



Directorio

M. Phil. Alfredo F. J. Dájer Abimerhi
Rector

Dr. Carlos Echazarreta González.
Director General de Desarrollo Académico

Dr. Francisco Fernández Repetto
Coordinador General de Extensión

Facultad de Ingeniería Química

I.Q.I. Carlos Alberto Estrada Pinto, M. en C.
Director

I.I.Q. Luis Alberto Flores Prén
Secretario Administrativo

Dra. Alma Irene Corona Cruz
Secretaria Académica

Dra. Marcela Zamudio Maya
Jefa de la Unidad de Posgrado e Investigación

Consejo Editorial

Dr. Luis Antonio Chel Guerrero
Editor Técnico

M. en C. Virginia Pérez Flores

M. en C. Gabriel Rosado Rubio

M. en C. Ana Isabel Burgos Pérez

Dr. José F. Rivas Burgos

M. en C. Miriam Chan Pavón

QI. Aracelly González Burgos

M. en C. Jesús Escalante Euan

Edición y Diseño Gráfico

QI. Miriam Chan Pavón, M. en C.
LDGP Luis Enrique Flores Rivero



Premio
Nacional
de Tecnología
2 0 0 2

ESTUDIO DE DIFERENTES FACTORES QUE AFECTAN LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA EN *Chlamydomonas reinhardtii*. Avance de Investigación

3

R. Vázquez-Díaz y D. Robledo-Ramírez

CALIDAD NUTRIMENTAL DE UN HIDROLIZADO PROTEÍNICAMENTE DE *Phaseolus lunatus* Y SU INCORPORACIÓN EN UNA CREMA DE ZANAHORIA. Artículo Científico

9

M. Segura-Campos, G. López-Von, L. Chel-Guerrero
y D. Betancur-Ancona.

CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE HIDROLIZADOS ENZIMÁTICOS DE LA PROTEÍNA DE FRIJOL TERCIOPELO *Mucuna pruriens*. Artículo Científico

17

G. Cruz-Cervera, A. Castellanos-Ruelas, G. Rosado-Rubio
y L. Chel-Guerrero.

ESTABILIDAD FISICOQUÍMICA Y TIEMPO DE VIDA DE ANAQUEL DE PRODUCTOS ENVASADOS DE PULPO *Octopus maya*. Artículo Científico

26

A. García-Lira, J. Ruiz-Ruiz, L. G. Cantón-Castillo, D. Betancur-Ancona
y L. Chel-Guerrero.

IDENTIFICACIÓN DEL GRADO DE CONCEPTUALIZACIÓN DE LA LOGÍSTICA EN LAS EMPRESAS DE MÉRIDA Nota de Investigación

32

A. Medina-Lara y I. Monsreal-Barrera.

INSTRUCCIONES A LOS AUTORES

36

La Revista de la Facultad de Ingeniería Química es una publicación semestral relacionada con la Ingeniería Química, la Química Industrial, la Ingeniería Industrial Logística, los Alimentos y la Administración de la Tecnología, vinculada con su enseñanza, investigación y aplicación en el sector productivo. Número 50. Todo material impreso puede reproducirse mencionando la fuente. Los artículos firmados expresan la opinión del autor y no necesariamente el de la dependencia. La correspondencia dirigirla a: Facultad de Ingeniería Química. Periférico Nte. Km. 33.5, Tablaje Catastral 13615, Col. Chuburná de Hidalgo Inn, Mérida, Yuc., Méx. C. P. 97203. Tels. +52 (999) 946-09-56, 946-09-93. Responsable de Edición: QI. Miriam Chan Pavón, M. en C. Correo electrónico: revista@fiq.uady.mx ISSN 0188-5006.

ESTUDIO DE DIFERENTES FACTORES QUE AFECTAN LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA EN *Chlamydomonas reinhardtii*

R. Vázquez-Díaz y D. Robledo-Ramírez

RESUMEN

Los combustibles fósiles son una fuente energía que tienen la ventaja de ser fáciles de transportar y de tener un bajo costo, sin embargo, el impacto ambiental que estos presentan durante su combustión, suele ser devastadora e irreversible. A la fecha, cerca de 87% del total de la energía se genera por medio de combustibles fósiles (carbón, petróleo y gas natural), llevando a investigar y a proponer nuevas fuentes de energía alternativas, como la utilización del hidrógeno como combustible.

Chlamydomonas reinhardtii es una microalga capaz de generar hidrógeno en condiciones anaerobias, maximizando su producción a partir de la generación de biomasa, la cual es manipulada con los nutrientes del medio, intensidad luminosa y temperatura.

