con filtros de 0.45 µm (Sartorius). El sobrenadante se diluyó con agua destilada y se pasó a viales para el análisis de glucosa, fructosa, sacarosa y ácido láctico por HPLC. Considerando todos los azúcares presentes, estos rendimientos se calcularon utilizando la siguiente ecuación:

$$Y_{p/s} = \frac{P - P_0}{S_0 - S}$$

Donde S es la concentración de azúcares totales a determinado tiempo de incubación (g L⁻¹); S_0 es la concentración de azúcares totales al inicio de la fermentación; P es la concentración de ácido láctico en el mismo determinado tiempo de incubación (g L⁻¹); P_0 es la concentración de azúcares totales al inicio (g L⁻¹). Los datos experimentales se analizaron utilizando el software comercial Excel versión 4.0.

Resultados y discusión

Caracterización de la melaza (miel final)

Los sólidos totales se analizaron a partir de la fracción líquida de la melaza o miel final obteniendo 81.9 por ciento. El contenido de cenizas se determinaron por

incineración de dicha fracción obteniendo 18.09% este resultado es ligeramente más bajo que los presentados por Wee y otros (2004) para la melaza de azúcar la cual también fue utilizada para la producción de ácido láctico por fermentación, utilizando *Enterococcus faecalis*, mientras que la humedad fue de 12.38% significativamente más alta comparada con lo presentado por Wee y otros (2004). Los compuestos orgánicos analizados fueron glucosa, fructuosa, sacarosa, ácido láctico y ácido acético. Los resultados obtenidos se recogen en la tabla 1. No se detectó concentración alguna de ácido láctico y acético. El contenido de azúcares totales es considerablemente mayor que los recogidos por Wee y otros (2004).

Tabla 1. Porcentaje de compuestos orgánicos y azúcares totales de la miel final

	<i>Sacarosa</i> (%)	<i>Glucosa</i> (%)	<i>Fructosa</i> (%)	<i>Azúcares</i> <i>totales</i> g/L	<i>Ácido</i> <i>láctico</i> g/L	<i>Ácido</i> <i>acético</i> g/L
Miel final	866.32	10.82	16.61	72.56	0	0

Fuente: elaboración propia.

Obtención de ácido láctico a partir de medios de melaza y medios sintéticos, inoculados con *Lactobacillus rhamnosus*

En la actualidad los sistemas productivos tienen un aprovechamiento muy completo de materias primas, por lo que se considera a la generación de subproductos no aprovechables una pérdida económica que puede llegar a ser muy importante cuando se trabaja en la industria alimentaria donde la comercialización es muy pequeña. En este trabajo se ensayó la producción biotecnológica de ácido láctico utilizando como control, medios compuestos por glucosa a diferentes concentraciones y la fórmula completa de medio MRS (Mercier y otros, 1992), utilizando *Lactobacillus rhamnosus* como microorganismo fermentador debido a que se ha reportado que la melaza se puede utilizar como sustrato obteniendo rendimientos de 0.40 (Tiwari y otros, 1979; citado por Hofvendahl y Hahn-Hagerdal, 2000). Los tratamientos consisten en medios preparados con miel final, como fuente de carbono, a distintas concentraciones (tabla 2), también utilizando la fórmula completa del medio MRS.

Tabla 2. Condiciones experimentales para la producción de ácido láctico

<i>Tratamiento</i>	<i>Fuente de carbono</i>	<i>Concentración de azúcares (g/L)</i>	<i>Fuente de nitrógeno</i>
Control 60	Glucosa	60	Medio general de <i>Lactobacillus</i> (mrs)
Control 90	Glucosa	90	
Control 100	Glucosa	100	
Control 120	Glucosa	120	
Tratamiento 60	Miel final	60	Medio general de <i>Lactobacillus</i> (mrs)
Tratamiento 90	Miel final	90	
Tratamiento 100	Miel final	100	
Tratamiento 120	Miel final	120	

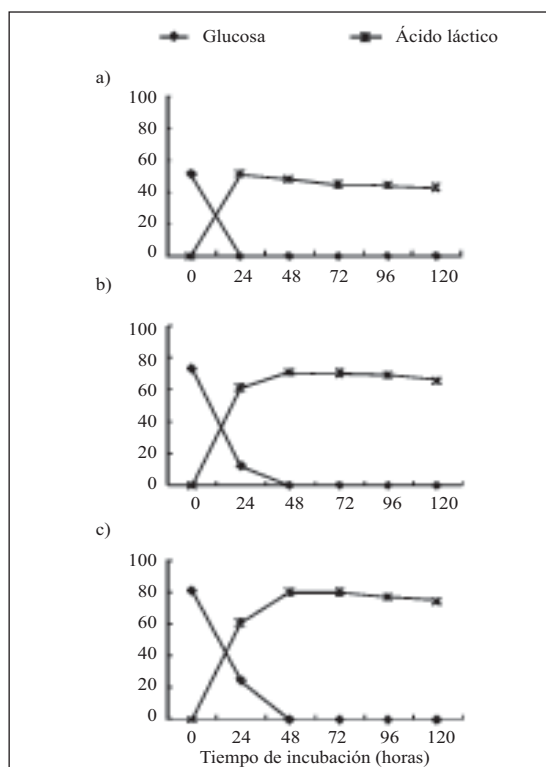
Fuente: elaboración propia.

Es bien sabido que la glucosa se metaboliza fácilmente por muchos microorganismos. Por lo tanto, para establecer comparaciones, así como para investigar la influencia de la concentración de melaza en la fermentación a ácido láctico, se llevó a cabo un control realizando una fermentación con el medio completo de *Lactobacillus* MRS (Mercier y otros, 1992). Así, utilizando el medio sintético, se ensayó el efecto de varias concentraciones de glucosa que van desde 60, 90 y 100 g/L, como se muestra en las cinéticas de las fermentaciones (figura 1), donde se observa que la concentración de ácido láctico aumentó con el incremento de la concentración de glucosa hasta 79.42 g/L (figura 1c).

Cada aumento en los niveles de glucosa, se tradujo en un incremento de la concentración de ácido láctico. Las concentraciones de ácido láctico más elevadas se obtuvieron entre las 24 y 48h de incubación, por lo que se puede pensar en una reducción del tiempo de fermentación. También se puede ver que el sustrato, en todos los controles, se consumió a las 48h o menos tiempo de fermentación. La mayor producción se llevó a cabo en el control de 100 g de glucosa L⁻¹ obteniendo 79.42 g de ácido láctico L⁻¹ a las 48h de incubación, y la menor, en el control de 60 g de glucosa L⁻¹ con una concentración de 42.33 de ácido láctico a las 120 horas de incubación.

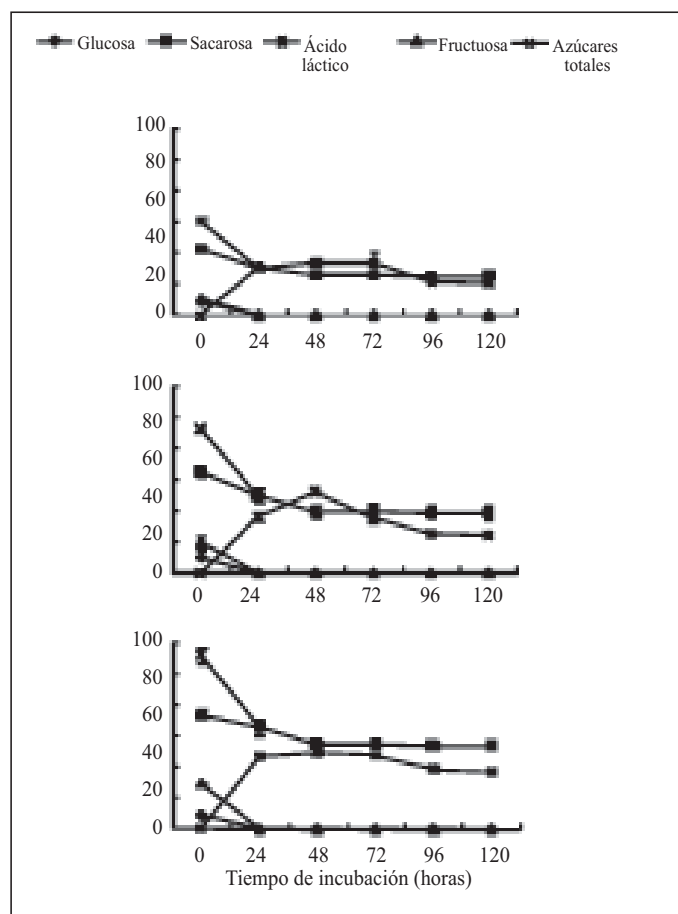
En las cinéticas de fermentación (figura 2) utilizando 90 g de melaza se obtienen las concentraciones máximas de ácido láctico de 51.46 g L⁻¹ a las 48h de incubación, sin embargo, en estos tratamientos queda sacarosa como sustrato residual, la cual no fue metabolizada por el *Lactobacillus rhamnosus*. Estos resultados son similares a los alcanzados por Wee y otros (2004) utilizando *Enterococcus faecalis* con una concentración de melaza de 130 g L⁻¹. Perttunen y otros (2001) utilizando *Lactobacillus pentosus* obtuvieron concentraciones de ácido láctico de 33 g L⁻¹ a partir de hidrolizados hemicelulósicos procedentes de madera de juncos; Bustos y otros (2004a) a partir de hidrolizados hemicelulósicos de las podas de sarmiento utilizando *Lactobacillus pentosus* alcanzó 21.8 g de ácido láctico con rendimientos de 0.77 g.

Figura 1. Cinética de fermentación del consumo de glucosa y producción de ácido láctico en el control a concentraciones de a) 60, b) 90 y c) 100 g L⁻¹



Fuente: elaboración propia.

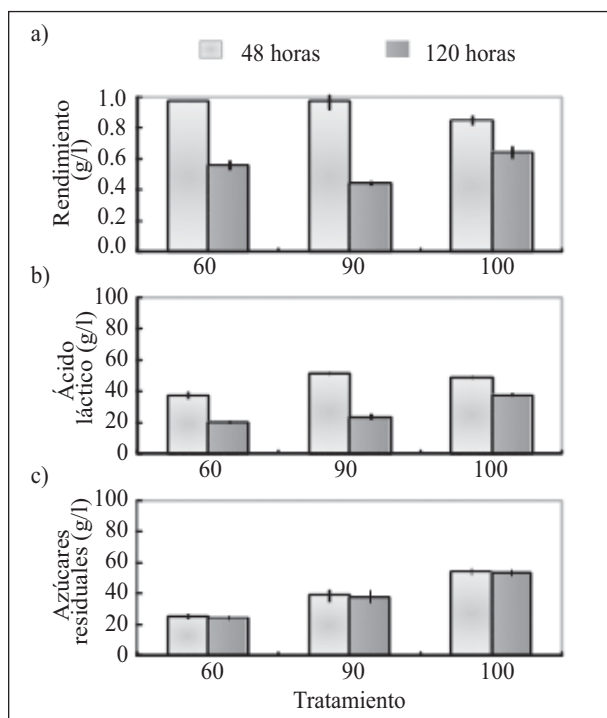
Figura 2. Cinéticas de producción de ácido láctico y consumo de sustrato con concentraciones de a) 60, b) 90 y c) 100 g de melaza/L



Fuente: elaboración propia.

Al comparar estos resultados con los obtenidos en este trabajo al utilizar el medio general de *Lactobacillus* se observa que, aunque la cinética de estas fermentaciones es más lenta y no llegan a consumirse todos los azúcares como ocurre con la glucosa, se alcanza en todos los casos un rendimiento en producto similar al alcanzado usando el medio MRS. En la figura 3 se aprecia la diferencia que existe entre rendimiento en producto, producción de ácido láctico y azúcares residuales (sacarosa) debido a tiempo de incubación siendo favorables los resultados a las 48h de incubación.

Figura 3. Diferencia entre rendimiento en producto, producción de ácido láctico y azúcares residuales



Fuente: elaboración propia.

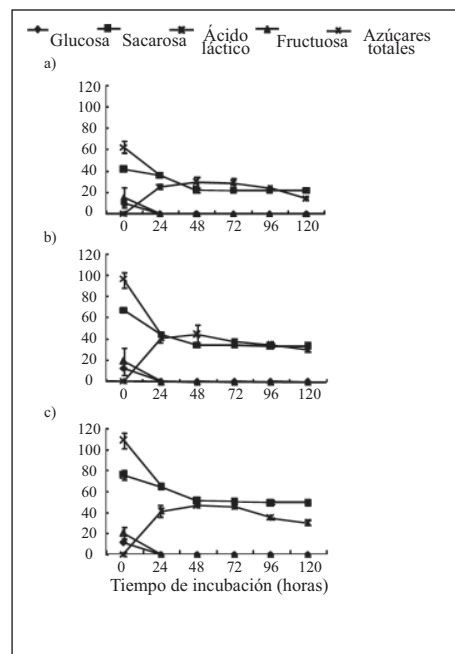
También se confirma que entre mayor es la concentración de sustrato al inicio de la fermentación mayor es la producción de ácido láctico y la concentración de azúcar residual, como lo indica Wee y otros (2004) que de acuerdo a las cinéticas de la figura 2, el sustrato residual es sacarosa.

Obtención de ácido láctico a partir de medios de melaza y proteína de maíz

El extracto de levadura y peptona, son los principales componentes del medio general de *Lactobacillus* propuesto por Mercier y otros (1992), sin embargo, estos alcanzan precios muy elevados. Comparativamente el destilado de maíz como residuo industrial

tiene un bajo costo, por otra parte la melaza empleada en este estudio también tiene un costo muy bajo ya que representa un residuo del proceso de producción del azúcar. Basándonos en consideraciones económicas y teniendo en cuenta los costosos tratamientos que son necesarios aplicar a los nutrientes del medio de Mercier, fue interesante sustituir los 5g L^{-1} del extracto de levadura L^{-1} y los 10g de peptona L^{-1} que contiene dicho medio por el destilado de maíz, así como reemplazar glucosa por melaza de caña de azúcar en diferentes concentraciones.

Figura 4. Cinéticas de producción de ácido láctico y consumo de sustrato con concentraciones de a) 60, b) 90, c) 100 y d) 120 g de melaza L^{-1} complementados con 15 g de destilado de maíz L^{-1}



Fuente: elaboración propia.

Así, con la finalidad de evaluar el destilado de maíz como fuente de nitrógeno, se establecieron comparaciones entre los resultados obtenidos en fermentaciones realizadas en medios de glucosa utilizando la fórmula del medio general del *Lactobacillus* y medios de melaza enriquecidos con el destilado de maíz como fuente de nitrógeno (figura 4). En los tratamientos la producción de ácido láctico más elevada

fue de 46.89 g L⁻¹ y se obtuvo en el tratamiento 100g L⁻¹ a las 48h de incubación; este resultado es similar al obtenido por Bustos y otros (2004b), utilizando los licores del lavado de maíz (CSL) como fuente de nitrógeno y único nutriente con *L. rhamnosus* a un tiempo de fermentación de 72h, por el contrario la menor producción fue de 14.20 g de ácido láctico L⁻¹ correspondiente al tratamiento 60 a las 120h de incubación. Por otra parte, los valores de rendimiento en producto obtenidos varían de 0.69 a 0.81 y de 0.34 a 0.49 a las 48h y 120h de incubación, respectivamente.

En estas cinéticas también se observa la tendencia de que la mayor producción de ácido láctico se obtiene a las 48h quedando, de igual manera, sacarosa como sustrato residual debido a que no puede ser consumida por *Lactobacillus rhamnosus*.

De acuerdo a los resultados obtenidos es posible concluir que la sacarosa contenida en la melaza no puede ser consumida completamente, por lo que se recomienda llevar a cabo tratamientos de la inversión de la sacarosa. Por otro lado, se obtuvieron resultados relevantes para la optimización de la producción de ácido láctico, ya que se observó que *Lactobacillus rhamnosus* consume en un máximo de 48 horas la glucosa y fructosa, lo que permite reducir el tiempo de fermentación, asimismo, se observó que los resultados de fermentación son favorables en una concentración de 90 y 100 g de sustrato L⁻¹. Esto indica que tanto el medio MRS o la proteína de maíz son medios potenciales para ser utilizados como fuente de nitrógeno en la obtención de ácido láctico.

Referencias

- Arti Dumbrepatil; Mukund Adsul; Shivani Chaudhari; Jayant Khire and Digambar Gokhale (2007), "Utilization of Molasses Sugar for Lactic Acid Production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Delbrueckii* Mutant Uc-3 in Batch Fermentation", *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, pp. 333-335.
- Bulut S.; M. Elibol and D. Ozer (2004), "Effect of Different Carbon Sources on l (+) -Lactic Acid Production by *Rhizopus oryzae*", *Biochemical Engineering Journal*, 21, pp. 33-37.
- Bustos G.; A.B. Moldes; J.M. Cruz and J.M. Domínguez (2004), "Production of Fermentable Media from Vine-Trimming Wastes and Bioconversion into Lactic Acid by *Lactobacillus pentosus*", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84: pp. 2105-2112.
- _____ (2004b), "Formulation of Low-Cost Fermentative Media for Lactic Acid Production with *Lactobacillus rhamnosus* using Vinification Lees as Nutrients", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, pp. 801-808.

- Cazetta M.L.; M.A.P.C. Celligoi; J.B. Buzato and I.S. Scarmino (2007), "Fermentation of Molasses by *Zymomonas mobilis*: Effects of Temperature and Sugar Concentration on Ethanol Production", *Bioresource Technology*, 98(1)5, pp. 2824-2828.
- Chahal S.P. (1989), "Lactic Acid", in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Berlín, VCH, Verlag.
- Chen J.C.P.; C.C. Chung (1993), *Sugar Cane Handbook: A Manual for Cane Sugar Manufacturers and Their Chemists in a Hardcover format*, John Wiley & Sons Inc. (ed), 12nd edition.
- Hofvendahl K.; B. Hahn-Hagerdal (2000), "Factors Affecting the Fermentative Lactic Acid Production from Renewable Resources", *Enzyme and Microbial Technology*, 26(2-4), pp. 87-107.
- Mercier P.; L. Yerushalmi; D. Rouleau and D. Dochain (1992), "Kinetics of Lactic Acid Fermentation on Glucose and Corn by *Lactobacillus amylophilus*", *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **55**, pp. 111-121.
- Parajó J.C.; J.L. Alonso; V. Santos y A.B. Moldes (1995a), "Producción biotecnológica de ácido láctico: aspectos generales", *Alimentación Equipos y Tecnología*, 15(1), pp. 91-100.
- Perttunen J.; L. Myllykoski and R.L. Keiski (2001), "Lactic Acid Fermentation of Hemicelluloses Liquors and their Activated Carbon Pretreatments", *Focus on Biotechnology*, 4, pp. 29-38.
- Tiwari K.P.; A. Pandey A. and N. Mishra (1979), "Lactic Acid Production from Molasses by Mixed Population of Lactobacilli", *Zentralbl Bacteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg Zweite Naturwiss Abt Mikrobiol Land-wirtsch Technol, Umweltschutzes*, 134, pp. 544-6.
- Wee Y.J.; J.S. Yun; D.H. Park and H.W. Ryu (2004), "Biotechnological Production of l(+)-Lactic Acid from Wood Hydrolyzate by Batch Fermentation of *Enterococcus faecalis*", *Biotechnology Letters*, 26, pp. 71-4.
- Wee Y.J.; J.N. Kim; J.S. Yun and H.W. Ryu (2004), "Utilization of Sugar Molasses for Economical L(+)-Lactic Acid Production by Batch Fermentation of *Enterococcus faecalis*", *Enzyme and Microbial Technology*", 35, pp. 568-573.