En este estudio se utilizó la cepa CC-124 de *Chlamydomonas reinhardtii*, con los medios de cultivo SUEOKA y TAP a temperaturas de 25 y 40°C e intensidades de 159 y 320 $\mu\text{Em-2s-1}$. La cuantificación de la biomasa se realizó mediante la determinación de la densidad óptica a 660 nm y se determinó la clorofila para monitorear el desarrollo microalgal. De acuerdo a los análisis realizados y a la evaluación de los datos, se puede concluir que el medio TAP presenta mayor concentración de biomasa con un promedio de 3.7894 mg/ml a intensidades de 320 $\mu\text{Em-2s-1}$, el cual representa 1189 cel/ml.

Palabras claves: *Chlamydomonas reinhardtii*, microalga, biomasa, impacto ambiental

Introducción

En la actualidad, más del 80 % del petróleo extraído en el mundo es utilizado como combustible, principalmente en forma de diesel y gasolina; sin embargo, las amenazas acerca de la disminución de esta fuente de energía fósil, ha propiciado el uso de otros combustibles, tales como el gas natural y el carbón mineral, que hasta finales del siglo XIX se consideraban los energéticos más importantes (Clarke y Trinnamh, 2007). Una de las principales ventajas que traen consigo los combustibles fósiles es su bajo costo y facilidad de transporte, el cual satisface los requerimientos energéticos de poblaciones que van en aumento, así como en los países industrializados o con grandes yacimientos de combustibles fósiles, sin embargo también tiene desventajas en términos de contaminación y efectos ambientales que se dan a través de la combustión, que va desde la producción de CO₂, el cual contribuye al calentamiento global, hasta la formación de óxidos de nitrógeno y azufre, causantes de la lluvia ácida (Elliott, 2003; Holgate, 1999).

Los combustibles fósiles son ciertamente la fuente principal de energía en el mundo, pero existen otras que se utilizan desde hace mucho tiempo como fuentes de energía alternativa, tales como la eólica, la hidráulica, la geotérmica y la polémica energía nuclear (Komp, 1995). Actualmente la energía eléctrica a nivel global se encuentra en un escenario difícil. El consumo de la energía eléctrica se ha incrementado de forma rápida, esto con la finalidad de mejorar los estándares de vida, particularmente en las naciones industrializadas. A la fecha, cerca de 87% del total de la energía se genera por medio de combustibles fósiles (carbón, petróleo y gas natural), 6% se genera en plantas nucleares, y el 7% restante por medio de fuentes renovables (principalmente en plantas hidroeléctricas y eólicas) (Ramírez y Torres, 2006). Todos estos antecedentes estadísticos que presenta la energía actual, ha motivado a seguir investigando y proponiendo nuevas fuentes de energía alternativas, tales como la utilización del hidrógeno como combustible (Dinga, 1989; Wang y Thonson, 1999). El hidrógeno es el elemento de mayor abundancia en el planeta, de fácil obtención y se encuentra libre en la naturaleza, tiene la capacidad de liberar energía al reaccionar con el oxígeno produciendo agua como producto unitario, sin embargo, al ser gaseoso en condiciones normales de temperatura y presión, se vuelve un combustible difícil de almacenar y transportar (Dinga, 1989).

Para la producción de hidrógeno existen los métodos químicos que se dan mediante la deshidrogenación o instauración catalítica de algunos derivados de petróleo y otros compuestos orgánicos e inorgánicos que originan al hidrógeno como producto secundario, también se encuentran los métodos físicos como la electrolisis y los métodos bioquímicos tales como la fotocatalisis que forman parte del proceso natural de algunos seres vivos fotosintéticos como las microalgas y/o cianobacterias (Reinhold y Werner, 1996).

Las microalgas son organismos fotosintéticos unicelulares que pro-

vienen de medios marinos o de agua dulce, tienen la capacidad de realizar la hidrólisis del agua por medio de la oxidación – reducción a través de enzimas llamadas hidrolasas (González *et al.*, 1997).

La especie *Chlamydomonas reinhardtii* es una microalga aislada en estanques naturales de agua dulce o salobre, en todo tipo de suelos, en las chimeneas termales submarinas e incluso bajo la capa de hielo antártica, que al ser inducida a desarrollarse en condiciones anaerobias rompen la molécula de agua en oxígeno e hidrógeno, aprovechando para su respiración al oxígeno y liberando al gas hidrógeno al medio de cultivo (Tsingankov *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2006). De naturaleza adaptable, esta especie se encuentra dentro de la clasificación de los *Chlorophyceae* de las algas verdes, y en el grupo de las Chlamydomonadales; por lo que se incluyen todas aquellas que son unicelulares y flageladas (Tsingankov *et al.*, 2006; Mattox *et al.*, 1984).

Las algas verdes tienen un sistema fotosintético similar al de las plantas y tienen la capacidad de producir hidrógeno usando el dióxido de carbono, la luz del sol como fuente de energía, y el agua como donante de electrón, sin embargo también influyen diversos parámetros tales como, el desarrollo microalgal, el cual está estrechamente relacionado con la intensidad de luz y la temperatura (Kim *et al.*, 2006).