Selección e identificación de levaduras de interés industrial

Selection and identification of yeasts of industrial interest

J.A. del Ángel del Ángel,¹ M.G. Bustos Vázquez,¹ P. López González¹

Resumen

Las levaduras participan en numerosos procesos biotecnológicos, están involucradas tanto en la descomposición de alimentos como en la producción y preparación de ellos. Una gran variedad de bebidas fermentadas son elaboradas con la ayuda de las levaduras y la calidad del producto, así como la eficiencia del proceso, depende del conocimiento que se tenga de la especie involucrada. En productos artesanales la selección de las mejores cepas se realiza de manera empírica pero a nivel industrial la selección se realiza siguiendo una serie de pasos que involucra análisis fisiológicos y bioquímicos. Actualmente se emplean métodos moleculares para la selección e identificación de levaduras con las mejores características. Una buena selección puede dar a la industria una ventaja competitiva al obtener mayor rendimiento o características deseadas de su producto. En la presente revisión se expondrán las etapas y técnicas empleadas en la selección de levaduras con características útiles en la industria.

¹ Unidad Académica Multidisciplinaria Mante, Universidad Autónoma de Tamaulipas, blvd. Enrique Cárdenas González, núm. 1201, col. Jardín, c.p. 89840, Ciudad Mante, Tamaulipas, México, tel y fax: (831)-233-8100, correo electrónico: aangel@uat.edu.mx

Abstract

Yeast participate in numerous biotechnological processes, are involved in the decomposition, production and preparation of foods. A great variety of fermented drinks are elaborated with the aid of yeast and many of them are made with the natural flora of the raw material. A good product, as well as an efficient process depends on the knowledge about the species implied in the fermentation process. In artisan products the selection of the best strains is carried out in an empirical way; but at industrial level the selection is carried out following a series of steps that include physiological and biochemical tests. When the objective is the selection of the best strains from natural fermentations, the morphologic and biochemical tests are not sufficient to identify them, reason why novel molecular methods are used that include different techniques; in order to identify different species or new strains with promising characteristics. A good selection can give to the industry a competitive advantage when obtaining higher yield or specific characteristics of its product. In the present revision the steps and techniques used in the yeast selection with useful characteristics in the industry are discussed.

Introducción

En el contexto actual, la globalización se basa en la búsqueda y utilización de capacidades más competitivas para generar procesos, productos y servicios de mejor calidad y precio; y así, satisfacer las exigencias de los mercados locales y regionales. Además de la globalización de la economía se ha presentado la internacionalización de la investigación y desarrollo tecnológico y hoy en día no sólo los países avanzados incrementan sus inversiones en investigación y desarrollo. La biotecnología es el área de conocimiento que se está convirtiendo en motor de desarrollo de esta transformación radical. La biotecnología en este mundo globalizado logra formar biorregiones que agrupan componentes asociados a esta, como centros de educación superior, centros de investigación científica, centros de desarrollo tecnológico y empresas (Pineda, 2005). La biotecnología es una herramienta importante para el desarrollo y que aunado a otras tecnologías estudia procesos no convencionales para el aprovechamiento de recursos naturales así como residuos agroindustriales y generar productos de interés en la industria alimentaria, agrícola o de servicios (Bustos, 2008).

El uso de residuos agroindustriales son una alternativa como sustratos en procesos biotecnológicos para la producción de nuevos alimentos, productos químicos y

farmacéutico; producción de xilosa, enzimas, xilitol o bioetanol son algunos de los productos elaborados mediante estos bioprocesos (Basanta y otros, 2007). La melaza de caña de azúcar es un subproducto de la industria azucarera que se utiliza en la actualidad para producir etanol y levadura prensada (Portilla y otros, 2008). Algunos otros productos obtenidos mediante procesos biotecnológicos son nutracéuticos, prebióticos, así como biofertilizantes y biopesticidas. La biotecnología, ya sean en servicios o productos, está orientada a mejorar nuestra calidad de vida (United Nations, 2004).

Selección de levaduras

Algunos productos fermentados artesanalmente son elaborados con cultivos iniciadores que contienen microorganismos seleccionados naturalmente en fermentaciones previas, dentro de los varios microorganismos que llevan a cabo la fermentación alcohólica *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia sp* y *Zymomonas mobilis* son las más abundantes (Barba, 2008).

Además de la explotación tradicional de la biomasa de levadura en la industria alimenticia es también una magnífica fuente de producción de otros compuestos de interés industrial; por su alto valor nutricional (alrededor de 50% de proteína) puede ser utilizada en la elaboración de aislados proteicos y si son eliminados los ácidos nucleídos, el producto es un aislado proteico de alto valor nutricional. Además de proteínas pueden extraerse otros productos de importancia como son: enzimas, ácidos nucleídos, polisacáridos, entre otros (Otero, 2008).

La producción de etanol, en ingenios por ejemplo, presentan grandes rezagos tecnológicos como la inhibición de levaduras altamente productoras de etanol por ambientes ricos en solutos o inhibición y muerte de las células cuando el etanol alcanza concentraciones de entre 4 y 7% (p/v); también se presentan problemas debido a la contaminación por otros microorganismos. La fermentación alcohólica es llevada a cabo por *Saccharomyces cerevisiae* y algunas bacterias, este proceso es de gran importancia industrial por lo que hace interesante la búsqueda de alternativas para mejorar su producción (Aguilar, 2008; Ortiz Zamora y otros, 2007).

Lo anterior hace necesaria la búsqueda de cepas de levaduras osmotolerantes, resistentes a etanol y con actividad “killer”, y lograr que el microorganismo que se utilice en el proceso a nivel industrial, pueda crecer en, por ejemplo, melazas concentradas (altas de azúcares) o resistir altas concentraciones de etanol y con actividad “killer” para su propio control sobre la contaminación por otros microorganismos presentes en el medio (Ernandez, 1990; Aguilar, 2008; Bertolini, 1991) así como

termotolerantes, debido a que algunos procesos de fermentación, sobretodo artesanales, se llevan a cabo en equipos sin control de temperatura (Oliveira y otros, 2008).

Para estos estudios se han aislado e identificado cepas de levaduras de diversas fuentes como son caña de azúcar y derivados en la industria azucarera (El-Tabey Shehata, 1960) frutas, cortezas de arboles (Las Heras Vázquez, 2003; Rao, 2008) o de uva en las diferentes etapas de la vinificación (Cappello, 2004; Gonzalez, 2007) y se han realizado estudios comparativos para evaluar las capacidades fermentativas de las cepas nativa contra las cepas industriales (Bell, 2001; Okunowo, 2005). Así, también se realizan estudios para seleccionar cepas que originen productos fermentados con las características deseadas, e incluso se han establecido algunas técnicas de selección de cepas que se efectúen de manera más rápida y eficiente, como es la de fermentaciones masivas por competencias (Mas, 2002). Algunos productos de fermentación artesanal son gracias a la carga microbiana nativa en una fermentación natural (Agnolucci, 2007) las levaduras nativas, en algunos casos, han sido identificadas y seleccionadas para emplearlas en el proceso y dar al producto características particulares (Gomes, 2007; Guerra, 2001).

En la industria enológica existen diversas técnicas de selección y mejora de cepas como son:

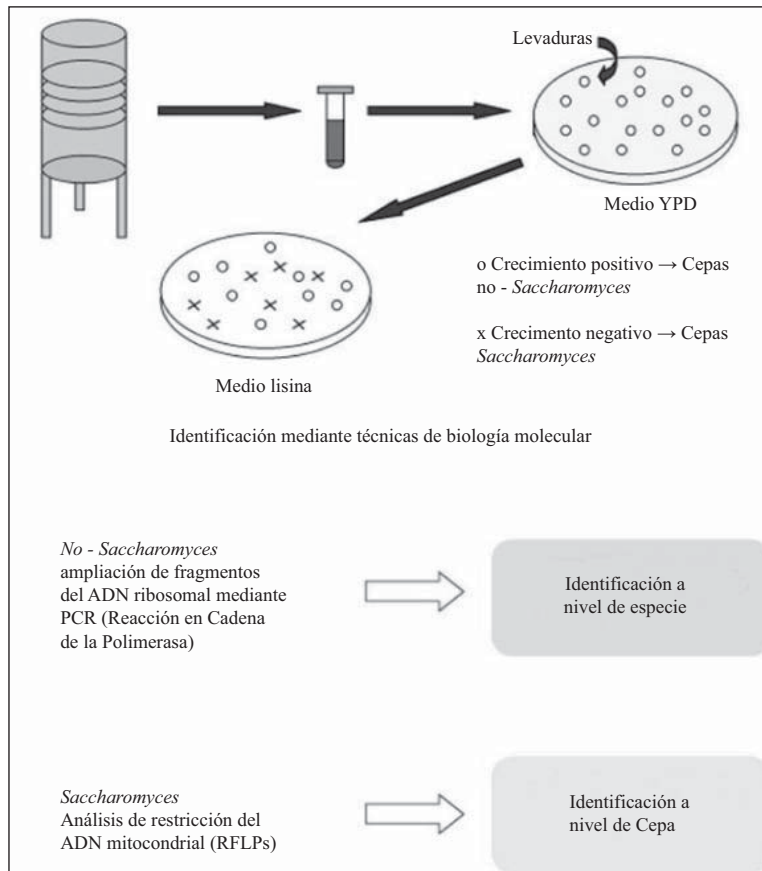
- a) Selección clonal. Es la técnica más antigua y consiste en aislar individuos de entre una amplia población de cepas autóctonas se analiza si poseen características deseadas. Seleccionados los mejores, se hacen con ellos cultivos puros que se ensayan a nivel industrial y pueden ser comercializados como cultivos “starter”.
- b) Selección de mutantes. Consiste en partir de cultivos puros de cepas con buenas características y someterlas a la acción de agentes mutágenos. Los mutantes obtenidos se ensayan individualmente para nuevas características procediendo como en el caso anterior.
- c) Hibridación de cepas. Consiste en provocar la fusión, ya sea sexual o asexualmente, de células procedentes de cepas con características distintas y analizar en los descendientes la presencia de características de ambas cepas (Mesas, 1999).

Aislamiento e identificación

El aislamiento de las cepas se realiza comúnmente dejando correr la fermentación natural hasta obtener una alta cantidad de células que luego inoculan en medios

enriquecidos (adicionados con algún antibiótico) para su crecimiento y posterior selección e identificación (Las Heras Vázquez, 2003; Araújo, 2007). La selección de las colonias crecidas en el medio se realiza según sus características morfológicas así como su resistencia en concentraciones altas de etanol o a altas temperaturas (Cappello, 2004; Oliveira, 2008) según el interés que se persiga. La identificación de levaduras se ha realizado de acuerdo a sus características morfológicas y fisiológicas, aunque la desventaja es el gran número de pruebas a realizar, lo cual consume mucho tiempo y es un trabajo complejo y laborioso (Orberá, 2004; Covadonga, 2002).

Figura 1. Esquema del aislamiento e identificación de las cepas de *Saccharomyces* que llevan a cabo la fermentación alcohólica



Fuente: (Mas, 2002).

Las pruebas que se llevan a cabo para la caracterización fisiológica de las levaduras pueden ser: *a)* habilidad para producir H₂S en la que se hacen crecer las levaduras en un medio con sulfato de bismuto y en el que después del periodo de incubación (3 días a 30°C) las colonias productoras de H₂S muestran un color café o negro, *b)* capacidad de producir toxinas “killer”, *c)* pruebas de tolerancia al etanol y crecimiento a altas temperaturas. Las pruebas bioquímicas pueden ser basadas en la utilización de fuentes de carbono y nitrógeno (Oliveira, 2008).

En la actualidad los métodos moleculares son los más usados para identificar levaduras ya que con estos métodos se es capaz de identificar levaduras a nivel de especie e incluso a nivel de cepa (figura 1). A continuación se enlistan los métodos empleados en identificación de levaduras:

1. *Polimorfismo longitudinal de los cromosomas: Electroforesis de cariotipo (Cariotipificación)* donde la molécula de ADN es digerida con endonucleasas de restricción y sometida a un campo eléctrico en un gel de electroforesis, la migración se realiza a una velocidad que depende del tamaño y la carga de las moléculas, en el gel se visualiza un patrón de bandas el cual es específico de especie, esta técnica es una herramienta útil en la diferenciación de especies.
2. *Polimorfismo del DNA mitocondrial (mtDNA)*: Las levaduras son organismos con un amplio grado de variabilidad en el tamaño del mtDNA, puede variar entre los 6 y los 25 µm. La elevada variabilidad del mtDNA lo hizo atractivo para su uso en la identificación de especies por electroforesis.
3. *Análisis de microsátélites*: Basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y consiste en la amplificación de fragmentos con cebadores de oligonucleótidos específicos para secuencias simples repetitivas presentes en el DNA, denominadas microsátélites. Los más utilizados: (GTC)₅, (GACA)₄, Fago DNA M13 y la secuencia del M13 GAGGGTGGCGTTCT.
4. Métodos basados en el uso del genoma ribosomal:
 - a) Polimorfismo de longitud en los fragmentos de restricción del rDNA/rRNA (RFLP)*. La determinación del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción, consiste en la diferenciación de los organismos por el análisis de los patrones de ruptura que se generan en un sitio específico del genoma, cortado por enzimas de restricción. Los organismos de diferentes especies, e incluso cepas, difieren en la distancia de los sitios de clivaje para cada enzima de restricción. La similitud de los patrones establece correlación entre especies y cepas, y los patrones únicos permite la identificación.

- b) *Polimorfismo del DNA aleatoriamente amplificado (RAPD). Arbitrarily Primed PCR (AP-PCR). DNA Amplification Fingerprinting (DAF)*. Se basa en la amplificación por PCR simultánea del DNA genómico en presencia de un único cebador de pocos oligonucleótidos que se une a sitios inespecíficos, distribuidos en regiones aleatorias, permitiendo la amplificación de fragmentos polimórficos de DNA. Los productos amplificados se visualizan por electroforesis. El uso de RAPD permite obtener las llamadas “huellas digitales” que no son más que las diferencias de número y tamaño en los fragmentos del DNA amplificado, las cuales son específicas de especies e incluso cepas.
- c) *Uso de los RNA de bajo peso molecular (LMW-RNA)*. se basa en el uso de los patrones de electroforesis de los RNAs de bajo peso molecular, 5.8S/5S rRNA y el tRNA de clase 1 y 2 (Orberá, 2004).

Se han probado varios métodos para la identificación de levaduras y se ha encontrado que la amplificación de fragmentos de ADN ribosomal mediante PCR es útil en la identificación a nivel de especie y análisis de restricción del ADN mitocondrial (RFLP) es el más adecuado para identificar levaduras a nivel de cepas (Araújo, 2007; Cappello, 2004; Mas 2002).

Referencias

- Agnolucci, M.; S. Scarano; S. Santoro; C. Sassano; A. Toffanin and M. Nuti (2007), “Genetic and Phenotypic Diversity of Autochthonous *Saccharomyces* Spp. Strains Associated to Natural Fermentation of ‘Malvasia delle Lipari’”, *Letters in Applied Microbiology*, 45, pp. 657-662.
- Aguilar Uscanga, M.A. y J. Gómez Rodríguez (2008), “Establecimiento de un proceso de producción de etanol a partir de caña de azúcar utilizando cepas autóctonas selectivas”, en *Aprovechamiento biotecnológico de productos agropecuarios II*, G. Bustos (ed.), México, Plaza y Valdés, pp 255-270.
- Araújo, Roberta A.C.; Fátima C.O. Gomes; Elizabeth S.A. Moreira; Patrícia S. Cisalpino and Carlos A. Rosa (2007), “Monitoring *Saccharomyces cerevisiae* Populations by mtDNA Restriction Analysis and other Molecular Typing Methods during Spontaneous Fermentation for Production of the Artisanal Cachaça”, *Brazilian Journal of Microbiology*, 38, pp. 217-223.

- Barba de la Rosa, A.P.; A. de León Rodríguez (2008), “El mezcal de agave salmiana: una bebida alcohólica étnica”, en *Aprovechamiento biotecnológico de productos agropecuarios II*, Bustos G. (ed.), México, Plaza y Valdés, pp. 77-90.
- Basanta, R.; M.A. García Delgado; J.E. Cervantes Martínez; H. Mata Vázquez y G. Bustos Vázquez (2007), “Sostenibilidad del reciclaje de residuos de la agroindustria azucarera: una revisión”, *Cienc. Tecnol. Aliment.*, 4, pp. 293-305.
- Bell P.J.L.; V.J. Higgins and P.V. Atfield (2001), “Comparison of Fermentative Capacities of Industrial Baking and Wild-Type Yeast of the Species *Saccharomyces cerevisiae* in Different Sugar Media”, *Letters in applied microbiology*, 32, pp. 224-229.
- Bertolini M.C. and J.R. Hernandez (1991), “New Yeast Strain for Alcoholic Fermentation at Higher Sugar Concentration”, *Biotechnology letters*, 3, pp. 197-202.
- Cappello M.S.; G. Blevé; F. Grieco; F. Dellaglio and G. Zacheo (2004), “Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* Strain Isolated from Must of Grape Grown in Experimental Vineyard”, *Journal Applied Microbiology*, 97, pp. 1274-1280.
- Covadonga R. Arias; Jacqueline K. Burns; Lorrie M. Friedrich; Renee M. Goodrich and Mickey E. Parish (2002), “Yeast Species Associated with Orange Juice: Evaluation of Different Identification Methods”, *Applied and Environmental Microbiology*, 4, pp. 1955-1961.
- El-Labey Shehata A.M. (1960), “Yeast Isolated from Sugar Cane and Juice during the Production of Aguardente de Cana”, *Applied and Environmental Microbiology*, 8, pp. 73-75.
- Hernandez J.R. (1990), “Isolation of New Ethanol-Tolerant Yeast for Fuel Ethanol Production from Sucrose”, *Biotechnology Letters*, 6, pp. 463-468.
- Las Heras Vázquez F.J.; L. Mingorance Cazorla; J.M. Clemente Jimenez; V.F. Rodríguez (2003), “Identification of Yeast Species from Orange Fruits and Juice by RFLP and Sequence Analysis of the 5.8S rRNA Gene and the Two Internal Transcribed Spacers”, *Yeast Research*, 3, pp. 3-9.
- Gomes F.C.O.; C.L.C. Silva; M.M. Marini; E.S. Oliveira and C.A. Rosa (2007), “Use of Selected Indigenous *Saccharomyces cerevisiae* Strains for the Production of the Traditional Cachaça in Brazil”, *Journal of Applied Microbiology*, 103, pp. 2438-2447.
- Gonzalez S.S., E. Barrio and Querol (2007), “A. Molecular Identification and Characterization of Wine Yeast Isolated from Tenerife (Canary island Spain)”, *Journal of Applied Microbiology*, 102, pp. 1018-1025.
- Guerra J.B.; R.A.C. Araújo; C. Pataro; G.R. Franco; E.S.A. Moreira; L.C. Mendonça-Hagler and C.A. Rosa (2001) “Genetic Diversity of *Saccharomyces cerevisiae* Strains during the 24 h Fermentative Cycle for the Production of the Artisanal Brazilian Cachaça”, *Letters in Applied Microbiology*, 33, pp. 106-111.

- Mas A.; M.J. Torija; G. Beltrán; M. Novo; N. Hierro; M. Poblet; N. Rozés y J.M. Guillamón (2002), “Selección de levaduras”, *Tecnología del Vino*, disponible en www.alcion.es.
- Mesas, J.M.; M.T. Alegre (1999), “El papel de los microorganismos en la elaboración del vino”, *Cienc. Tecnol. Aliment.*, 4, pp. 174-183.
- Okunowo W.O.; R.O. Okotore and A.A. Osuntoki (2005), “The Alcoholic Fermentative Efficiency of Indigenous Yeast Strains of Different Origin on Orange Juice”, *African Journal of Biotechnology*, 11, pp. 1290-1296.
- Oliveira V.A.; V.M. Araújo; F.L. Gomes; I. Castro; M.X. Coutim; D. Schüller; H. Alves; M. Casal; J. Santos; A.L. Dias; P.H. Alves da Silva and B.R. Lopes (2008), “Biochemical and Molecular Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* Strains Obtained from Sugar-Cane Juice Fermentations and Their Impact in Cachaça Production”, *Applied and Environmental Microbiology*, 3, pp. 693-701.
- Orberá R.T. (2004), “Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. Revista Iberoamericana de Micología”, 21, pp. 15-19.
- O. Ortiz Zamora; R. Cortés García; M. Ramírez Lepe; J. Gómez Rodríguez and M.G. Aguilar-Uscanga (2009), “Isolation and Selection of Ethanol-Resistant and Osmotolerant Yeasts from Regional Agricultural Sources in Mexico”, *Journal Of Food Process Engineering*, 5, pp. 775-786.
- Otero, M.A. (2008), “Procesamiento de levadura para la obtención de derivados. Diferentes alternativas”, en *Aprovechamiento biotecnológico de productos agropecuarios II*, Bustos G. (ed), México, Plaza y Valdés, pp. 271-288.
- Pineda S. L. (2005), “Tecnoglobalización y biotecnología: Retos y oportunidades para Colombia”, *Revista colombiana de biotecnología*, 2, pp. 3-4.
- Portilla Rivera, O.M.; S.J. Téllez Luis; J.A. Ramírez de León y M. Vázquez (2008), “Producción de transglutaminasa microbiana a partir de melaza de caña de azúcar”, en *Aprovechamiento biotecnológico de productos agropecuarios II*, Bustos G. (ed), México, Plaza y Valdez, México, pp. 55-66.
- Rao R.S.; B. Bhadra and S. Shivaji (2008), “Isolation and Characterization of Ethanol-Producing Yeast from Fruits and Tree Barks”, *Letters in Applied Microbiology*, 47, pp. 19-24.

Obtención de ácido láctico a partir de jugo de caña utilizando diferentes especies de *Lactobacillus*

Obtaining lactic acid from sugar cane juice using different species of Lactobacillus

J. González Ramírez;¹ K.S. Estrada Ortiz;¹ N. Rodríguez Durán¹
G. Bustos Vázquez;¹

Resumen

El jugo residual del proceso de la caña de azúcar se evaluó como sustrato fermentativo discontinuo para la producción de ácido láctico usando especies de *Lactobacillus* con diferentes propiedades: *Lactobacillus coryniformis* NRRL B-4390, *Lactobacillus casei* NRRL B-1922 y *Lactobacillus rhamnosus* NRRL B-442. Los valores más altos alcanzados fueron para *L. rhamnosus* (Q_p de 1.46 g L⁻¹ h⁻¹ y un $Y_{p/s}$ de 0.73 g g). Los medios se prepararon en frascos Erlenmeyer de 250 mL con un volumen final de 100 mL, adicionados con 10 g L⁻¹ de extracto de levadura y carbonato de calcio para neutralizar el ácido láctico producido en el medio.

Abstract

Residual juice from sugar cane processing was evaluated as substrate for batch fermentation to produce lactic acid using *Lactobacillus* species with different properties: *Lactobacillus coryniformis* NRRL B-4390, *Lactobacillus casei* NRRL

¹ Unidad Académica Multidisciplinaria Mante, Universidad Autónoma de Tamaulipas, Blvd. Enrique Cárdenas González, núm. 1201, col. Jardín, c.p. 89840. Ciudad Mante, Tamaulipas, México, tel y fax: (831)-233-8100, correo electrónico: gbustos@uat.edu.mx

B-1922 and *Lactobacillus rhamnosus* NRRL B-442. The highest values were achieved by *L. rhamnosus* (QP of 1.46 g L⁻¹ h⁻¹ and Yp/s of 0.73 g·g). The media were prepared in 250 mL Erlenmeyer flasks with a final volume of 100 mL, added to 10 g L⁻¹ of yeast extract and calcium carbonate to neutralize the lactic acid produced in the fermentation media.

Introducción

El crecimiento de la población, aunado a la escasez e incluso al agotamiento de muchas materias primas necesarias para la alimentación, hace interesante el estudio de procesos no convencionales para el aprovechamiento de los recursos naturales. La biotecnología ha utilizado los microorganismos desde la antigüedad para la producción de alimentos. Investigaciones recientes enfocan su atención a la obtención de productos de gran interés para la industria alimentaria a partir de residuos agroindustriales en la producción de aditivos.

La obtención de estos, requiere la generación de medios de cultivo ricos en azúcares como melazas, suero, bagazo y jugo de caña de azúcar, bagazo de yuca y materiales conteniendo almidón como patatas, tapioca, cebada, suero trigo y zanahoria (Anuradha y otros, 1999; Pandey y otros, 2001). La síntesis biológica está tradicionalmente basada en la bioconversión de soluciones de azúcar por bacterias. El jugo de baja calidad o jugo residual de la caña de azúcar es la fracción que no ha podido ser extraída y que queda en el bagazo, contiene una gran cantidad de componentes disueltos en su mayoría por azúcares (sacarosa, glucosa y fructuosa), los cuales pueden ser utilizados como fuente de carbono para la producción de productos de interés en el mercado como el ácido láctico.

La bibliografía ha propuesto la utilización de hongos y bacterias para la producción de ácido láctico, dentro de las bacterias lácticas el género *Lactobacillus* es el más importante y heterogéneo, incluyendo dentro de sí especies con propiedades bioquímicas y fisiológicas muy diferentes. En general, el género *Lactobacillus* destaca por ser ácido-tolerante (Zhou y otros, 2003), por actuar como protagonista en importantes aplicaciones industriales (Kashket, 1987; Hofvendal y Hahn-Hägerdal, 1997), así como por poder ser modificadas genéticamente, para la producción selectiva de un solo enantiómero (Benthin y Villadsen, 1995; Demirci y Pometto, 1992; Lapierre y otros, 1999; Kyla Nikkila y otros, 2000). Entre los inconvenientes de las bacterias lácticas está la de requerir nutrientes muy complejos (Chopin, 1993; Hofvendal y Hahn-Hägerdal, 2000; Bueyuekkileci y Harsa, 2004), debido a su limitación para sintetizar vitamina B y aminoácidos. El ácido láctico es un ácido natural orgánico,

utilizado en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética (Garde y otros, 2002). En los últimos años, se ha incrementado su producción por procedimientos fermentativos, debido entre otros factores, a la creciente necesidad de producir isómeros puros (Blomqvist, 2001, Tsuji, 2002).

Este trabajo evalúa la utilización del jugo residual del proceso de la caña de azúcar utilizando bacterias lácticas con diferentes características (*Lactobacillus coryniformis* NRRL B-4390, *Lactobacillus casei* NRRL B-1922, y *Lactobacillus rhamnosus* NRRL B-442) y comparando la adición de diferentes nutrientes y carbonato de calcio en el medio de fermentación.

Materiales y métodos

Materia prima: Como materia prima se utilizó el jugo residual de la caña de azúcar, el cual se obtiene durante la etapa de clarificación del proceso de obtención del azúcar el cual fue proporcionado por el Ingenio Aarón Sáenz Garza de la ciudad de Xicoténcatl, Tamaulipas. El jugo se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 20 minutos antes de la fermentación.

Microorganismos: Con el fin de evaluar la fuente de carbono para producción de ácido láctico se utilizaron tres microorganismos: *Lactobacillus rhamnosus* NRRL B-422; *Lactobacillus casei* NRRL B-1992 y *Lactobacillus coryniformis* NRRL B-4390, los cuales fueron cedidos amablemente por “National Center for Agricultural Research Service Culture Collection” (Peoria Illinois, Estados Unidos) y crecidos en placas utilizando el medio MRS broth propuesto por Mercier y otros (1992). La biomasa en el inóculo se midió por densidad óptica a 600 nm y se ajustó con agua esterilizada. Las fermentaciones se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer de 250 mL con volumen final de 100 mL. Se tomaron muestras a diferentes tiempos de fermentación y se analizaron por HPLC.

Método analítico: Se tomaron muestras (0.5 mL) a diferentes tiempos de fermentación 0, 24, 48, 72, 96 y 120 h, las cuales se centrifugaron a 3 mil rpm durante 20 minutos y se filtraron con filtros de 0.45 µm (Sartorius). El sobrenadante se diluyó con agua destilada y se pasó a viales para el análisis de glucosa, fructosa, sacarosa y ácido láctico por CLAE. Considerando todos los azúcares presentes, estos rendimientos se calcularon utilizando la siguiente ecuación:

$$Y_{p/s} = \frac{P - P_0}{S_0 - S}$$

Donde S es la concentración de azúcares totales a determinado tiempo de incubación (g L^{-1}); S_0 es la concentración de azúcares totales al inicio de la fermentación; P es la concentración de ácido láctico en el mismo determinado tiempo de incubación (g L^{-1}); P_0 es la concentración de azúcares totales al inicio (g L^{-1}). Los datos experimentales se analizaron utilizando el software comercial Excel 2007.

Resultados y discusión

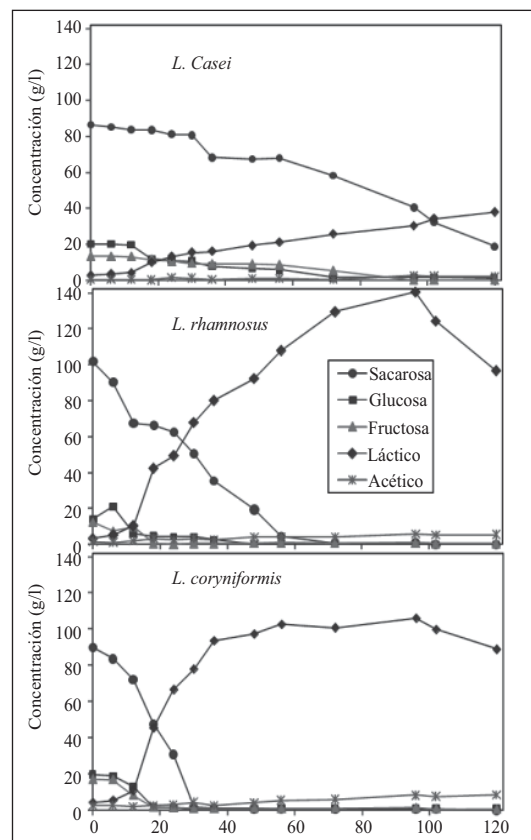
La figura 1 muestra las cinéticas de formación de producto y consumo de sustrato para los tres microorganismos utilizados. La fuente de nitrógeno para este ensayo fue 10 g L^{-1} de extracto de levadura y para neutralizar el ácido láctico formado en el medio de fermentación se adicionó carbonato de calcio en concentraciones de 100 g L^{-1} . Los resultados demuestran que al utilizar 10 g L^{-1} de extracto de levadura como fuente de nitrógeno y *L. rhamnosus* se alcanza la concentración más alta de ácido láctico.

Este comportamiento se debe principalmente al contenido en vitaminas y aminoácidos del extracto de levadura presentes en forma libre (Benthin y Villadsen, 1995) los cuales son cruciales en la primera etapa de las fermentaciones lácticas. Si se comparan los tres microorganismos ensayados, *L. rhamnosus* alcanzó concentraciones hasta 140.09 g L^{-1} , con una productividad volumétrica de $1.46 \text{ g/L}\cdot\text{h}$ con un 98.67% de consumo de azúcares. Por otra parte no se aprecia producción alguna de ácido acético, esto demuestra que *L. rhamnosus* siguió la ruta homofermentativa. Los resultados alcanzados para *L. casei* fueron más bajos, de sólo 37.80 g L^{-1} de ácido láctico después de 102 horas de fermentación. Este resultado es ligeramente menor que el alcanzado por Roukas y Kotzekidou (1996) que utilizaron una mezcla de células inmovilizadas de *Lactococcus Lactis* y *Lactobacillus casei* y después de 48 horas de fermentación obtuvieron concentraciones hasta de 48.3 g L^{-1} . En la figura 1 también se puede apreciar que tanto la glucosa como la fructosa fueron consumidas en su totalidad quedando una cantidad considerable de sacarosa sin consumir en el medio. Bustos y otros (2004a), alcanzaron concentraciones de ácido láctico en rangos que van desde $90.7\text{-}102.0 \text{ g L}^{-1}$ para *L. rhamnosus* mientras que para *L. casei* alcanzaron de 72.7 a 92.1 g L^{-1} , los valores más bajos los lograron con *L. coryniformis* a diferencia de este estudio que fue mayor.

La fuente de nitrógeno utilizada para la producción de ácido láctico fueron las lías de vinificación como único nutriente (Bustos y otros, 2004b). Hujanen y Linko (2001) demostraron que la producción de ácido láctico por *Lactobacillus casei* fue principalmente influenciada por el tipo y la concentración inicial de la fuente de

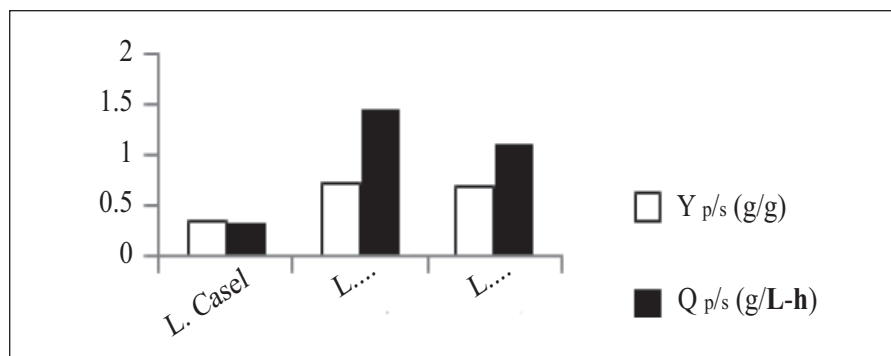
nitrógeno. La figura 2 muestra las diferencias que presentaron cada microorganismo ensayado, en ella se aprecia notablemente la actividad de *L. rhamnosus*, el cual alcanzó los valores más altos de la fermentación presentando una productividad de $1.46 \text{ g L}^{-1}\cdot\text{h}$ con un rendimiento en producto de 0.73 g g^{-1} . Estos resultados superan los presentados por Serna Cock y otros, 2007 que obtuvieron concentraciones de ácido láctico por encima de 70.19 g L^{-1} con rendimientos de 0.88 g/g^{-1} y productividades de 0.97 g L^{-1} utilizando una mezcla de jugos de hojas y cogollos y jugo de caña verde con *Lactococcus lactis subsp. Lactis* aislado de los mismos cultivos y adicionados con extracto de levadura en concentraciones de 3 por ciento.

Figura 1. Cinéticas de fermentación con 10 g/L de extracto de levadura



Fuente: elaboración propia.

Figura 2. Diferencias de rendimiento en producto (Yp/s) y productividad para *L.casei*, *L. rhamnosus* y *L. coryniformis*



Fuente: elaboración propia.

Conclusiones

Los resultados obtenidos muestran que el jugo residual de la caña de azúcar es un sustrato con buen potencial para ser utilizado en la producción de ácido láctico utilizando *L. rhamnosus* alcanzando las más altas concentraciones, las más altas conversiones de sustrato, los mayores rendimientos en producto y las mejores productividades volumétricas de ácido láctico, el uso del jugo como sustrato podía disminuir los costos operacionales en más del 50%, comparado con el uso de sustratos puros y daría un valor agregado importante a este residuo que se desecha en la industria de la caña.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo financiero de Fomix (Fondos Mixtos, Conacyt, gobierno del estado de Tamaulipas, Convenio 2007-13-73605) y Promep/103.5/07/3573.

Referencias

Anuradha R.; A.K. Suresh and K.V. Venkatesh (1999), "Simultaneous Saccharification and Fermentation of Starch to Lactic Acid", *Process Biochemistry*, 35, pp. 367-375.