Durante la última década se han realizado avances significativos en este campo, tanto en la caracterización bioquímica de los microorganismos que producen hidrógeno bajo condiciones adecuadas (anaerobiosis y separación temporal en la producción de oxígeno e hidrógeno), como en el manejo fisiológico de los cultivos (Melis *et al.*, 2000; Rocheleau *et al.*, 1999; Polle *et al.*, 2000; Ghirardi, 2000; Wykoff *et al.*, 1998). Además, se han propuesto diseños de fotobioreactores (reactores en que se desarrollan reacciones biológicas controladas, que son cerrados pero que permiten la interacción del material biológico con radiación luminosa) más eficientes para la obtención de biomasa con rendimientos que se acercan al 10 % en términos de la energía radiante recibida contra la expresada como hidrógeno (Bresser *et al.*, 2000; Morita *et al.*, 2001; Janssen *et al.*, 2000).

Chlamydomonas reinhardtii es una microalga que se desarrolla a temperaturas de 25°C e intensidades de luz entre 60 y 300 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$, estos dos parámetros permiten un desarrollo microalgal óptimo, ya que la intensidad de luz ayuda a la absorción de nutrientes, el cual genera un número mayor de células (biomasa) (Kim *et al.*, 2006). Estudios realizados demuestran que el índice de consumo de nutrientes es directamente proporcional a la densidad celular, siendo a intensidades de 300 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ el índice máximo de consumo de nutrientes (Kim *et al.*, 2006).

Entre los medios más utilizados para el desarrollo microalgal, se encuentra el medio Sueoka (Hight Salt Medium) rico en sales de NH_4Cl , CaCl_2 y MgSO_4 , tam-

bién se encuentra el medio TAP (Tris-Acetate-Phosphate) rico en fosfatos (Kim *et al.*, 2006). Pantí (2007), demostró que el medio de cultivo Sueoka genera mayor volumen de biomasa y genera más hidrógeno, con un promedio de 1.98×10^{-5} ml de hidrógeno por célula durante 72 h. Su estudio se basó en la producción y cuantificación de biohidrógeno generado en ambos medios de cultivo bajo condiciones controladas.

Para el estudio de la *Chlamydomonas reinhardtii*, tanto en producción de hidrógeno como en crecimiento microalgal, se utilizan algunas técnicas complementarias comunes, tales como la determinación de la clorofila, densidad celular y peso seco (Stockar *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2006).

La clorofila son pigmentos que tienen la función de absorber la energía luminosa. En la *Chlamydomonas reinhardtii*, el aumento de la clorofila es un indicativo de un aumento en la intensidad de luz y viceversa, lo que llevaría a una saturación o inhibición de su producción, aun que su número de células sea creciente, dando como resultado el aumento o disminución de la producción de hidrógeno según sea el caso (saturación o inhibición) (Kim *et al.*, 2006). La densidad celular es una técnica empleada para determinar la concentración de células al paso de los días, y consiste en la toma de lecturas a 660 nm, mientras que el peso seco es un método muy efectivo para concentraciones de biomasa mayores o iguales a 1g, que da como resultado la cantidad de células en gramos en un volumen determinado (Stockar *et al.*, 2006).

Materiales y Métodos

Para fines de este proyecto, se trabajó con la cepa CC-124 de *Chlamydomonas reinhardtii*, proveída por Chlamydomonas Center (EUA). El estudio se realizó en el laboratorio de termodinámica del CINVESTAV – IPN (unidad Mérida).

Para el crecimiento de las microalgas se prepararon los medios de cultivo Sueoka (Hight Salt Medium) y TAP (Tris-Acetate-Phosphate) el cual se ha modificado para evitar contaminaciones mediante la eliminación de sus iones de acetato en el medio. Se evaluaron dos temperaturas: 25 y 40°C, se utilizaron dos intensidades de luz de 159 y 320 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$, en iluminación continua durante las 24 horas del día utilizando lámparas fluorescentes. Se utilizó aireación constante mediante burbujeo por una línea de aire comprimido, utilizando dos matraces de 250 ml que representaron los fotobioreactores y una pecera con agua que permitió el paso de las intensidades de luz así como el control de las temperaturas establecidas.

Análisis del crecimiento celular

Para la cuantificación del crecimiento celular, se utilizaron dos métodos complementarios: densidad óptica y peso seco. La densidad óptica se determinó utilizando un espectrofotómetro portátil a 660 nm de longitud de onda para evitar la interferencia de la absorbancia de

la clorofila. El peso seco se determinó utilizando membranas de poro de 2 micras, filtrando 10 ml de medio de cultivo mediante un sistema de vacío, las microalgas fueron retenidas en la membrana y secadas durante 15 min en un horno de microondas a 150 W, posteriormente fueron colocadas en un desecador hasta su enfriamiento y pesadas para determinar la masa celular en mg/ml.

La clorofila se determinó utilizando un espectrofluorómetro, con una longitud de onda de excitación de 432 nm y una longitud de onda de emisión de 668 nm, los resultados obtenidos se compararon con una curva de calibración de disoluciones de la clorofila en concentraciones conocidas y el medio de cultivo como blanco.

Para la cuantificación de la biomasa generada en cel/ml se utilizó la curva de calibración $Y = 267.3x + 100.6$ obtenida por Pantí (2007) a condiciones normales de temperatura e intensidad luminosa.

Identificación de las mejores condiciones del crecimiento celular

Para determinar las mejores condiciones para la producción de biomasa generada de *Chlamydomonas reinhardtii* se realizó un experimento con un diseño experimental factorial 2 x 2 con las condiciones que se muestran en el cuadro 1. Se realizaron dos réplicas por cada tratamiento y el análisis estadístico se realizó empleando el paquete Statgraphics plus versión 5.1.

Cuadro 1. Condiciones experimentales.

CONDICIONES DE TRABAJO		
MEDIOS DE CULTIVO	TEMPERATURAS °C	INTENSIDADES $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$
SUEOKA	25	159
TAP	25	320

Resultados y Discusiones

Densidad y crecimiento celular

Como se puede observar durante los 5 días de toma de lecturas, el medio TAP favorece el crecimiento microalgal en las dos intensidades de luz y siendo a intensidades altas en donde se mostró un mayor crecimiento celular; mientras que el medio SUEOKA apenas y se vio favorecido a intensidades de luz de $320 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$

Los resultados obtenidos durante el experimento, indican que la sustitución de sus acetatos por HCl del medio TAP fue efectivo puesto que no hubo contaminación alguna y si un mejor crecimiento microalgal (gráfica 1 y 2). En las gráficas 1 y 2 se puede observar como va incrementando la densidad celular al paso de los días, sin embargo en la gráfica 2 se observa que el medio SUEOKA disminuye el crecimiento celular entre el 4º y 5º día, esto es debido a la disminución de los nutrientes al paso de los días y por consiguiente el decremento del crecimiento celular. Kim *et al*, (2006), cita que la absorción de nutrientes en el cultivo se da durante 7 días en fase de luz, siendo al 4º día (96 h) en donde la pendiente es mas inclinada lo que significa que ya no hay producción de microalgas y si, una posible disminución.

Observando las Figuras 1 y 2 se puede concluir que hubo un mayor crecimiento celular a intensidades de luz alta, siendo la temperatura una constante de 25°C. Chávez (2006), cita que no hay diferencia en el crecimiento celular en un rango de 25 – 35°C, sin embargo Kim *et al*, (2006), refiere que el crecimiento óptimo de la *Chlamydomonas reinhardtii* es a temperaturas de 25°C e intensidades de luz entre $60 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ y $300 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$.

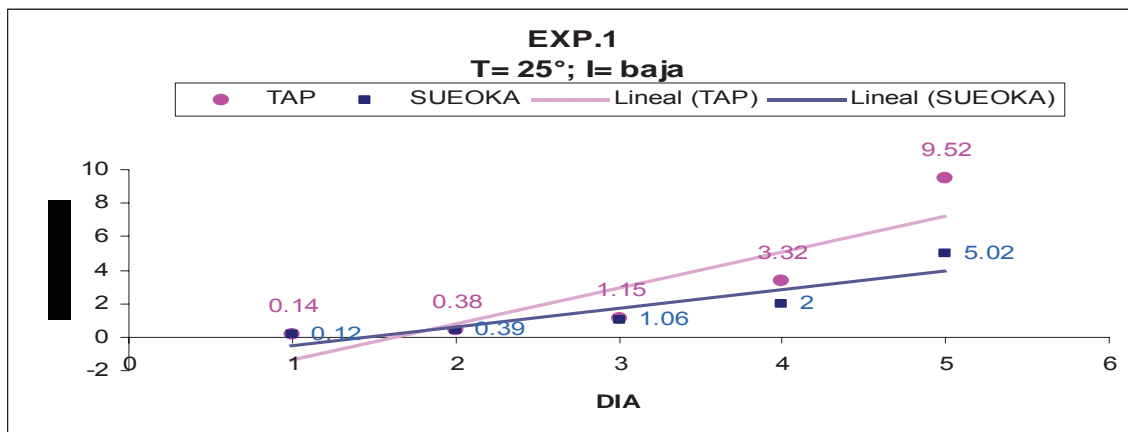


Figura 1. Crecimiento celular en los medios SUEOKA y TAP a intensidades de $159 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$.