- Benthin, S. and J. Villadsen (1995), "Production of Optically Pure D-Lactate by *Lactobacillus Bulgaricus* and Purification by Crystallization and Liquid/Liquid Extraction", *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 42(6), pp. 826-9.
- Blomqvist, J. (2001), "RIS Metropolis Monte Carlo Studies of Poly(l-lactic), Poly(l,d-lactic) and Polyglycolic Acids", *Polymer*, 42(8), pp. 3515-3521.
- Bueyuekkileci, A. and S. Harsa (2004), "Batch Production of L(+) Lactic Acid from Whey by *Lactobacillus casei* (NRRL B-441)", *J. Chemical Technol. Biotechnol*, 79(9), pp. 1036-1040.
- Bustos, G.; A.B. Moldes; J.M. Cruz and J.M. Domínguez (2004a), "Formulation of Low-Cost Fermentative Media for Lactic Acid Production with *Lactobacillus rhamnosus* using Vinification Lees as Nutrients", *J. Agric. Food Chem.*, vol. 52, pp. 801-808.
- Bustos, G.; A.B. Moldes; J.M. Cruz and J.M. Domínguez (2004b), "Evaluation of Vinification Lees as a General Medium for *Lactobacillus Strains*", *J. Agric. Food Chem*, vol. 52, núm. 16, pp. 5233-5239.
- Chopin, A. (1993), "Organization and Regulation of Genes for Amino Acid Biosynthesis in Lactic Acid Bacteria", *FEMS Microbiol. Reviews*, 12(1-3), pp. 21-37.
- Demirci, A. and A. Pometto (1992), "Enhanced Production of D(-)-Lactic Acid by Mutants of *Lactobacillus delbrueckii* ATCC 9649", *J. Ind. Microbiol*, 11, pp. 23-28.
- Garde, A.; G. Jonsson; A. Schmidt and B. Ahring (2002), "Lactic Acid Production from Wheat Straw Hemicellulose Hydrolysate by *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus brevis*", *Bior. Technol*, 81, pp. 217-223.
- Hofvendahl, K. and B. Hahn Hagerdal (1997), "L-Lactic acid production from whole wheat flour hydrolysate using strains of *Lactobacilli* and *Lactococci*", *Enzyme Microbiol. Biotechnol.* 20, pp. 301-307.
- _____ (2000), "Factors Affecting the Fermentative Lactic Acid Production from Renewable Resources", *Enzyme Microbial Technol*, 26(2-4), pp. 87-107.
- Hujanen, M.; S. Linko; Y. Linko and M. Leisola (2001), "Optimization of Media and Cultivation Conditions for L (+) (S)-Lactic Acid Production by *Lactobacillus casei* NRRL B-441", *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 56(1-2), pp. 126-130.
- Kashket, E. (1987), "Bioenergetics of Lactic Acid Bacteria: Cytoplasmic pH and Osmotolerance", *FEMS Microbiol*, rev. 46, pp. 233-244.
- Kyla Nikkila, K.; M. Hujanen; M. Leisola and A. Palva (2000), "Metabolic Engineering of *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 for Production of Pure L-(+)-Lactic Acid", *Appl. Environ. Microbiol*, 66(9), pp. 3835-3841.

- Lapierre, L.; J. Germond; A. Ott; M. Delley and B. Mollet (1999), "D-Lactate Dehydrogenase Gene (ldhD) Inactivation and Resulting Metabolic Effects in the *Lactobacillus Johnsonii* Strains La1 and N312", *Appl. Environ. Microbiol.*, 65(9), pp. 4002-4007.
- Mercier, P.; Yerushalmi, L.; Rouleau, D. and D. Dochain (1992), "Kinetics of lactic acid fermentation on glucose and corn by *Lactobacillus amylophilus*", *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 55, pp. 111-121.
- Pandey A; C. Soccol; J. Rodriguez and P. Nigam (2001), *Solid State Fermentation in Biotechnology: Fundamentals and Applications*, New Delhi, Asiatech Publishers.
- Roukas, T. and P. Kotzekidou (1996), "Continuous Production of Lactic Acid from Deproteinized Whey by Coimmobilized *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis* cells in a Packed-Bed Reactor", *Food Biotechnol.*, 10(3), pp. 231-242.
- Serna C. and S. Rodríguez de (2007), "Economical Production of Lactic Acid using Sugar Cane (*Saccharum officinarum* L.) Wastes and Juice", *Agricultura Técnica*, Chile, 67(1), pp. 29-38.
- Tsuji, H. (2002), "Autocatalytic Hydrolysis of Amorphous-Made Polylactides: Effects of L-Lactide Content, Tacticity, and Enantiomeric Polymer Blending", *Polymer*, 43(6), pp. 1789-1796.
- Zhou, S.; T. Causey; A. Hasona; K. Shanmugam and L. Ingram (2003), "Production of Optically Pure D-Lactic Acid in Mineral Salts Medium by Metabolically Engineered *Escherichia coli* W3110", *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(1), pp. 399-407.

Aditivos como mejoradores de la alimentación de pollos de engorda

Additives such as improvements feeding broilers

*S. Castillo Camacho,¹ J.C. Martínez González,¹ E.G. Cienfuegos Rivas,¹
J.J. Soto Castillo,¹ S.P. Castillo Rodríguez¹*

Resumen

La alimentación es el rubro más costoso en la producción de pollos de engorda. La investigación se realizó en la Unidad Avícola Experimental de la UAM Agronomía y Ciencias UAT en Ciudad Victoria, Tamaulipas, con el objetivo de evaluar el efecto de diferentes aditivos sobre el comportamiento de pollos de engorda. Se utilizaron 160 pollos, de una línea comercial, los cuales fueron colocados en una criadora tipo batería durante la primera semana, proporcionándoles alimento y agua *ad libitum*, además en el agua de bebida se adicionó un antibiótico para prevenir enfermedades broncorespiratorias y fueron vacunados contra New Castle. La unidad experimental consistió de 10 pollos que se asignaron a uno de cuatro tratamientos (TE = Testigo; sólo alimento comercial; PE = 10 mg de penicilina-g kg⁻¹ de alimento; OL = 10 mg de olaquinox kg⁻¹ de alimento; y OX = 10 mg de oxitetraciclina kg⁻¹ de alimento) y cuatro repeticiones por tratamiento. La duración del experimento fue de ocho semanas (iniciación – finalización), los datos fueron estudiados a través del análisis de varianza para un diseño experimental completamente al azar. Las variables evaluadas fueron: ganancia de peso total (GPT), ganancia de peso semanal (GPS), consumo de alimento (CA) y conversión alimenticia (CO). La media general de GPT fue de 1.985 kg, no se observaron efectos significativos (P>0.05)

¹ Facultad de Ingeniería y Ciencias, Universidad Autónoma de Tamaulipas, Centro Universitario Adolfo López Mateos, c.p. 87149, Apartado Postal 149, Ciudad Victoria Tamaulipas, tel. (834) 318 1800, ext. 2119, correo electrónico: jmartinez@uat.edu.mx

de tratamientos. Sin embargo, la GPT mejoró (4.5%) en los pollos que recibieron el tratamiento OX. La media de GPS en las dos etapas no fue afectada ($P > 0.05$) por los tratamientos. Observándose ganancias de peso semanal para las etapas de iniciación y finalización de 0.235 y 0.283 g, respectivamente. De igual modo, no se encontró efecto significativo ($P > 0.05$) de los tratamientos sobre CA y CO presentándose medias de 0.675 g y 2.323, respectivamente. Se concluye que bajo las condiciones del presente experimento la utilización de aditivos no fue efectivo en pollos de engorda.

Abstract

Food is the more expensive item in the production of broilers. This research was conducted in the Experimental Poultry Unit of UAM Agronomía y Ciencias UAT in Ciudad Victoria, Tamaulipas, in order to assess the effect of different additives on the behavior of broilers. 160 chickens, a commercial line, which were placed in a battery during the first week, providing them with food and water *ad libitum*, also in the drinking water an antibiotic was added to prevent pneumonia and were also vaccinated against New Castle. The experimental unit consisted of ten chickens assigned to one of four treatments (TE = control; only commercial food; PE = 10 mg penicillin-g kg⁻¹ of food; OL = 10 mg olaquinox kg⁻¹ of food; and OX = 10 mg oxytetracycline kg⁻¹ of food) and four repetitions by treatment. The duration of the experiment was eight weeks (initiation - termination), the data were studied with the analysis of variance for an experimental design completely randomized. Evaluated variables were: total weight gain (TWG) and weekly weight gain (WGG), food consumption (FC) and food conversion (FCO). The means of TWG was 1.985 kg, no significant effects were observed ($P > 0.05$) by treatments. However, the TWG improved (4.5%) in the poultry treated OX. The average of WGG in the two stages was not affected ($P > 0.05$) by treatments. Showing gains weekly weight for the stages of initiation and completion of 0.235 and 0.283 g, respectively. Similarly, found no significant effect ($P > 0.05$) of treatments on FC and FCO presenting 0.675 g and 2.323, respectively. It is concluded that under the terms of this experiment the use of additives was not effective in broilers.

Introducción

México enfrenta una escasez de alimentos de origen animal y vegetal debido a la creciente demanda por parte de la población. Además, existe un desequilibrio entre la producción de alimentos y el crecimiento demográfico, lo que obliga a realizar investigaciones para aumentar la producción de alimentos, buscando en un principio

satisfacer las demandas actuales y asegurar la autosuficiencia. Sin embargo, la producción de proteína de origen animal (carne y huevo) hoy en día se ve frenada por el incremento indiscriminado del costo de granos básicos, que se destinan a la producción de bio-combustibles.

La avicultura en México es una de las industrias más desarrolladas en todos los aspectos, pero al igual que los otros subsectores enfrenta una prolongada crisis por los altos costos de los alimentos. Gallardo y otros (2004), señalaron que los costos por concepto de alimentación representan 60% de los costos totales de la producción. Solucionar este aspecto, sin menoscabo de la productividad, ha motivado la búsqueda de diversas alternativas. Entre las cuales se pueden señalar los aditivos alimenticios; como aditivo alimenticio se entiende cualquier sustancia o mezclas de sustancias que están presentes en el alimento, este aditivo puede ser nutritivo o no nutritivo, fisiológicamente activo o inerte, estar intencionalmente y provocar algunos cambios en el individuo (Saldaña, 1984). Los mecanismos para explicar el efecto estimulante de los aditivos en el crecimiento son: *a)* se suprimen los microorganismos patógenos; *b)* se reduce la producción de toxinas microbianas depresoras del crecimiento; *c)* los agentes antimicrobianos reducen la carga microbiana de los nutrientes esenciales; *d)* hay un aumento en la eficiencia de la absorción y utilización de los nutrientes; y *e)* existe un efecto sustitutivo de microorganismos benéficos. Entre estos compuestos se incluyen los reguladores del crecimiento, anabólicos, promotores del crecimiento, enzimas, ionóforos, antibióticos, probióticos, ácidos orgánicos, agentes de repartición, etcétera.

Varios fármacos y un gran número de productos de fermentación se comercializan para su uso en los animales de granja, atribuyéndoles la virtud de estimular el desarrollo o mejorar de algún modo la salud y el rendimiento del animal. Recientemente, ante la posibilidad de encontrar residuos antimicrobianos o anabólicos en la carne, se ha dirigido la atención a los productores que utilizan estas sustancias y a los aspectos de salud relacionados con su uso (Henrique, 1998). Los promotores de crecimiento (olaquinox) han sido objeto de estudios desde que fueron introducidos por primera vez a la ganadería. Estos disminuyen la población de las bacterias intestinales de las aves que causan una disminución en el rendimiento, por lo que pollitos convencionales (cría natural) tenían un rendimiento casi igual al de los pollitos libres de patógenos cuando se les administró promotores de crecimiento (Corpet, 2000; Walton, 1982).

Los antibióticos se utilizan a nivel sub-terapéutico para promover el crecimiento, mejorar la conversión de alimento y reducir la mortalidad. Si bien los antibióticos no pueden corregir errores en la alimentación o en la explotación, su acción será en todo caso tanto más eficaz, cuanto más bajo sea el nivel sanitario de la explotación. Ante el riesgo de encontrar residuos de antibióticos en la carne y huevo, la Comunidad Económica Europea suspendió el uso de antibióticos desde 1997. Sin embargo en

América, las dosis permitidas son alrededor de 20 ppm (= 20 g t⁻¹), los animales que reciben los antimicrobianos crecen más rápido y más uniformemente que los testigos (la ganancia diaria mejora de 3 a 9%). Ellos tienen una menor ingesta de alimento por ganancia de peso (el índice de conversión alimenticia se mejora de 3 a 12%), y liberan menos nitrógeno en el medio ambiente (Corpet, 2000). El mecanismo de acción de los antibióticos como promotores del crecimiento es aún especulativo, ya que la promoción del crecimiento se debe probablemente a una modificación de la flora intestinal, porque los antibióticos inhiben el crecimiento de las bacterias patógenas. Además, los antimicrobianos solo son factor de crecimiento mientras conservan la potencia como antimicrobianos. La mayoría de los estudios no muestran cambios en la composición de la flora intestinal durante la suplementación de los antimicrobianos promotores del crecimiento. Los antimicrobianos suprimen el catabolismo bacteriano de urea y aminoácidos, tanto *in vitro* como *in vivo* y disminuyen la fermentación de los carbohidratos y la descomposición de sales biliares.

Sin embargo, existe preocupación por la presencia de residuos en carne y huevo; lo que ha creado el deseo de buscar alternativas para sustituir a los antibióticos y ciertas hormonas (Henrique, 1998; Khor, 1996). Además, Odunsi y Onifade (1998) señalaron que con el uso indiscriminado de antibióticos se han encontrado super gérmenes resistentes a los antibióticos: 86% de las muestras de bacterias de esos animales presentaban cierto grado de resistencia a la ampicilina y 58% de las muestras de bacterias presentaron cierta resistencia a la amoxicilina. La resistencia de las bacterias a esas drogas implica que ya no surtirán efecto.

Ante la creciente evidencia del peligro, varios países, entre ellos Australia, Francia y Suiza, han prohibido o restringido severamente el uso de antibióticos en las raciones para animales.

Hay pruebas más que suficientes de que la autorregulación de la industria de la cría de animales en materia de seguridad no funciona, la seguridad de todos debe ser más importante que las ganancias de algunos. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la adición de un promotor de crecimiento (Olaquinox) y dos antibióticos comerciales (Penicilina-g y Oxitetraciclina) en el alimento de pollos de engorda sobre el comportamiento animal.

Materiales y métodos

La presente investigación se llevó a cabo en la Unidad Avícola Experimental de la Unidad Académica Multidisciplinaria Agronomía y Ciencias de la Universidad

Autónoma de Tamaulipas en Cd. Victoria, Tamaulipas. Antes de realizar el experimento la unidad fue limpiada, desinfectada con una solución yodada (Isodine®) y las paredes fueron quemadas y encaladas. Además, las baterías y todos los materiales que se utilizaron en esta investigación fueron debidamente lavados y desinfectados con la misma solución.

Se utilizaron 160 pollos de engorda de una línea comercial sin sexar; los cuales fueron colocados en una criadora tipo batería durante la primera semana (adaptación), se les proporcionó alimento y agua a libre voluntad, además de la adición de antibiótico (Valsyn®) en el agua de bebida para prevenir enfermedades broncorespiratorias, también la primera semana se les aplicó la vacuna contra el Newcastle (vía ocular).

El alimento comercial fue sometido a un análisis proximal para determinar los valores nutrimentales para las dos fases (iniciación y finalización), en el Laboratorio de Nutrición Animal de la UAM Agronomía y Ciencias UAT (cuadro 1).

Cuadro 1. Composición nutrimental del alimento comercial para pollos de engorda para iniciación y finalización

<i>Nutrimento</i>	<i>Iniciación (%)</i>	<i>Finalización (%)</i>
Humedad	3.40	3.10
Proteína	23.72	21.40
Grasa	3.00	3.20
Fibra	4.60	5.00
Cenizas	5.00	5.50
Extracto libre de nitrógeno	63.68	64.90

Fuente: elaboración propia.

De igual modo, fueron tomadas muestras de heces al principio y al final del experimento para determinar el grado de infestación de parásitos, el análisis coproparasitológico fue realizado en el Laboratorio de Patología Animal en Ciudad Victoria, Tamps. Se hicieron grupos homogéneos de 10 pollitos, quedando 16 unidades experimentales a las que se les asignó uno de cuatro tratamientos como se muestra en el cuadro 2.

Cuadro 2. Tratamientos experimentales de aditivos en el alimento comercial para pollos de engorda

<i>Tratamiento</i>	<i>Dosis</i>
Testigo	Sólo alimento comercial
Olaquinox	10 mg kg-1 de alimento
Penicilina-g	10 mg kg-1 de alimento
Oxitetraciclina	10 mg kg-1 de alimento

Fuente: elaboración propia.

Las cuatro primeras semanas los pollitos se mantuvieron en las criadoras tipo baterías (fase de iniciación), para luego pasarlos a piso en jaulas de 1 x 1 m utilizando paja de sorgo y viruta de madera como cama (fase de finalización). La toma de datos se realizó diariamente para consumo de alimento y para ganancia de peso se hizo semanalmente.

Para evaluar la ganancia de peso total, ganancia de peso semanal, consumo de alimento y conversión alimenticia, se empleó el análisis de varianza para un diseño completamente al azar con arreglo de contrastes ortogonales (Cochran y Cox, 1981).

Resultados y discusión

Ganancia de peso semanal

En el presente experimento el promedio de ganancia de peso semanal fue de 259 ± 35 g, durante la etapa de iniciación los pollos tuvieron una ganancia de peso semanal de 235 ± 058 g, mientras que en la fase de finalización sólo alcanzaron 283 ± 012 g (cuadro 3), las cuales se deben considerar como bajas debido a que lo pollos durante estas fases deberían tener ganancias aproximadas de 322 y 432 g, respectivamente (NRC, 1984). Cabral y Melo (2006) señalaron que la ganancia de peso durante las fases de iniciación y finalización en pollos alimentados con miel fina de caña de azúcar ganaron 324 y 702 g, respectivamente. Se observó que la ganancia de peso semanal no fue afectada ($P > 0.05$) por los tratamientos, aunque cabe destacar que los pollos que recibieron la oxitetraciclina ganaron más peso (4.5%) que los del grupo testigo (cuadro 3). Williams (1985) encontró que los pollos que recibieron la oxitetraciclina como promotor del crecimiento superaron a los del grupo testigo en 11.4 por ciento. De igual modo, Terán (1978) observó que los pollos alimentados con 25 ppm de oxitetraciclina obtuvieron 16.6% más de ganancia de peso que los del grupo testigo. Asimismo, Martínez y

otros (2008) mencionaron que los pollos durante la fase de iniciación tuvieron ganancias de peso semanal de 213 g.

Cuadro 3. Ganancia de peso semanal de pollos alimentados con una dieta comercial adicionada con antibióticos y olaquinox durante el periodo de engorde

<i>Tratamiento</i>	<i>N</i>	<i>Fase</i>	
		<i>Iniciación (g)</i>	<i>Finalización (g)</i>
Testigo	4	273 ± 076	280 ± 009
Olaquinox	4	235 ± 065	279 ± 015
Penicilina-g	4	214 ± 013	280 ± 006
Oxitetraciclina	4	217 ± 076	293 ± 019
Total	16	235 ± 058	283 ± 012

Fuente: elaboración propia.

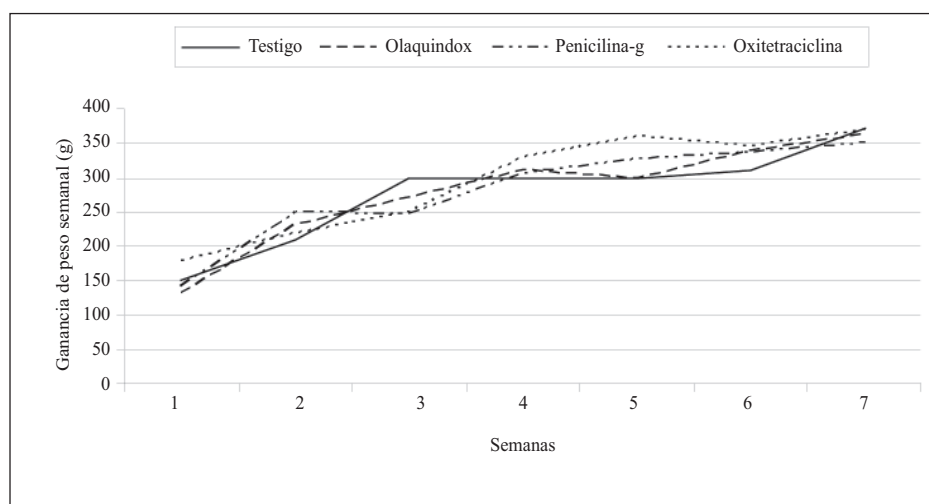
En la figura 1, se observan las curvas de ganancia de peso semanal, se puede notar que al momento en el que a los pollos se les cambió el manejo, al ser bajados a piso (cuarta semana), la ganancia de peso disminuyó, siendo más marcado en los pollos que no recibieron antibióticos (testigo y olaquinox), esto posiblemente debido al estrés que sufrieron durante el manejo.

Ganancia de peso total

En el presente experimento la media general para la ganancia de peso total durante el periodo de engorda fue de 1.985 kg. Sin embargo, este valor se puede considerar como bajo, debido a que la NRC (1984) señala que los pollos de engorda a las siete semanas deberán tener un peso medio de 3.458 kg. Similarmente, Cabral y Melo (2006) señalaron que la ganancia de peso total a los 42 días de edad de pollos alimentados con miel fina de caña de azúcar fue de 2.106 kg.

En el cuadro 4 se presentan las medias de ganancia de peso total por tratamiento. Se observa que los pollos que recibieron el tratamiento de 10 mg de olaquinox kg⁻¹ de alimento fueron los que mostraron la menor ganancia total de peso (1.955 kg), mientras que los pollos que recibieron el tratamiento con oxitetraciclina alcanzaron una media de ganancia de peso total de 2.055 kg (cuadro 4). Al igual que en la ganancia de peso semanal, los tratamientos no afectaron ($P > 0.05$) la ganancia de peso total.

Figura 1. Ganancia de peso por semana de pollos tratados con antibióticos y olaquinox durante el periodo de engorda



Fuente: elaboración propia.

Cuadro 4. Medias de ganancias de peso total durante el periodo de engorde en pollos parrilleros alimentados con antibióticos y olaquinox

Tratamientos	N	Ganancia de peso total (kg)
Testigo	4	1.966 ± 0.063
Olaquinox	4	1.955 ± 0.107
Penicilina-g	4	1.962 ± 0.043
Oxitetraciclina	4	2.055 ± 0.137
Total	16	1.985 ± 0.088

Fuente: elaboración propia.

Consumo de alimento

La media general de consumo de alimento semanal fue de 675 g. Odunsi y Onifade (1998) encontraron que la penicilina procaína estimuló estadísticamente ($P < 0.05$) la ingestión de alimento. Al igual que para ganancias de peso, el análisis se dividió en dos etapas que fueron iniciación y finalización.

En el cuadro 5 se puede apreciar que los consumos de alimento para las etapas de iniciación y finalización fueron 369 ± 8 y 675 ± 44 g, respectivamente, no existiendo diferencias estadísticas significativas ($P > 0.05$) entre los tratamientos en ninguna de las dos etapas antes mencionadas. Se observó que en la etapa de iniciación, los pollos que recibieron la oxitetraciclina consumieron 0.54% menos alimento que el tratamiento testigo, similar comportamiento fue presentado por los pollos del tratamiento con olaquinox. Cabral y Melo (2006) señalaron que el consumo semanal de alimento de un lote de pollos de engorda alimentados con miel fina de caña de azúcar fue de 693 y 859 g para las etapas de iniciación y finalización, respectivamente.

Cuadro 5. Promedio del consumo de alimento comercial adicionado con antibióticos u olaquinox por semana de pollos de engorda en dos fases de crecimiento

<i>Tratamiento</i>	<i>Etapas</i>	
	<i>Iniciación (g)</i>	<i>Finalización (g)</i>
Testigo	368 ± 4	662 ± 64
Olaquinox	368 ± 10	689 ± 68
Penicilina-g	374 ± 4	674 ± 13
Oxitetraciclina	366 ± 15	674 ± 30
Total	369 ± 8	675 ± 44

Fuente: elaboración propia.

Los pollos del tratamiento con penicilina-g consumieron 1.6% más que el tratamiento testigo, estos resultados coinciden con lo reportado por Khajarem y otros (1983), quienes mencionaron que los pollos alimentados con 10 ppm de olaquinox, consumieron 1.354 kg promedio de cuatro semanas, mientras que para el tratamiento testigo consumieron 1.364 kg, no siendo diferentes estadísticamente ($P > 0.05$). En la etapa de finalización no se encontraron diferencias estadísticas significativas ($P > 0.05$), sin embargo, el tratamiento testigo consumió 4.1% menos que el tratamiento de olaquinox y 1.8% menos que los tratamientos con penicilina-g y oxitetraciclina, observándose una tendencia a incrementar el consumo de alimento en cada etapa. A este respecto Williams (1985) reporta un consumo de alimento de $73.4 \text{ g día}^{-1} \text{ animal}^{-1}$ para el tratamiento de oxitetraciclina, valor inferior al encontrado en el presente trabajo, donde se halló un consumo de $96.3 \text{ g día}^{-1} \text{ animal}^{-1}$ con una dosificación de 10 ppm mientras que Williams (1985) administró 20 ppm de oxitetraciclina en el alimento.

Conversión alimenticia

La media general de conversión alimenticia fue de 2.32 ± 0.111 . Resultados similares fueron citados por Cabral y Melo (2006) quienes encontraron que la conversión alimenticia en un lote de pollos de engorda alimentados con miel fina de caña de azúcar fue de 2.342. Odunsi y Onifade (1998) concluyeron que la penicilina promovía eficazmente la conversión alimenticia y parece una estrategia factible para conseguir altas tasas de inclusión de ingredientes fibrosos de bajo precio, tales como los residuos de cervecera, en la dieta de los pollos. Con respecto a la conversión alimenticia, se evaluó en las dos etapas mencionadas (cuadro 6), no encontrándose diferencias estadísticas significativas ($P > 0.05$).

Cuadro 6. Promedio de conversión alimenticia para pollos de engorda alimentados con olaquinox y antibióticos en dos fases de crecimiento

<i>Tratamiento</i>	<i>Iniciación 1-4 semanas</i>	<i>Finalización 5-8 semanas</i>
Testigo	1.70 ± .163	2.30 ± .148
Olaquinox	1.76 ± .152	2.27 ± .042
Penicilina-g	1.79 ± .097	2.48 ± .176
Oxitetraciclina	1.74 ± .247	2.24 ± .078
Total	1.76 ± .164	2.32 ± .111

Fuente: elaboración propia.

En la etapa de iniciación no se observaron diferencias estadísticas significativas ($P > 0.05$), donde el tratamiento testigo reporta una mejor conversión alimenticia (1.70) que los tratamientos que incluyeron aditivos. Sin embargo, dentro de los tratamientos con aditivos, se observó una tendencia a mejorar la utilización del alimento en las aves alimentadas con raciones de oxitetraciclina. Al respecto Khajarern y otros (1983), reportaron una conversión alimenticia de 1.57 al suministrar 10 ppm de olaquinox a las cuatro semanas, conversión inferior a la obtenida en el presente experimento. Sin embargo, Williams (1985), reportó una conversión alimenticia de 1.82 en pollos tratados con 20 ppm de oxitetraciclina, valor superior al obtenido en el presente experimento, con respecto a los cuatro tratamientos.

Por su parte, Cabral y Melo (2006) encontraron que la conversión alimenticia en un lote de pollos de engorda alimentados con miel fina de caña de azúcar fue de 2.185 para la etapa de iniciación. Asimismo, en la etapa de finalización no se encontró efecto significativo ($P > 0.05$) de los tratamientos sobre la conversión

alimenticia. Los pollos que recibieron el tratamiento con penicilina-g mostraron la menor conversión alimenticia (2.48). Resultados similares fueron mencionados por Cabral y Melo (2006) quienes encontraron que la conversión alimenticia en un lote de pollos de engorda alimentados con miel fina de caña de azúcar fue de 2.498 para la etapa de finalización. Sin embargo, Khajareen y otros (1983) reportaron una conversión alimenticia a las ocho semanas de 2.21 en pollos de engorda, suministrando 10 ppm de olaquinox.

Conclusiones

Con base en los resultados obtenidos en las condiciones en que se realizó la presente investigación se concluye lo siguiente: el comportamiento productivo de los pollos fue similar para todas las variables en estudio, ya que los valores fueron estadísticamente semejantes entre los tratamientos evaluados. El uso de promotores de crecimiento y antibióticos no demostraron promover eficazmente la ganancia de peso y conversión alimenticia, por lo que se sugiere no utilizarlos para no generar resistencia pasiva.

Referencias

- Cabral, C.P.H.N.S. Melo (2006) “Miel final de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) en la alimentación de pollos de ceba en diferentes fases de desarrollo”, *Información Tecnológica*, 17(6), pp. 85-96.
- Chochran, W.G. y G.M. Cox (1981), *Diseños experimentales*, México, UTEHA, 661 p.
- Corpet, D. E. (2000), “Mechanism of Antimicrobial Growth Promoters used in Animal Feed”, *Revue de Medecine Veterinaire*, 151(2), pp. 99-104.
- Gallardo, N.J.L.; L. Villamar A.; H. Guzmán V. y N. Ruiz S. (2004), “Situación actual y perspectiva de la producción de carne de pollo en México 2004”, *Claridades Agropecuarias*, 130, pp. 3-22.
- Henrique A.P.F. (1998), “Efeito de Probióticos, Antibióticos e Ácidos Orgânicos e suas Combinações sobre o Desempenho e Rendimento de Carcaça de Frangos de Corte”, *Dissertação, Pirassununga, SP*, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos.
- Khajareen, S.J.M.; D. Bunsidhi y S. Yodserance (1983), “Los efectos promotores de Bayo-n-ox, la lincomicina y el ácido arsanílico en pollos de engorda”, *Boletín Informativo*, México, Bayer, S. A.
- Khor, M. (1996), “Peligro de los antibióticos en la alimentación de los animales”, *Revista del sur*, núm. 62, pp.15-19.

- Martínez González J.C.; F. Martínez Herrera; J.J. Soto Castillo y S.P. Castillo Rodríguez (2008), *Probióticos en el comportamiento de pollos de engorda en la fase de iniciación*.
- NRC (1984), *Nutrient requirements of poultry*, Washington, National Research Council, National Academy Press, 71 pp.
- Odunsi, A.A. y A.A. Onifade, (1998), “Efficacy of Procaine Penicillin as a Growth Promoter in Broiler Chicks Fed Low and High Fibre Diets in the Tropics”, “La penicilina procaína como promotora del crecimiento en pollos broiler alimentados con dietas de baja y alta fibra en el trópico”, *Archivos de Zootecnia*, 47(180), pp. 621-628.
- Saldaña, G.G.A. (1984), “Digestibilidad in Vivo de Raciones Completas que Incluyen Diferentes Niveles de Monensin”, *Seminario de Investigación II*, Cd. Victoria Tamaulipas, Facultad de Agronomía UAT, p. 35.
- Terán, J.E.R. (1978), “Uso de antibióticos como promotores de crecimiento en pollos de engorda”, *Seminario de Investigación II*, Cd. Victoria, Universidad Autónoma de Tamaulipas, Facultad de Agronomía, p. 38.
- Walton, J.R. (1989), *Industria Porcina*, Reino Unido, Universidad de Liverpool, Departamento de Ciencias Veterinarias, Chester High Road, Neston, Wirral, p. 6-10.
- Williams, B.J. (1985), “The Effects of Neomycin and Oxytetracycline Alone or Combined Upon the Incidence of Salmonellosis in Broiler Chickens”, *Poultry Science*, 64(8), pp. 1455-1457.

Parasitoides nativos: la mejor opción para el control de la mosca del cuerno en Tamaulipas, México
Native parasitoids: the best option to control hornfly in Tamaulipas, Mexico

Juan Fidencio Luna Salas,^{1*} Jesús Loera Gallardo,²
Gary A. P. Gibson,³ Enrique Ruíz Cancino¹

Resumen

En el estado de Tamaulipas existe una población de más de un millón de cabezas de ganado bovino y una producción aproximada de 250 mil crías al año. A partir de 1998 se ha estado trabajando en la búsqueda de parasitoides de la mosca del cuerno (o de la paleta), *Haematobia irritans* (L.). Se recogieron excretas en ranchos de los municipios de Victoria y Güemes (zona centro), Reynosa (zona norte) y Aldama (zona sur), las que se procesaron mediante la técnica de flotación para la obtención de puparios y, a partir de ellos, los parasitoides. Las avispas obtenidas fueron enviadas en 1999 para su determinación taxonómica a la Canadian National Collection of Insects (CNC), encontrando seis especies parasíticas: *Trybliographa foster* (Cynipoidea: Eucoilidae), *Trichopria haematobiae* (Ashmead) (Proctotrupeoidea: Diapriidae), *Spalangia nigroaenea* Curtis, *Spalangia haematobiae* Ashmead, *Spalangia drosophilae* Ashmead y *Erotolepsia* sp. (Chalcidoidea: Pteromalidae). En 2006 se enviaron para identificación otros 625 especímenes de parasitoides a Canadá, reportándose 10 especies de Pteromalidae, dos especies de

¹ Unidad Académica Multidisciplinaria Agronomía y Ciencias, Universidad Autónoma de Tamaulipas, Ciudad Victoria, Tamaulipas,* correo electrónico: jluna@uat.edu.mx

² Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, Río Bravo, Tamaulipas.

³ Canadian National Collections of Insects (CNC), Agriculture and Agri-Food Canada, Ottawa, Canada.

Diapriidae - *Trichopria haematobiae* (Ashmead) y *Trichopia* sp., así como algunos Cynipoidea no determinados. Los Pteromalidae son *Spalangia nigroaenea* Curtis-404 individuos, *S. cameroni* Perkins-12, *S. drosophilae* Ashmead-34, *S. endius* Walker-37, 2 nuevas especies de *Spalangia* y otra especie no identificada de *Spalangia*; además de *Muscidifurax raptor* Girault & Saunders-25, *M. zaraptor* Kogan & Legner-32 y *Pachycrepoideus vindemiae* (Rondani). *Spalangia nigroaenea* fue la especie más común, representando más del 60% del material identificado, por lo que se utilizó para cría masiva. Las liberaciones de esta especie en ranchos ganaderos de Tamaulipas han dando buenos resultados, disminuyendo la población de la mosca del cuerno.

Abstract

The State of Tamaulipas has a population of more than one million of bovine cattle, and an approximate production of 250 thousand calves/year. Since 1998, authors have been worked in the search of the hornfly, *Haematobia irritans* (L.) parasitoids. Cattle feces were taken in ranches from the municipalities of Victoria and Güemes (central zone), Reynosa (north zone) and Aldama (south zone), and processed by the flotation technique for puparia and parasitoid obtention. Wasps obtained were sent in 1999 for taxonomical determination to the Canadian National Collection of Insects (CNC), finding 6 parasitic species: *Trybliographa foster* (Cynipoidea: Eucoilidae), *Trichopria haematobiae* (Ashmead) (Proctotrupoidea: Diapriidae), *Spalangia nigroaenea* Curtis, *Spalangia haematobiae* Ashmead, *Spalangia drosophilae* Ashmead, and *Erotolepsia* sp. (Chalcidoidea: Pteromalidae). Other 625 specimens were sent in 2006 for identification to Canada, recording 10 species of Pteromalidae, 2 species of Diapriidae-*Trichopria haematobiae* (Ashmead) and *Trichopia* sp., and some undetermined Cynipoidea. Pteromalids are *Spalangia nigroaenea* Curtis-404 individuals, *S. cameroni* Perkins-12, *S. drosophilae* Ashmead-34, *S. endius* Walker-37, 2 new species of *Spalangia* and other unidentified species of *Spalangia*; *Muscidifurax raptor* Girault & Saunders-25, *M. zaraptor* Kogan & Legner-32 and *Pachycrepoideus vindemiae* (Rondani). *Spalangia nigroaenea* was the most common species, representing more than 60% of the identified material, and was used for masive rearing. Releases in cattle ranches in Tamaulipas had good results, diminishing the horn fly population.

Introducción

La mosca del cuerno *Haematobia irritans* (L.) fue introducida de Europa a Estados Unidos. Hoy día está diseminada en todo el Continente Americano, donde solamente

se han tratado de controlar los adultos, principalmente mediante la aplicación de insecticidas, lo que ha resultado generalmente en un fracaso debido, entre otras cosas, a la capacidad que tiene la mosca para desarrollar fácilmente mecanismos de resistencia a los plaguicidas, su gran adaptación al medio ambiente y su alta capacidad reproductiva (Quijada y otros, 1997). Es una de las especies que se ha constituido como una plaga de interés económico en la ganadería de las áreas tropicales y subtropicales (Santamaría y otros, 1995). Desde 1988 se estableció como la plaga más importante para el ganado bovino en Tamaulipas, donde existe una población de más de un millón de cabezas y una producción aproximada de 250 mil crías al año (Del Valle, 1990).