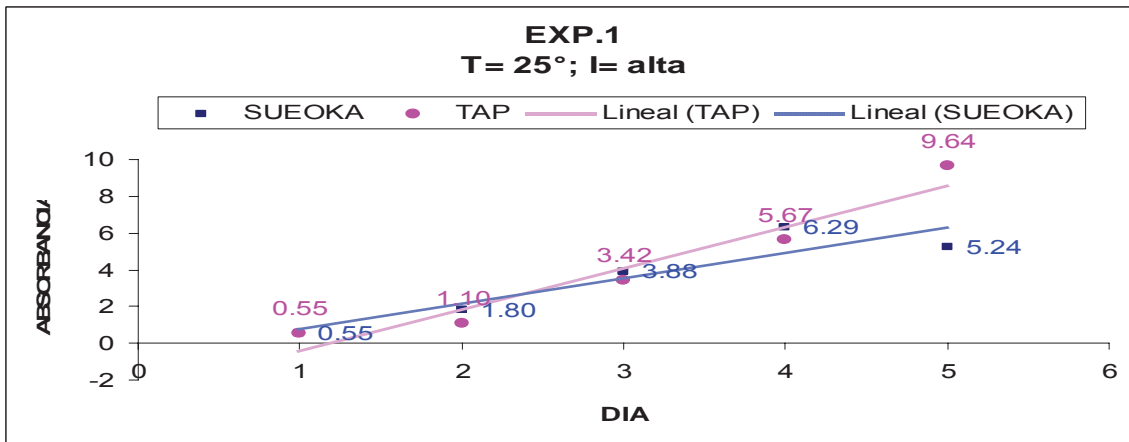


Figura 2. Crecimiento celular en los medios SUEOKA y TAP a intensidades de $320 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Determinación de clorofila

La determinación de la clorofila de acuerdo a las Figuras 3 y 4 indica que hubo crecimiento celular y consumo de nutrientes del medio con variaciones en la cantidad de clorofila generada, que va de acuerdo a la luz proyectada al cultivo.

Kim *et al*, (2006), cita que la cantidad de clorofila aumenta con la intensidad de luz, siendo creciente durante las primeras 24 h. y decreciente después de 70 h., esto es debido al consumo de los nutrientes del medio. Como se puede observar en las Figuras 3 y 4 existe una disminución entre el tercer y cuarto día, siendo mas notable cuando la *Chlamydomonas reinhardtii*, es expuesta a intensidades de luz de $320 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ (gráfica 4).

Al ser comparadas las Figuras 3 y 4, se puede observar una mayor producción de clorofila a intensidades de $320 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$, esto debido a que la intensidad de luz más baja ($159 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$) satura las células de la *Chlamydomonas reinhardtii*, mientras que a $320 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ es inhibida por el exceso de luz. Kim *et al*, (2006), cita que las intensidades de luz óptima para el desarrollo de *Chlamydomonas reinhardtii* es entre $60 - 300 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$, demostrando que a intensidades mayores a $300 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ afecta la cantidad de clorofila, así como el número de células producidas.

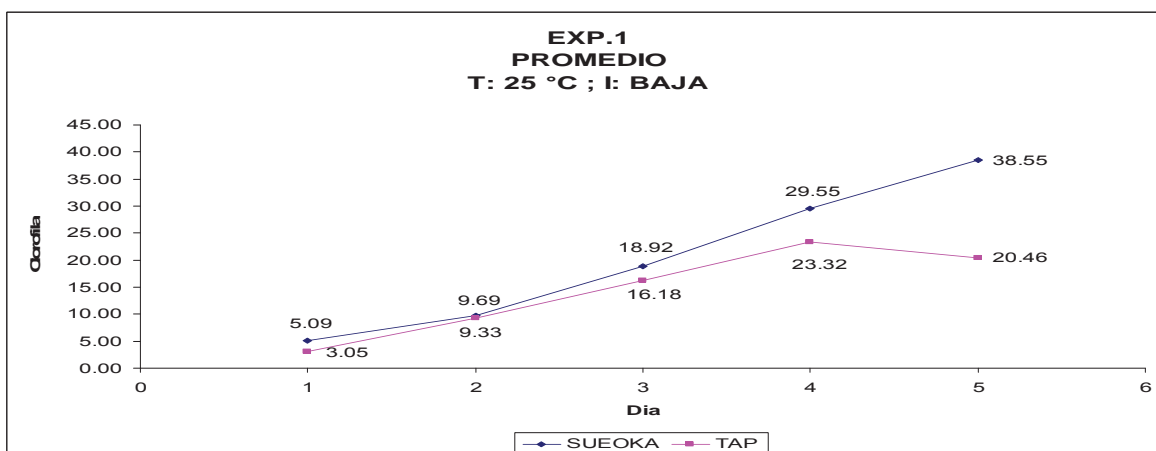


Figura 3. Determinación de clorofila en los medios SUEOKA y TAP a intensidades de $159 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$.