Por cada adulto de mosca del cuerno que se ve volando, puede haber hasta 900 larvas en proceso de desarrollo, lo que hace que tenga un gran impacto económico en las explotaciones pecuarias, donde se han reportado pérdidas en aumento del peso de los animales de 8-22%, es decir, de 27 a 339 g de carne / animal / día y de 17 kg de leche / animal / 5 semanas, principalmente porque esta plaga se alimenta de la sangre de los animales, produciéndole un estrés continuo por los múltiples piquetes que les produce y por ser transmisoras de enfermedades. La mosca del cuerno es un insecto hematófago, de los más persistentes y molestos parásitos externos del ganado (Harris, 1962). Aunque su nombre común se debe al hábito de congregarse alrededor de los cuernos (Harwood y James, 1979), es frecuente encontrarla en la cabeza, dorso o abdomen de los animales. Además del ganado bovino puede también atacar a otras especies como cabras, caballos, perros, borregos y ocasionalmente a los humanos (Quiroz, 1978). Harwood y James (1979) mencionan que no es raro encontrar de 1 mil a 4 mil moscas por animal aunque se han observado hasta 10 mil y 20 mil moscas, indicando que bajo tales condiciones la pérdida de sangre es significativa. Si se estima que cada mosca succiona una gota de sangre al día (0.05 cc), una infestación de 5 mil moscas podrían consumir cerca de 250 cc de sangre, equivalente al 1% del volumen de sangre de un animal de 500 kg. El umbral económico no se ha establecido pero en Estados Unidos generalmente se acepta como umbral una cantidad entre 50 y 300 moscas (Clymer, 1995) mientras que en el estado de Texas se considera de 250 moscas por animal (Cocke y otros, 1990).

El ganado, al defenderse constantemente de las moscas, pierde calorías y energía que podrían ser utilizadas para la producción de carne y leche; el pastoreo y la alimentación normal se ven afectados, reduciéndose la eficiencia del animal (Newton, 1971; Metcalf y Flint, 1972). Densidades de población mayores a 400 moscas del cuerno por animal tienen el potencial para poner en peligro su salud (Summerlin y Fincher, 1961). Se estima que las infestaciones no controladas llegan a provocar alteraciones digestivas que reducen la utilización del forraje y del alimento consumido,

pudiéndose originar pérdidas de hasta 250 g de carne o un litro de leche al día (Newton, 1971). Por otra parte, el ganado joven libre de moscas del cuerno aumenta de peso en 225 g diarios, en comparación con el ganado infestado (Del Valle, 1990). Infestaciones de la mosca del cuerno han sido controladas mediante aplicaciones de insecticidas a los animales, sin embargo, se ha reportado resistencia a los insecticidas piretroides sintéticos desde hace 25 años (Sparks y otros, 1985). La aplicación de dosis mayores de insecticidas o el uso de insecticidas más potentes pueden causar problemas que incluyen toxicidad a los animales, residuos tóxicos en carne y leche, y contaminación ambiental (Summerlin y Fincher, 1961; Stephen y Wilfred, 1996; Temeyer, 1998). Desde 1990 los piretroides sintéticos como fenvalerate, deltametrina y permetrina han mostrado fallas en el control y disminución de su efecto contra la mosca del cuerno. Inicialmente, la ineffectividad de estos productos químicos fue detectada en la región de la Huasteca Veracruzana, Potosina y Tamaulipeca, y posteriormente en Chiapas, Tabasco, Jalisco y Sinaloa (Santamaría y otros, 1995). La resistencia a fenvalerate ha sido más evidente que la mostrada al insecticida organofosforado coumaphos (Kunz, 1995). Las pérdidas económicas en los rebaños bovinos se debe al uso ineficiente de insecticidas. Un mejor programa de control se logra cuando se hace una rotación de insecticidas con diferentes principios activos (Quijada y otros, 2002).

El problema de control de *H. irritans* hace que se investiguen nuevas alternativas de control que disminuyan las poblaciones de la mosca y que no afecten el medio ambiente y la salud pública, como sucede con el control químico (Rodríguez y otros, 2008). Estudios previos realizados por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) para efectos de control de la mosca, determinaron que, en laboratorio, el pigmento Floxin B fue efectivo para eliminar la mosca del cuerno. Sin embargo, su efectividad sólo se manifiesta cuando el pigmento es ingerido, lo que se podría lograr al mezclarlo con un “atrayerente” que hasta la fecha no ha sido posible desarrollar para un control en campo. También han sido evaluados diversos tipos de trampas y sustancias como atrayentes para efectos de monitoreo, obteniéndose una muy baja efectividad en su atracción para los adultos de la mosca. El seguimiento de los estudios anteriores fue muy accesible aunque el logro de las metas fue errático, dada la competencia por atracción *per se* que el animal ejerce, en comparación con un atrayerente sintético para control o monitoreo.

De acuerdo con lo anterior, la alternativa más viable para el control de la mosca del cuerno en laboratorio y campo es la liberación de parasitoides. La técnica más adecuada debe ser el control biológico, mediante el uso de sus enemigos naturales (parasitoides, depredadores y patógenos). Sin embargo, el control de la plaga deberá ser con especies o ecotipos de una región determinada, lo que además dará

información sobre nuevas y diferentes especies de enemigos naturales, de acuerdo con la ecología de los distintos sitios de muestreo, en cada zona de la entidad, información necesaria para lograr la eficiencia en el control de la plaga. Sin embargo, se deberá sortear la problemática de reproducir esos enemigos naturales, así como la determinación del número de enemigos naturales a liberar en campo para alcanzar el control de la mosca y mantenerla debajo del umbral económico. En Tamaulipas se han reportado cuatro especies del género *Spalangia* y dos especies en Nuevo León (Ruíz y Coronado, 2002). Existen varias especies de parasitoides que atacan a la mosca del cuerno, habiéndose liberado en Tamaulipas solamente parasitoides traídos de Estados Unidos como *Spalangia endius* y *Muscidifurax raptor*. Loera y otros (2008) propusieron las liberaciones de *Spalangia nigroaenea* en Tamaulipas.

La meta de este programa es lograr la reducción de las poblaciones de la mosca del cuerno a niveles sub-económicos, contando con establecer una recomendación a futuro en la que se puedan señalar las dosis, épocas y frecuencia de las liberaciones de los enemigos naturales en las distintas zonas de Tamaulipas. Con la implementación del control biológico de la plaga, se reducirán los costos de producción del ganado, la producción de carne no se verá contaminada y por lo tanto tendrá mayor aceptación en los mercados más exigentes lo que tendrá un alto impacto económico. Además, los ganaderos incrementarían su productividad y las posibilidades de exportar. Se tendría una mejora de vida en las personas del medio rural al contar el ganadero con mayores ingresos económicos que le permitan pagar mejores sueldos a sus trabajadores y el abastecimiento de carne para consumo humano contará con una buena calidad de inocuidad alimentaria lo que será fundamental para prevenir y evitar enfermedades a futuro.

El objetivo de este trabajo es difundir los resultados del programa de investigación para el control biológico de la mosca del cuerno en Tamaulipas, México.

Materiales y métodos

Los trabajos se llevaron a cabo en seis municipios: Reynosa de la Zona Norte, Güemes, Victoria y Soto la Marina de la Zona Centro, y Aldama y Xicoténcatl de la Zona Sur de Tamaulipas. El número de ranchos ganaderos y/o lecheros que se han incluido en los muestreos han sido 34, de los cuales cuatro son de la Zona Norte (El 50, El 60, El 70 y La Estrella) mientras que en la Zona Centro han sido ocho (El Prieto, La Esperanza, El Edén, Cruz Verde, Los Tres García, Posta Zootécnica UAT, La Escondida y El Olmo) y en la Zona Sur han sido 22 (La Gloria, Taurus, Cantera, Santa Martha, 22 de

Diciembre, El Fenicio, Dos Arroyos, San Patricio, Las Galias, Las Muchachas, Lucero, Sierra Ventana, Tepehuajes, El Guayabo, El Barrunte, El Africano, La Bota, El Paraíso, San Jorge, El Horizonte, Los Leones y La Joya).

Los trabajos de investigación se iniciaron desde 1998, realizándose tanto en campo como en laboratorio, consistiendo en la recolección de excretas (estiércol) en los ranchos señalados, principalmente de corraleras y sesteaderos; las muestras fueron etiquetadas con los siguientes datos: fecha, nombre del rancho, sitio de recolección, propietario y municipio. Los trabajos de laboratorio se llevaron a cabo en Control Biológico Mexicano (COBIMEX), donde las muestras de campo fueron procesadas para la obtención de los puparios mediante la técnica de flotación (Morgan y Thomas, 1969). Los puparios obtenidos fueron lavados con agua y pasados después por agua con cloro al 5% para su desinfección, nuevamente enjuagados con agua limpia y colocados sobre papel toalla para su secado. Posteriormente fueron colocados en copas de plástico transparente con tapa del mismo material para esperar la emergencia de los parasitoides o adultos de mosca; las copas fueron etiquetadas de acuerdo con el sitio de recolección (corraleras y/o agostaderos) y de la localidad. Los parasitoides emergidos fueron obtenidos de los recipientes plásticos mediante un succionador manual y colocados en nuevos recipientes, siendo clasificados de acuerdo con su tamaño, color y forma bajo microscopio estereoscópico, montándose algunos en alfileres entomológicos para su envío a clasificación mientras que el resto fue colocado en recipientes plásticos con alcohol al 70% y etiquetados. No se disectaron puparios para detectar parasitoides no emergidos. Los parasitoides obtenidos fueron identificados por G. Gibson.

De los cinco parasitoides clasificados inicialmente, se consideró reproducir dos especies, *Spalangia haematobiae* y *S. nigroaenea*, como los que podrían ayudar mejor en el control de *H. irritans*, de acuerdo con los resultados obtenidos. Ambas especies se trataron de reproducir en un hospedero alterno, la mosca doméstica *Musca domestica*. Sin embargo, por alguna razón se dificultó la reproducción de *Spalangia haematobiae* no así la de *S. nigroaenea*, de la que se logró su reproducción masiva. Además, esta especie fue con mucho la especie dominante en los estudios previos, lo que motivó a iniciar su reproducción masiva. Se hicieron liberaciones en los ranchos siguientes: “El Guayabo”, “Don Santiago”, “El Africano” de Fernando González Quiroga, “La Bota” de Francisco Velazco, “San Jorge” de Jorge de la Vega Grajales, “El Lucero” de Artemio Garza Flores y “Las Muchachas” de José Luis Adame. Se realizaron las liberaciones al contarse de 200 a 250 moscas cada animal, cada 15 días, siendo 20 mil la dosis de avispitas liberadas para ejercer control de la mosca de la paleta sobre 50 animales.

Resultados y discusión

Los parasitoides determinados en 2000 fueron: *Trybliographa foster* (Cynipoidea: Eucoilidae), *Trichopria haematobiae* (Ashmead) (Proctotrupoidea: Diapriidae), *Spalangia nigroaenea* Curtis, *Spalangia haematobiae* Ashmead y *Spalangia drosophilae* Ashmead (Chalcidoidea: Pteromalidae). El mayor número de parasitoides correspondió a *S. haematobiae*. Además, se encontró un espécimen del género *Erotolepsia* Howard (Pteromalidae), el cual se depositó en la colección de Canadá, siendo un nuevo registro como parasitoide de *H. irritans*. Sólo existe una especie descrita de ese género, *Erotolepsia compacta* Howard, obtenida en la Isla St. Vincent en las Antillas. No se encontró material de *Spalangia endius* y *Muscidifurax raptor*, las dos especies introducidas de Estados Unidos que habían sido liberadas en los ranchos por varios años a través de un programa del gobierno estatal.

En el periodo 2005-2006 se obtuvieron 2 702 avispas parasíticas de las pupas de las moscas. Del segundo envío de parasitoides (2006) a Canadá se desprende la existencia de 10 especies de Chalcidoidea (625 especímenes) de la familia Pteromalidae: *Spalangia nigroaenea* Curtis (404), *Spalangia cameroni* Perkins (12), *Spalangia drosophilae* Ashmead (34), *Spalangia endius* Walter (37), dos nuevas especies de *Spalangia* (similares a *Spalangia drosophilae* y a *Spalangia haematobiae*, respectivamente) y otra especie de *Spalangia* que no se pudo identificar, además de *Muscidifurax raptor* Girault & Saunders (25), *Muscidifurax zaraptor* Kogan & Legner (32) y *Pachycrepoides vindemiae* (Rondani) (7). También se encontraron dos especies de Diapriidae (52 especímenes): *Trichopria haematobiae* (Ashmead) (51) y *Trichopria sp.* (1). Los Cynipoidea no fueron identificados. El hallazgo de las dos nuevas especies de *Spalangia* y los nuevos registros de distribución indican que aún falta mucho para documentar toda la diversidad de parasitoides de las moscas del estiércol en la entidad. Además, no se han estudiado los depredadores de las moscas en sus distintas fases de desarrollo.

Como se puede notar, *Spalangia nigroaenea* fue por mucho la especie dominante, representando más del 60% del material identificado, señalando que esta especie es la más distribuida en la entidad. Por tanto, fue la especie que se escogió para ser criada en masa para ser evaluada en campo. Sin embargo, otras especies pudieran ser importantes también en el control de la plaga pero no se han reproducido masivamente ni evaluado en campo. Los laboratorios comerciales en México sólo producen *S. endius* pero esta especie no parece ser eficiente en todas las zonas ganaderas y lecheras. Por ejemplo, en el presente trabajo se obtuvieron 10 veces más especímenes de *S. nigroaenea* que de *S. endius*.

Las liberaciones de *S. nigroaenea* en los ranchos indicados aparentemente dieron buenos resultados en el control de la mosca ya que los propietarios señalaron la reducción en el número de aplicaciones de plaguicidas. Se mantuvo la población de moscas debajo del umbral económico de la plaga por un periodo más o menos largo (seis meses). Sin embargo, es posible que se requiera una mayor cantidad de avispidas a liberar por animal o reducir el número de días entre liberaciones para lograr una mayor efectividad en el control de la plaga y para tener un mayor aprovechamiento biotecnológico de los parasitoides nativos de esta importante plaga.

Conclusiones

El estado de Tamaulipas cuenta con una fauna abundante de avispidas parasíticas de la mosca del cuerno ya que se han obtenido 14 especies (11 Pteromalidae, 2 Diapriidae y 1 Eucolidae). *Spalangia nigroaenea* es la especie que más se ha recuperado en los ranchos, representando 60% del total de especímenes clasificados. Se obtuvieron dos nuevas especies del género *Spalangia* como parasitoides de dicha plaga mientras que *Erotilepsia sp.*, constituyó un nuevo registro de esta asociación huésped-parasitoide en México.

Las liberaciones de *S. nigroaenea* en los ranchos redujeron las poblaciones de la plaga aunque aparentemente se requiere una mayor población de avispidas a liberar por animal o reducir el número de días entre liberaciones para lograr una mayor efectividad en su control.

Referencias

- Bustos Vázquez G.; G. Velázquez de la Cruz; E. Rangel torres; E. Compeán Ramírez y J.R. Campos Leal, *Aprovechamiento biotecnológico de productos agropecuarios II*, Primera Edición, México, Plaza y Valdés, pp. 205-216.
- Cabral, C.P.H.N.S. Melo, (2006), “Miel final de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) en la alimentación de pollos de ceba en diferentes fases de desarrollo”, *Información Tecnológica*, 17(6), pp. 85-96.
- Chochran, W.G. y G.M. Cox, (1981), *Diseños experimentales*, México, UTEHA, p. 661.
- Corpet, D.E. (2000), “Mechanism of Antimicrobial Growth Promoters Used in Animal Feed”, *Revue de Medecine Veterinaire*, 151(2), pp. 99-104.
- Gallardo, N.J.L.; L. Villamar A.; H. Guzmán V. y N. Ruiz S. (2004), “Situación actual y perspectiva de la producción de carne de pollo en México 2004”, *Claridades Agropecuarias*, 130, pp. 3-22.

- Henrique A.P.F. (1998), “Efeito de Probióticos, Antibióticos e Ácidos Orgânicos e Suas Combinações Sobre o Desempenho e Rendimento de Carcaça de Frangos de Corte”, *Dissertação Pirassununga, SP*, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos.
- Khajareern, S.J.M.; D. Bunsidhi D. y S. Yodserance (1983), “Los efectos promotores de Bayo-n-ox, la lincomicina y el ácido arsanílico en pollos de engorda”, *Boletín Informativo*, México, Bayer.
- Khor, M. (1996), “Peligro de los antibióticos en la alimentación de los animales”, *Revista del sur*, núm. 62, 15-19.
- Martínez González J.C.; F. Martínez Herrera; J.J. Soto Castillo y S.P. Castillo Rodríguez (2008), “Probióticos en el comportamiento de pollos de engorda en la fase de iniciación”.
- NRC (1984), “Nutrient Requirements of Poultry”, *National Research Council*, Washington, National Academy Press, 71 pp.
- Odunsi, A.A. y A.A. Onifade (1998), “Efficacy of Procaine Penicillin as a Growth Promoter in Broiler Chicks Fed Low and High Fibre Diets in the Tropics”, La penicilina procaína como promotora del crecimiento en pollos broiler alimentados con dietas de baja y alta fibra en el trópico, *Archivos de Zootecnia*, 47(180), pp. 621-628.
- Saldaña, G.G.A. (1984), “Digestibilidad in vivo de raciones completas que incluyen diferentes niveles de monensin”, *Seminario de Investigación II*, Cd. Victoria Tamaulipas, Facultad de Agronomía-UAT, p. 35.
- Terán, J.E.R. (1978), “Uso de antibióticos como promotores de crecimiento en pollos de engorda”, *Seminario de Investigación II*, Cd. Victoria Tamaulipas, Facultad de Agronomía-UAT, p. 38.
- Walton, J.R. (1989), *Industria Porcina*, Reino Unido, Departamento de Ciencias Veterinarias, Universidad de Liverpool, Chester High Road, Neston, Wirral, p. 6-10.
- Williams, B.J. (1985), “The Effects of Neomycin and Oxytetracycline Alone or Combined Upon the Incidence of Salmonellosis in Broiler Chickens”, *Poultry Science*, 64(8), pp. 1455-1457.

**Desafíos en la utilización de residuos lignocelulósicos
para la obtención de productos biotecnológicos
(Parte I: pre-tratamiento de biomasa)**
*Challenges in the utilization of lignocellulosic residues
for producing biotechnological products
(Step I: biomass pretreatment)*

*Rafael Rodríguez Philippini,¹ Sabrina Evelin Martiniano,¹
Silvio Silverio da Silva,¹ Guadalupe Bustos Vázquez²*

Resumen

La utilización de residuos agroindustriales, como el bagazo de caña de azúcar, va adquiriendo gran interés científico debido a su gran potencial energético. Esos biomateriales presentan en su estructura cantidades estimables de azúcares que, al ser sometidos a procesos adecuados, pueden ser utilizados para la obtención de diversos productos, inclusive el etanol. El presente trabajo tiene como objetivo demostrar el efecto de pre-tratamiento del bagazo de caña de azúcar con ácido sulfúrico (H₂SO₄) diluído y posterior deslignificación con hidróxido de sodio (NaOH). Para la realización de los ensayos, se desarrolló un plan experimental factorial 2³, con tres puntos centrales para la determinación de las condiciones experimentales utilizadas en la hidrólisis ácida del bagazo. El material proveniente de la hidrólisis fue analizado en microscopio electrónico de barrido (MEV) para

¹ Escuela de Ingeniería de Lorena – Universidad de São Paulo, Departamento de Biotecnología, Rodovia Itajubá–Lorena, Km 74.5 – 12600-000, Lorena, São Paulo, Brasil, correo electrónico: rafael.philippini@debiq.eel.usp.br

² Unidad Académica Multidisciplinaria Mante, Universidad Autónoma de Tamaulipas, México.

determinar la degradación de la estructura lignocelulósica. Enseguida, las muestras fueron tratadas con NaOH para la remoción de la lignina. El material fue nuevamente analizado en microscopio electrónico de barrido para la observación de la estructura después de la deslignificación. El presente trabajo demuestra en forma resumida los efectos de pre-tratamiento de la ruptura de biomasa de caña de azúcar.