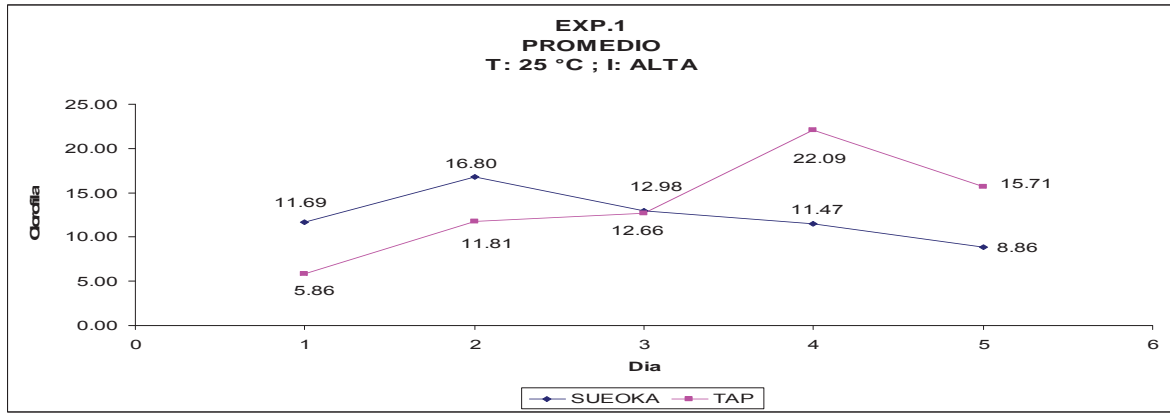


Figura 4. Determinación de clorofila en los medios SUEOKA y TAP a intensidades de 320 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Identificación de las mejores condiciones del crecimiento celular

De acuerdo a la Figura 5 ambos factores demuestran de manera individual su importancia en el crecimiento celular, identificando al medio TAP como el mejor factor de crecimiento y con mayor producción de biomasa de acuerdo a lo observado en el cuadro 2.

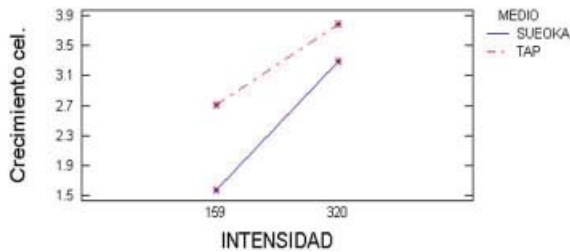


Figura 5. Desarrollo celular de los medios SUEOKA y TAP a 159 y 320 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Cuadro 2. Biomasa generada (mg/ml) a diferentes intensidades de luz.

	MEDIOS							
	SUEOKA				TAP			
	INTENSIDADES $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$				INTENSIDADES $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$			
	159		320		159		320	
TEMP 25°C	1.4306	1.6917	3.0182	3.5670	2.8839	2.5395	4.0401	3.5386

Conclusión

Se evaluó la contribución del medio de cultivo y la intensidad de la luz en el crecimiento celular concluyendo que el medio TAP permite mayor crecimiento celular con un promedio de 3.7894 mg/ml a intensidades de 320 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ en un lapso de 5 días, lo que representa 1189 cel/ml.

Referencias Bibliográficas

Bresser, L.; Janssen, M.; Baijens, T.; Tramper, J.; Mur, L.R.; Snel, J.; Wijffels, R.H.; (2000). Journal of applied Phycology. 12: 225-237. Referencia incompleta, falta el título del artículo.

Chávez, P. (2006). Caracterización del crecimiento de la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* para la bioproducción de hidrogeno. CINVESTAV-IPN Unidad Mérida. Proyecto de tesis.

Clark, A. W y Trinnaman, J. A. (2007). 2007 Survey of energy resources, [en línea]. London: world energy council. Disponible en: http://www.worldenergy.org/documents/ser_2007_final_online_version.pdf. [2008, 4 de agosto].

Dinga, P. (1989). Hydrogen: The ultimate fuel and energy carrier. International journal of hydrogen energy. 14: 777-784.

Elliot, D. (2003). Energy, society and environment. 29. Edition. New York: Routledye. Pp. 19-45, 129-145.

Ghirardi, M.L.; Kosourov, S.; Tsygankov, A.; Seibert M. (2000). Proceeding of the 2000 DOE Hydrogen Program Review, NREL/CP-570-28890.

Gonzales, L. E.; Cañizares, R. O.; Baena, S. (1997). Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a Colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*. Bioresource technology 60: 259-262.

Holgate, S. T. (1999). Air pollution and health. (Editor). San Diego, Academic press.

Janssen, M.; Janssen, M.; Winter, M.; Tramper, J.; Mur, L.; Snel, J.; Wijffél, R.H. (2000). Journal of Biotechnology. 78: 123-137.

Kim, J.P.; Kang, C.D.; Park, T.H.; Kim, M.S.; Sim, S.J. (2006). Enhanced hydrogen production by controlling light intensity in sulfur – deprived *Chlamydomonas reinhardtii* culture. International Journal of Hydrogen Energy. 31: 1585.

Komp, R. J. (1995). Practical photovoltaics: electricity from solar cells. Ann Arbor, Aetec publications.

Mattox, K. R y Stewart, K. D. (1984). Classification of the Green Algae: A concept Based on comparative. Department of botany, Miami University, Oxford, Ohio, USA. 1984. (SYSTEMATICS OF THE GREEN ALGAE, D. E. G. Irvine, D. M. John). Pp 41, 42, 57, 58.

Melis, A.; Zhang, L.; Foriester, M.; Ghirardi, M.L.; Seibert, M. (2000). Plant. physiology. 122: 127-135.

Morita, M.; Watanabe, Y.; Saiki, H. (2001). Biotechnology and Bioengineering. 74: 466-475. Cita incomplete. Nombre del artículo.

Pantí, L. (2007). Obtención de hidrógeno generado a partir de microalgas de la especie *Chlamydomonas reinhardtii*. CINVESTAV-IPN Unidad Mérida. Proyecto de tesis.

Polle, J.E.; Benemann, J.R.; Tanaka, A.; Melis, A.; (2000). Proceeding of the 2000 Hydrogen Program Review, NREL/CP-570-28890.

Ramírez, J. M y Torres, M. (2006). Generación limpia de energía eléctrica. Cinvestav: La investigación en la resolución de problemas, 25(4), 5-6.

Reinhold, W y Werner, Z. (1996). Hydrogen in the energy sector, [en línea]. Germany: System technik. Disponible en: <http://hymeb.de/index-e.html>. [2008, 15 de diciembre].

Rocheleau, R.; Turn, S. N.; Zaborsky, O.; Radway, J. (1999). Proceedings of the U.S. DOE hydrogen program review, NREL/CP-570-26938.

Stockar, U. V.; Janssen, M.; Patiño, R. (2006). A study of the growth for the microalga *Chlorella vulgaris* by Photo-Bio-Calorimetry and other on-line and of-line techniques. BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, 96(4), 759-761.

Tsigankov, A. A.; Kosourov, S. N.; Tolstygina, I. V.; Ghirardi, M. L.; Seibert, M. (2006). Hydrogen production by sulfur – deprived *Chlamydomonas reinhardtii* under photoautotrophic conditions, International journal of hydrogen energy. 31: 1574 – 1584.

Wang, Q y Thonson, K. (1999). Molecular simulation of hydrogen adsorption in single-walled nanotubes and idealized carbon slitpores. Journal of chemical physics 110: 577-586.

Wykoff D. D.; Davies J. P.; Melis A.; Grossman A. R. (1998). The regulation of photosynthetic electron-transport during nutrient deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*. 117: 129–139.

CALIDAD NUTRIMENTAL DE UN HIDROLIZADO PROTEÍ- NICO DE *Phaseolus lunatus* Y SU INCORPORACION EN UNA CREMA DE ZANAHORIA.

M. Segura-Campos, G. López-Von, L. Chel-Guerrero y D. Betancur-Ancona

RESUMEN

Los hidrolizados proteínicos son utilizados ampliamente en la industria alimentaria debido a que presentan mejores características nutrimentales y/o funcionales comparativamente con la proteína nativa. Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue determinar el valor nutrimental del hidrolizado proteínico de frijol lima (*Phaseolus lunatus*) obtenido por vía enzimática con Alcalase® y su incorporación en la elaboración de una crema de zanahoria a la cual se le evaluó el nivel de agrado. El estudio biológico de la calidad alimenticia del hidrolizado proteínico se realizó utilizando ratas como modelo experimental y estableció una excelente calidad nutrimental del mismo en función de los resultados de utilización neta de proteína (NPU) y el valor biológico (BV) que indicaron una capacidad máxima de utilización del alimento. La incorporación del hidrolizado con un 6.6% de grado de hidrólisis como ingrediente en la formulación de crema de zanahoria, dio como resultado un producto alimenticio con niveles de proteína de 22%, aproximadamente. La evaluación sensorial de las formulaciones elaboradas con 25, 50 y 75% de hidrolizado de frijol lima indicó un nivel de agrado entre 3.14 y 3.3 estadísticamente igual ($p > 0.05$) al control con 3.23. Estos valores fueron ligeramente superiores al punto de indiferencia de la escala hedónica ($3 = ni me gusta ni me disgusta$).

Palabras clave: *Phaseolus lunatus*, hidrólisis enzimática, valor biológico, crema de zanahoria, nivel de agrado

Introducción

Las leguminosas representan en la actualidad una alternativa de origen poco convencional para el desarrollo de nuevos suplementos nutricionales y alimentos para regímenes especiales en virtud del alto contenido de proteínas que éstas presentan (30%), en particular los aislados proteínicos derivados de la precipitación isoeléctrica (72%) (Chel-Guerrero et al. 2002). En la península de Yucatán, México, como en muchas regiones tropicales, existe una amplia variedad de leguminosas, entre ellas el frijol lima el cual ha demostrado ser una fuente potencial de alimentación, debido a su importante aporte de proteínas (26%) presentando rendimientos agrícolas de 850 kg/ha en el estado de Yucatán (Segura-Campos et al., 2008).