Abstract

The use of agroindustrial residues, such as sugarcane bagasse, has great scientific attention concerning its energetic potential. These biomaterials present on its structure estimable amounts of sugar that, submitted to adequate processes, may be utilized for obtaining a certain number of products, such as ethanol. The present work has as objective to evaluate the effect of pretreatment on the sugarcane bagasse, using diluted sulfuric acid (H₂SO₄) and delignification, using sodium hydroxide (NaOH). For the tests, a 2³ factorial design with three central points were used to determine the acid hydrolysis conditions. The samples were observed at Scanning Electron Microscope (SEM), concerning the degradation of the lignocellulosic structure. The hydrolysed samples were treated with NaOH for soluble lignin content removal, washed and dried, then observed at SEM to investigate of the delignified structure. The present work shows, in a synthesized way, the pretreatments effects in rupturing the sugarcane biomass.

Introducción

El petróleo es un material no renovable, resultante de la descomposición de materia orgánica durante millones de años. Su extracción y refinación dio origen a diversos productos, entre ellos, fracciones con diversos tipos de combustibles. Esos combustibles económicamente inestables, son agresivos al medio ambiente y se presentan en cantidad cada vez más limitada. Dentro de los combustibles renovables está el etanol, producto obtenido a partir de la fermentación alcohólica de los azúcares, realizada principalmente por la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. En Brasil, estos azúcares son obtenidos de la extracción del jugo de caña de azúcar tomados desde el punto de vista ecológico, una fuente de energía renovable. La producción y utilización de etanol como combustible alternativo ocurre en diversos países, aunque la producción y utilización de combustibles fósiles sean mayoritarias.

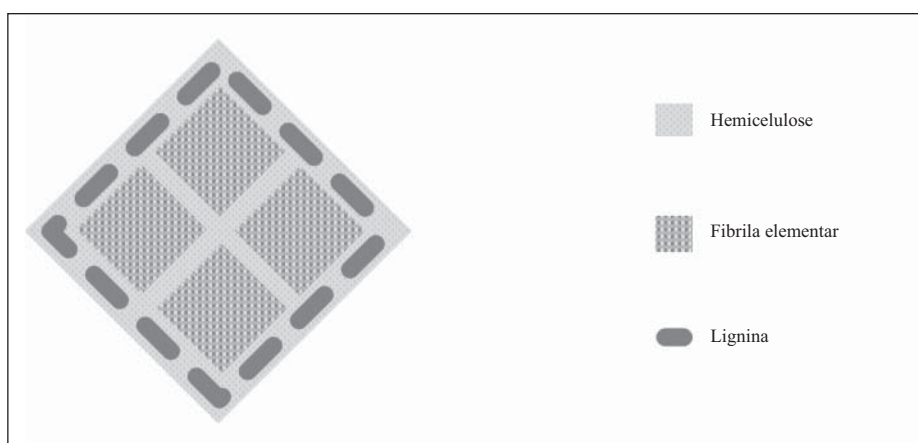
La creciente concientización ecológica del hombre en el siglo XXI, sumado al senso común de sustentabilidad nos lleva a buscar alternativas para la obtención de energía. El aprovechamiento eficaz de los subproductos generados por la agroindustria debe ser considerado, tomando en cuenta que, muchas veces, estos subproductos son utilizados de manera poco rentable o simplemente descartados del ambiente. El principal subproducto de la industria cañera es el bagazo, obtenido de la trituración de los tallos para la obtención de sacarosa. El bagazo es un material lignocelulósico, compuesto basicamente de celulosa, hemicelulosa y lignina. Estos polímeros están firmemente asociados entre sí, confiriendo al vegetal su integridad física y resistencia a agentes externos. El material lignocelulósico, rico en azúcares polimerizados, puede ser utilizado como materia prima en la producción de etanol por medio de su ruptura en fracciones menores, por métodos físicos y químicos. De este modo, se facilita el acceso a los azúcares fermentables y su consiguiente digestibilidad para los microorganismos. La utilización del bagazo ha atraído la atención de los investigadores, pues viabiliza el aumento de la producción de etanol, produciéndose más sin necesidad de ampliación del área cultivada.

Con un área aproximada de 8.5 millones de km², Brasil es el quinto país mayor en área territorial del mundo. Posee climas que van desde el ecuatorial hasta el subtropical y de altitud tropical. Esta diferenciación geográfica llevó a la formación de diversos biomas y a una de las más ricas biodiversidades del planeta. La distinción de climas y suelos dentro del monocultivo de caña de azúcar sugiere una absorción de nutrientes del suelo específica para cada localización, lo que lleva a una diferenciación percentual de los componentes químicos y estructurales del vegetal. El bagazo de caña de azúcar está compuesto basicamente de celulosa (23–55%), hemicelulosa (20–35%) y lignina (10–25%), también de otros componentes extraíbles (Sarrouh, Philippini y Silva, 2009) (figura 1).

La celulosa es el compuesto orgánico más abundante renovable del planeta. Es el principal constituyente estructural de la pared celular de los vegetales y un importante componente de la madera. Está compuesta básicamente por subunidades de D-glucosa unidas entre sí por enlaces glucosídicos del tipo β -(1→4). Estas enlaces son responsables de la formación de los disacaridos de celobiosa, la unidad repetitiva de homopolímero (Campbell, 2000). Las cadenas lineales de celulosa se presentan de modo ordenado (porción cristalina) y no tan ordenado (porción amorfa). Las cadenas individuales de los polisacaridos están unidas por puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals, formando las fibrillas elementales de celulosa, firmemente ligadas por enlaces intra e intermoleculares. Las asociaciones de estas cadenas de celulosa resultan de las llamadas fibrillas elementales. Estos agregados confieren a las plantas fibrosas elevada resistencia a la tensión mecánica, hidrólisis ácida, hidrólisis alcalina

e hidrólisis enzimática (Laureano Pérez y otros, 2005; Canilha y otros, 2009), una vez que la solubilidad de la celulosa es fuertemente dependiente de su peso molecular y de su grado de cristalinidad (ASS y otros, 2006).

Figura 1. Esquematación de la interacción de la hemicelulosa con los demás componentes vegetales



Fuente: Adaptado de Carvalho (2009).

La hemicelulosa es el segundo principal componente estructural de las angiospermas, sirviendo como conector entre las fibras de celulosa y la lignina y confiriéndole mayor rigidez a la planta. Es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza. Presenta menor peso molecular que la celulosa, con un grado de polimerización entre 100 y 200, variando de acuerdo con la especie de vegetal. Posee una compleja estructura de carbohidratos, que consiste de diferentes polímeros de pentosas (como la D-arabinosa y la D-xilosa), de hexosas (como la D-galactosa, la D-glucosa y la D-manosa), también de ácidos urónicos, y grupos acetilo (Ramos, 2003; Hendriks y Zeeman, 2009). En general, y considerando un heteropolímero amorfo, también puede presentar alguna orden cristalográfica, principalmente en el parenquima de angiospermas (Kabel y otros, 2006; Caux, 2009). También el xilano es el principal componente hemicelulósico de la pared celular de las plantas, otros componentes pueden ser encontrados, dependiendo de cada vegetal (Gírio, 2010). La hemicelulosa de las angiospermas contienen en su mayoría, heteroxilanas altamente acetiladas y la hemicelulosa de las gimnospermas contienen unidades de glucomananas y galactoglucomananas, parcialmente acetiladas (Carvalho y otros, 2009).

La lignina es un polímero amorfo, heterogéneo y de gran complejidad molecular. Es sintetizada a partir de los alcoholes *p*-hidroxi-cinámicos precursores, alcohol *p*-cumarílico, alcohol coniferílico y alcohol sinápico. Constituye la fracción sacarídea más abundante de la lignocelulosa y tiene como finalidad biológica, formar, junto a los otros componentes de la planta, un tejido de excelente resistencia y durabilidad contra microorganismos e intemperies. Las unidades constituyentes de la lignina varían de acuerdo con la especie de vegetal estudiada. Las principales unidades aromáticas presentes en la estructura de la lignina fueron clasificadas como *p*-hidroxifenila (H), guaiacila (G) y siringila (S). La relación entre las unidades constituyentes de la lignina varía conforme a las especies de vegetales estudiadas. Esa interacción presenta gran impacto en los estudios científicos, dado el interés de poder obtener plantas más adecuadas al proceso de deslignificación y utilización en la industria de conversión de biomasa lignificada a etanol (Carvalho y otros, 2009).

La recuperación de azúcares a partir de los materiales lignocelulósicos ha sido el tema de interés de muchos departamentos de investigación en Brasil y en el mundo. La utilización de estos azúcares para la producción de etanol combustible es viable en el contexto brasileiro, debido al creciente mercado agroindustrial, que genera millones de toneladas de residuos anualmente y la presencia de carros flex, que actualmente corresponde al 90% de la flota nacional (Única, 2010).

Así, la búsqueda de estos azúcares será grande, algunos factores son responsables de la falta de eficiencia de la hidrólisis enzimática de la celulosa. La presencia de otros componentes de material lignocelulósico (hemicelulosa y lignina) dificulta el acceso a la celulosa, así como la propia cristalinidad de esta y su grado de polimerización (Hendriks y Zeeman, 2009). Para que el acceso al material sea posible, deben ser adaptadas algunas estrategias, demostradas en diversos trabajos de la literatura. Ese concepto es denominado *pre-tratamiento* y su eficacia está directamente relacionada a la hidrólisis enzimática y a la obtención de azúcares fermentables del material.

Con base en la compleja estructura lignocelulósica, el pre-tratamiento es de fundamental importancia para la obtención de los azúcares fermentables. Algunas etapas pueden ser realizadas para que haya una degradación y/o fraccionamiento del material, facilitando, de este modo, el acceso de las enzimas celulolíticas (MOSIER, 2004). Tomando en cuenta pre-tratamientos que tengan bajo costo operacional, algunos factores clave deben ser relevados: 1) alta digestibilidad del sólido pre-tratado; 2) baja degradación de azúcares; 3) bajas concentraciones de compuestos tóxicos; 4) La producción de residuos sólidos; 5) alta concentración de azúcares; 6) recuperación de lignina; 7) bajo consumo de electricidad (Alvira y otros, 2009).

Existen diversos tipos para la realización del pre-tratamiento de materiales lignocelulósicos, pudiendo tener origen biológica, física y/o química. Dentro de

los principales métodos de pre-tratamiento citados en la bibliografía están: la utilización de hongos filamentosos (Sánchez, 2009), fragmentación mecánica (Sun y Cheng, 2002; Tahrzadeh y Kirimi, 2008) estrusión (Mulinari y otros, 2009), tratamiento alcali (Carvalho y otros, 2008; Kumar y otros, 2009), tratamiento ácido (Cheng y otros, 2007; Rodrigues y otros, 2009), explosión de vapor (Avelar y Glasser, 1998; Kaar, Gutierrez y Kinoshita, 1998), explosión de la fibra con amonía (Bals y otros, 2009), micro-ondas (Hu y Wen, 2007), ultrasonido (Liu y otros, 2007), entre otros. Cada uno de estos pre-tratamientos citados presentan un efecto específico sobre la biomasa, pudiendo actuar mas eficazmente sobre una fracción dada (Hendriks y Zeeman, 2009).

Se observa en la literatura la diversidad de ácidos que son utilizados para pre-tratamiento de los materiales lignocelulósicos. El ácido sulfúrico (H_2SO_4) es comunmente utilizado en diversos trabajos, no obstante, son también utilizados el ácido clorhídrico (HCl), ácido fosfórico (H_3PO_4) y el ácido nítrico (HNO_3), por ejemplo, (Ado y otros, 2010). Factores pre-establecidos como, concentración de ácido y las condiciones de pre-tratamiento (contenido de sólidos, tiempo de residencia, temperatura) varían de acuerdo con el material a estudiar (Howard y otros, 2003). La hidrólisis con ácido sulfúrico diluído es la forma de pre-tratamiento más utilizada para aplicaciones industriales y ha sido estudiada para el tratamiento de diversos tipos de biomasa lignocelulósica (Howard y otros, 2003). Presenta como principales efectos el rompimiento de los enlaces entre los componentes del vegetal, solubilización de la hemicelulosa y su conversión en azúcares fermentables (Saha, 2003). La hemicelulosa solubilizada por ácido sulfúrico puede contener compuestos de degradación, como el furfural e hidroximetilfurfural (HMF), así como compuestos aromáticos de la lignina. Estos compuestos afectan el metabolismo del microorganismo en el proceso de fermentación (Alvira y otros, 2009).

La utilización de bases fuertes para la deslignificación de materiales lignocelulósicos ha sido explorada por presentar mayor eficacia en la solubilización y ruptura de la lignina, menor degradación de azúcares que el tratamiento ácido y por disminuir el grado de polimerización y cristalinidad de la celulosa (Carvalho y otros, 2008; Tahrzadeh y Karimi, 2008). Hidróxidos de sodio (NaOH), potasio (KOH), cálcio ($Ca(OH)_2$) y amonía (NH_4OH) son pre-tratamientos alcalinos adecuados, pudiendo ser realizados a temperatura ambiente, en tiempos que van de segundos a días (Alvira y otros, 2010).

Las enzimas son catalizadores de origen proteica que favorecen las reacciones biológicas. Poseen alto grado de especificidad, siendo en muchos casos, controladas por procesos reguladores. La reacción catalizada tiene lugar en el sitio activo (hendidura o en el bolsillo de la superficie de la proteína y que consiste en ciertos aminoácidos esenciales para la actividad enzimática) (Campbell, 2000). Las enzimas del complejo celulolítico son responsables de romper la celulosa en monómeros de glucosa. Los

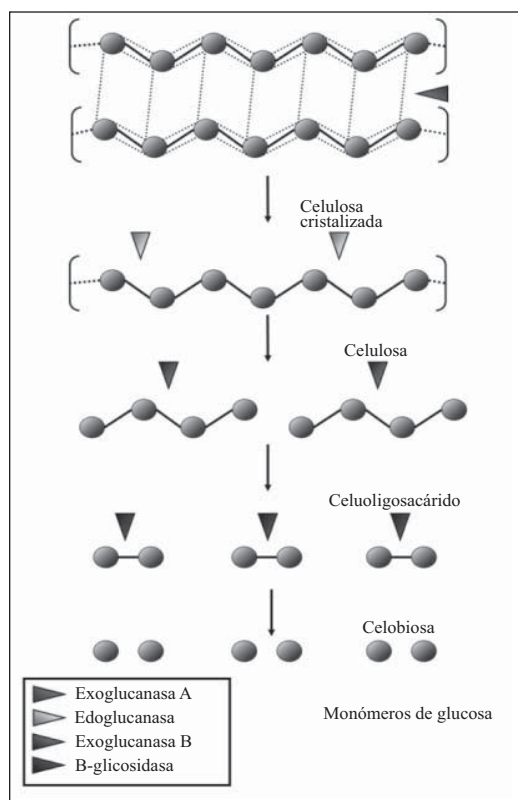
hongos son los principales productores de celulasas, seguido por bacterias aerobias y anaerobias (Lynd y otros, 2002). En general, los animales no poseen enzimas celulasa, que son necesarias para realizar la hidrólisis, también han sido encontrados en moluscos, anélidos, artrópodos, equinodermos y en algunos cordados (Medeiros, 2004; Davison y Blaxter, 2005).

Las celulasas han sido clasificadas de acuerdo con su acción catalítica y más recientemente, de acuerdo con sus propiedades estructurales. Los tres tipos principales de actividad enzimática son: las endoglucanasas (endo-1,4- β -D-glucanasas–EC3.2.1.4), las exoglucanasas celudextrinasa (exo-1,4- β -D-glucanasa–EC3.2.1.74) y la celobiohidrolasa (1,4- β -D-glucanocelobiohidrolasa–EC3.2.1.91), además de las β -glicosidasa (1,4- β -D-glicosidasa EC3.2.1.21). Estas tres clases principales de enzimas juntas forman el complejo celulolítico y son responsables de la hidrólisis de la molécula de celulosa. El complejo celulolítico actúa en sinergismo, rompiendo completamente la celulosa, a partir de diferentes puntos, de modo que al final del proceso, sean obtenidos monómeros de glucosa (figura 2).

Las exo-1,4- β -D-glucanasas, también conocidas como celobiohidrolasas (CBH) actúan en los reductores finales (CBHI) y no reductores (CBHII) de las cadenas polisacáridicas de celulosa, liberando tanto glucosa, como celulosa, como productos principales. La actividad de la celobiohidrolasa es esencial para la hidrólisis de la estructura microcristalina de la celulosa, también ambas presentan bajo grado de despolimerización de la celulosa. La proporción de las isoenzimas puede variar considerablemente, como en el caso de la *Trichoderma reesei*, donde las CBHI representan cerca de 60% de las celulasas proteicas totales. Las exoglucanasas pueden actuar también en la estructura de la celulosa microcristalina, presumiblemente removiendo las cadenas de celulosa de la misma (Lynd y otros, 2002; Zhang, Himmel, Mielenz, 2006). La β -glicosidasa, también llamada celobiasa, hidroliza la celudextrina soluble a celobiasa en monómeros de glucosa. Presenta gran importancia en la sacarificación de biomasa, una vez que la presencia de celobiasa puede inhibir la acción enzimática de las endo y exo glucanasas (Zhang, Himmel, Mielenz, 2006).

Las endo-1,4- β -D-glucanasas son responsables de reducir el grado de polimerización de las cadenas de celulosa facilitando de este modo, la acción de las celobiohidrolasas. Estas enzimas rompen la celulosa de modo aleatorio, principalmente en las regiones amorfas de la cadena celulósica, generando oligosacáridos con varias extensiones y consecuentemente, nuevos sitios de acción enzimática. Presentan aplicaciones industriales en el procesamiento de cerveza y jugos de fruta y en la producción de alimento para animales (Lynd y otros, 2002; Wang y otros, 2009).

Figura 2. Esquematación de la hidrólisis enzimática da celulosa por el complejo celulolítico



Fuente: Adaptado de Carvalho, 2009.

Objetivos

- Molienda y remoción de la porción hemicelulósica del bagazo de caña de azúcar a través de hidrólisis ácida utilizando H_2SO_4 diluido, en condiciones de concentración, temperatura y tiempo de residencia varía de acuerdo con el diseño de experimentos implementado.
- Tratamiento del bagazo hidrolizado con NaOH 1% a 100 °C por 60 minutos para la deslignificación del biomaterial para posterior digestibilidad de las enzimas celulolíticas en el bagazo.

- Análisis de las muestras, através de microscopía electrónica de barrido, para verificación de la alteración de la estructura física del bagazo de caña, resultante de la hidrólisis ácida y deslignificación.

Materiales y métodos

Obtención de la biomasa

El bagazo *in natura* fue proporcionado por la fábrica “Compañía Azucarera Valle de Rosario” Orlandia/SP. El bagazo fue inicialmente triturado en molino de cuchillos siendo posteriormente tamizado, a través de una malla de 20 para que sólo el material de esa fracción menor fuera evaluado.

Pretratamiento de la biomasa

El material triturado obtenido se separó en reactores, cada uno con cinco gramos de muestra. Se utilizaron tres variables independientes con 3 niveles, variando la concentración de ácido (100 a 300 mg/g de bagazo), temperatura (100 a 120 °C) y tiempo (10 a 30 min) en una relación 1:10 (s/l) (tabla 1).

Tabla 1: Variables independientes utilizadas en el proceso de hidrólisis ácida del bagazo de caña de azúcar

<i>Factores</i>	<i>Niveles</i>		
	<i>-1</i>	<i>0</i>	<i>+1</i>
Temperatura (°C)	100	110	120
Tiempo (min)	10	20	30
Concentración ácida (mg/g)	100	200	300

Fuente: elaboración propia.

La hidrólisis ácida del material se realizó en diferentes condiciones experimentales, utilizando un diseño de experimentos de tipo factorial 2^3 con 3 puntos centrales con el fin de obtener respuestas sobre las condiciones establecidas (Neto, Scarminio y Bruns, 2010).

Las muestras de bagazo de caña de azúcar fueron posteriormente filtradas usando una bomba de vacío y papel filtro para la remoción del exceso de humedad, siendo después colocadas en bolsas plásticas individuales y almacenadas en cámara fría a 4 °C hasta el momento del análisis. Posteriormente, una pequeña parte de las muestras se fijaron con cinta adhesiva de carbono en un soporte de aluminio (*stub*) y sometida al revestimiento metálico de 10 nm de oro en un metalizador *Coating System* BAL-TEC MED 020 y mantenidas en desecador, modelo *Edwards* PD3 hasta el momento del análisis. Las muestras metalizadas (figura 3) fueron después fotomicroografiadas, en equipo LEO (modelo 440) a una potencia fija de electrones de 20 kV (equipo disponible en el Departamento de Ingeniería de Materiales DEMAR/USP) con el fin de visualizar la estructura de los materiales después de la hidrólisis ácida, observando, de este modo, las modificaciones estructurales causadas por esta.

Figura 3. Muestras de bagazo de caña de azúcar, con capa de oro metálico



Fuente: elaboración propia.

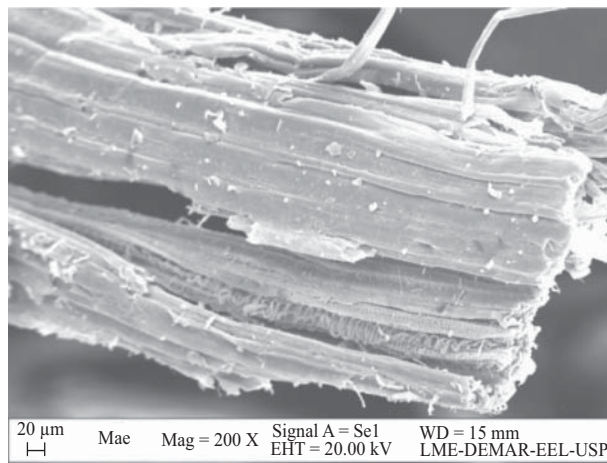
Después la verificación de las estructuras lignocelulósicas tratadas con ácido sulfúrico diluido, las muestras fueron sometidas a un tratamiento con NaOH en solución 1% a 100 °C en autoclave por 60 minutos para la remoción de la lignina presente en el material. Las muestras deslignificadas fueron posteriormente filtradas y lavadas vigorosamente hasta que el líquido residual del proceso no presentaron coloración. Las muestras deslignificadas fueron acondicionadas en las mismas condiciones

descritas para la hidrólisis ácida, donde permanecieron hasta el momento del análisis en microscopía electrónica de barrido.

Resultados y discusión

Los resultados obtenidos confirman los encontrados en la literatura, evidenciando que la remoción de la hemicelulosa con ácido sulfúrico diluido provoca un cambio morfológico de la biomasa lignocelulósica, en comparación con la muestra original (madre) (figuras 4 y 5).

Figura 4. Microfotografía electrónica de la muestra de bagazo de caña de azúcar triturada en molino con malla de 20

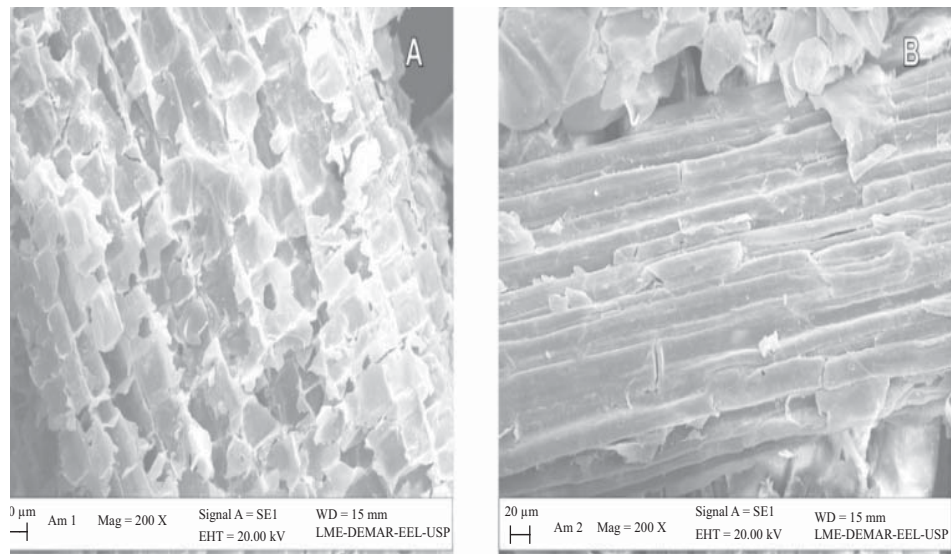


Fuente: elaboración propia.

Aunque la etapa de pre tratamiento con H_2SO_4 , para la remoción de la fracción hemicelulósica, se observa un oscurecimiento del bagazo de caña pre tratado en relación a el *in natura*. Es evidente, que los métodos químicos empleados presentan gran solubilidad de los componentes lo que hace a las fibras de celulosa más expuestas a cada etapa de procesamiento de la biomasa y con eso al aumento de su área superficial. Debido a que el proceso exige elevadas temperaturas, la “rampa de calefacción” del material y su posterior enfriamiento, también debe ser considerada, en cada condición pre establecida con la finalidad de calcular la severidad del proceso (Silva, 2009).

Factores como la especie, clima y estación del año en que la planta fue plantada deben ser evaluados, a fin de demostrar posible diferenciación porcentual de los componentes del biomaterial y finalmente, modelar pre tratamientos más eficaces de acuerdo con cada tipo de biomasa.

Figura 5. Microfotografías electrónicas de las muestras de bagazo de caña de azúcar pre tratadas con H₂SO₄ diluido. (A) condición experimental 1; (B) condición experimental 2

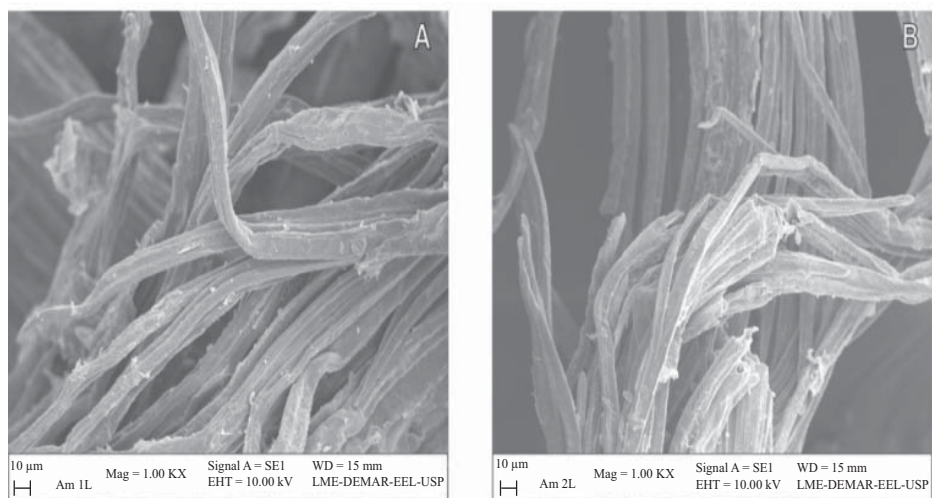


Fuente: elaboración propia.

La deslignificación de las muestras con NaOH removi6, en algunas muestras, gran parte de la lignina, haciéndola más accesible a la celulosa para la posterior hidrólisis enzimática (figura 6).

Aunque la hidrólisis ácida y la deslignificación de los materiales lignocelul6sicos sean una etapa de importancia fundamental para una sacarificación efectiva de la biomasa, para fragilizar la estructura del biomaterial y aumentar la accesibilidad de la celulosa, otros factores como digestibilidad enzimática, recuperación de azúcares y cantidad de inhibidores presentes en el medio deben ser considerados (Chandra y otros, 2007).

Figura 6. Microfotografías electrónicas de las muestras de bagazo de caña de azúcar, después de la deslignificación con NaOH (A) condición experimental 1; (B) condición experimental 2



Fuente: elaboración propia.

Agradecimientos

FAPESP (2008/57926-4) e CNPq.

Referencias

- Ado, A.M.; Z.H.A. El-Wahab; A.A. Ibrahim and M.T. Al-Shemy (2010), "Characterization of Microcrystalline Cellulose Prepared from Lignocellulosic Materials. Part I. Acid catalyzed hydrolysis", *Bioresource Technology*, vol. 101, pp. 4446-4455.
- Alvira, P.; E. Tomás Pejó; M. Ballesteros and M.J. Negro (2010), "Pretreatment Technologies for an Efficient Bioethanol Production Process Based on Enzymatic Hydrolysis: A Review", *Bioresource Technology*, vol. 101, pp. 4851-4861.
- Ass, B.A.P.; M.N. Belgacem and E. Frollini (2006), "E. Mercerized Linters Cellulose: Characterization and Acetylation in N,N-dimethylacetamide/lithium Chloride", *Carbohydrate Polymerers*, 63, pp. 19-29.

- Chandra, R.P.; R. Bura; A. Mabee; X. Pan and J.N. Saddler (2007), “Substrate Pretreatment: The Key to Effective Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulosics?”, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, vol. 108, pp. 67-93.
- Davison, A. and M. Blaxter (2005), “Ancient Origin of Glycosyl Hydrolase Family 9 Cellulase Genes”, *Molecular Biology and Evolution*, vol. 22, núm. 5, pp. 1273-1284.
- Campbell, M.K. (2000), *Bioquímica*, Artmed (ed), Porto Alegre, 751 p.
- Canilha, L.; A.M.F. Milagres; S.S. Silva; J.B. Almeida Silva; M.G.A. Felipe; G.A.M. Rocha; A. Ferraz and W. Carvalho (2009), “Sacarificación da Biomassa Lignocelulósica através de Pré-hidrólisis Ácida Seguida por Hidrólisis Enzimática: Uma estratégia de ‘desconstrução’ da Fibra Vegetal”, *Revista Analytica*, núm. 44, dez-jan.
- Carvalho, F.; L.C. Duarte and F.M. Girio (2008), “Hemicellulose Biorefineries: a Review on Biomass Pretreatments”, *Journal of Scientific y Industrial Research*, vol. 67, pp. 849-864.
- Carvalho, W; L. Canilha; A. Ferraz; A.M.F. Milagres (2009), “Uma Visão Sobre a Estrutura, Composição e Biodegradação da Madeira”, *Química Nova*, vol. 32, núm. 8, pp. 2191-2195.
- Cheng, K.K.; B.Y. Cai; J.A. Zhang; H.Z. Ling; Y.J. Zhou; J.P. Ge and J.M. Xu (2008), “Sugarcane Bagasse Hemicellulose Hydrolysate for Ethanol Production by Acid Recovery Process”, *Biochemical Engineering Journal*, vol. 38, pp. 105-109.
- Girio, F.M.; C. Fonseca; F. Carvalho; L.C. Duarte; S. Marques and R. Bogel Łukasik (2010), “Hemicelluloses for Fuel Ethanol: A Review”, *Bioresource Technology*, vol. 101, pp. 4775-4800.
- Hendriks, A.T.W.M. and G. Zeeman (2009), “Pretreatments to Enhance the Digestibility of Lignocellulosic Biomass”, *Bioresource Technology*, vol. 100, pp. 10-18.
- Howard, R.L.; E. Abotsi; R.E.L. Jansen and S. Howard (2003), “Lignocellulose Biotechnology: Issues of Bioconversion and Enzyme Production”, *African Journal of Biotechnology*, vol. 2(12), pp. 602-619.
- Hu, Z. and Z. Wen (2008) “Enhancing Enzymatic Digestibility of Switchgrass by Microwave-Assisted Alkali Pretreatment”, *Biochemical Engineering Journal*, vol. 38, pp. 369-378.
- Silva, V.F.N. da (2009), “Estudos de Pré-tratamento e Sacarificación Enzimática de Resíduos Agroindustriais Como Etapas no Processo de Obtenção de Etanol Lignocelulósico”, *Dissertação de Mestrado*, São Paulo, Lorena, EEL-USP.
- Laureano Perez, L.; F. Teymouri; H. Alizadeh and B.E. Dale (2005), Understanding Factors that Limit Enzymatic Hydrolysis of Biomass”, *Applied Biochemistry Biotechnology*, pp. 1081-1099.

- Mosier, N.; C. Wyman; B. Dale; R. Elander; Y.Y. Lee; M. Holtzappple and M. Ladisch (2004), *Features of Promising Technologies for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass*.
- Neto, B. de B.; I.S. Scarminio e R.E. Bruns (2010), “Como Fazer Experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria”, Bookman (ed), Porto Alegre, 4ª ed., 414 p.
- Rodrigues, R.C.L.B.; G.J.M. Rocha; D. Rodrigues Jr.; H.J.I. Filho; M.G.A. Felipe and A.P. Pessoa (2010), “Scale-Up of Diluted Sulfuric Acid Hydrolysis for Producing Sugarcane Bagasse Hemicellulosic Hydrolysate (SBHH)”, *Bioresource Technology*, vol. 101, pp. 1247-1253.
- Saha, B.C. (2003), “Hemicellulose Bioconversion”, *Industrial Microbiology Biotechnology*, vol. 30, pp. 279-291.
- Sánchez, C. (2009), “Lignocellulosic Residues: Biodegradation and Bioconversion by Fungi Biotechnology Advances”, vol. 27, pp. 185-194.
- Sarrouh, B.F.; R.R. Philippini and S.S. da Silva (2009), “Lignocellulosic Bioethanol Production: Perspectives and Challenges”, *International Review of Chemical Engineering*, vol. 1, núm. 6, pp. 614-622.
- Sun, Y. and J. Cheng (2002), “Hydrolysis of Lignocellulosic Materials for Ethanol Production: a Review”, *Bioresource Technology*, vol. 83, pp. 1-11.
- Taherzadeh, M.J. and K. Karimi (2008), “Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review”, *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 9, pp. 1621-1651.
- Unica (União da Indústria de Caña-de-Azúcar) (2010), *Carros Flex Representam 92% das Vendas de Marzo, Último Mês de IPI Reduzido*, Disponível em: <http://www.unica.com.br>, Acessado em: 29/05/2010.
- Wang, Y.; H. Yuan; J. Wang and Z. Yu, “Truncation of the Cellulose Binding Domain Improved Thermal Stability of Endo- β 1,4-Glucañase from *Bacillus subtilis* JA18”, *Bioresource Technology*, vol. 100.

Aprovechamiento biotecnológico de productos agropecuarios III
se terminó de imprimir en agosto de 2012
tiraje 1 000 ejemplares

Actualmente la biotecnología se aplica en sectores tan diversos como la salud animal y humana, agroalimentación, suministros industriales, producción de energía y protección del medio ambiente. Dentro de los suministros industriales, el desarrollo de las técnicas de fermentación, la utilización y diseño de nuevos biorreactores, conjuntamente con las técnicas de ingeniería genética, han permitido la obtención de productos de gran interés económico para la industria alimentaria, química y farmacéutica.

Uno de los retos actuales de la biotecnología es generar innovaciones y mejoras en los alimentos, conduciendo a prácticas agrícolas más ecológicas, contribuyendo a una agricultura sustentable y aprovechando adecuadamente los recursos naturales. Por ello, es de especial importancia la investigación de procesos que proporcionen alternativas de solución para el uso y aprovechamiento de los subproductos o residuos generados durante la industrialización de algunos recursos agrícolas ya que son fuentes especialmente atractivas por su contenido de distintos compuestos como azúcares, pigmentos, fibra alimentaria, proteína, polifenoles y lignina que pueden ser potencialmente útiles cuando se transforman mediante las reacciones apropiadas en productos de elevado valor comercial. La transformación microbiana de estos materiales, podría ser la manera más eficiente de incrementar la rentabilidad de las actividades agropecuarias, así como de fortalecer otro tipo de actividades económicas. El Cuerpo Académico Ciencia y Tecnología Agroalimentaria en colaboración con la Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidad Autónoma de Tamaulipas lleva a cabo el Encuentro Académico: Avances en el Aprovechamiento Biotecnológico de Productos Agropecuarios, el cual es una plataforma que permite compartir los avances científicos en materia del aprovechamiento de recursos agroindustriales, así mismo permite la difusión del conocimiento generado por los grupos de trabajo y el establecimiento de redes de colaboración entre los grupos participantes.



Ciencia y Tecnología

ISBN 978-607-402-562-0



9 786074 025620