Sin embargo, debido a que el consumo de proteínas vegetales en estado nativo se encuentra limitado por su baja digestibilidad y su carácter potencialmente alergénico, resulta relevante buscar procesos que permitan explotar su uso como aditivos en el desarrollo de nuevos productos, permitiendo mejorar sus propiedades funcionales para facilitar su incorporación en sistemas alimenticios de consumo humano (Freitas et al., 2004). La modificación parcial del tipo hidrolítica de la estructura proteínica mediante el empleo de proteasas a condiciones moderadas de pH y temperatura (pH 5-9; 40-60°C), puede contribuir al desarrollo de nuevas fracciones proteínicas con características nutrimentales o funcionales definidas que contribuyan a reducir la alergenicidad de la proteína, producir péptidos con actividad biológica, conseguir requerimientos para dietas específicas o mejorar propiedades funcionales (Tardioli et al., 2003, Doucet et al., 2003).

La producción de hidrolizados proteínicos a partir de proteínas vegetales es un proceso bien establecido en la elaboración de numerosos productos alimenticios debido a que éstos aportan propiedades nutricionales y funcionales de interés. Los factores principales que determinan el uso nutricional de los hidrolizados son el valor nutricional, costo, sabor, antigé- nicidad, solubilidad y funcionalidad. Los hidrolizados proteínicos pueden presentar determinadas propiedades funcionales que lo hacen atractivo para la elaboración de productos alimenticios. Una de las características más notables de los hidrolizados es su elevada solubilidad bajo condiciones áci- das, permaneciendo los péptidos en solución incluso tras procesos térmicos tales como la pasteurización. Otra de las características intrínsecas de los hidrolizados es su baja viscosidad incluso a altas concentraciones. Estas dos características unidas a su elevada palatabilidad hacen de los hidrolizados proteínicos un producto único para el enriquecimiento proteico de diversos productos alimenticios (Millán et al., 2000).

En el tratamiento de diversas enfermedades se dedica una atención especial a la dieta y a la terapia nutricional, por lo que las modificaciones del patrón normal de alimentación resultan convenientes y aun esenciales en ciertas afecciones. Diversos estudios experimentales y clínicos han aportado numerosas evidencias relacionadas con los efectos bioestimulan-

tes y propiedades terapéuticas de los hidrolizados proteínicos de distintas fuentes, de manera que comienzan a ser esclarecidos los mecanismos mediante los cuales ejercen sus acciones moduladoras (Morris et al., 2002). Las dietas basadas en hidrolizados proteínicos son útiles en el manejo de la mucosa gastrointestinal, en pacientes hipercatabólicos, síndromes de malnutrición y en la disminución de las reacciones anafilácticas atribuidas a proteínas y macropéptidos. Desde una perspectiva clínica, las nuevas tecnologías de obtención de hidrolizados proteínicos a partir de fuentes no convencionales de proteínas podrían aportar soluciones a muchos aspectos de la terapéutica nutricional. Estos biopreparados se incluyen dentro de los alimentos para regímenes especiales, que se definen como aquellos soportes nutricionales preparados específicamente para satisfacer necesidades particulares de determinados seres humanos por razones físicas, fisiológicas o alteraciones metabólicas (Morris et al., 2001).

Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue determinar la calidad nutricional del hidrolizado proteínico de frijol lima (*Phaseolus lunatus*) con la enzima Alcalase®, utilizarlo como ingrediente en la elaboración de una crema de zanahoria y evaluar sensorialmente el producto con el propósito de sustentar su aplicación potencial como alimento funcional en el campo de la nutrición.

Materiales y Métodos

Materiales

Los granos de frijol lima (*Phaseolus lunatus*) se obtuvieron de la cosecha de 2003 de ejidos productores del estado de Campeche, México. Los reactivos grado analítico utilizados fueron suministrados por JT Baker (Phillipsburg, NJ, USA); Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA); Mércck (Darmstadt, Germany) y Bio-Rad (Hercules, CA, USA). La enzima Alcalase® 2.4L se obtuvo de los laboratorios NOVO (Copenhagen, Denmark).

Obtención del concentrado proteínico de frijol lima (*P. lunatus*)

Para la obtención del concentrado proteínico de frijol lima se empleó una modificación del método reportado por Betancur-Ancona et al. (2004) el cual consiste en un fraccionamiento en húmedo de los componentes de la harina de la leguminosa. Para la obtención de la harina, se realizó una molienda fina de los granos con un molino Cyclotec 1093 (Tecator Sweden) para disponer de un material capaz de pasar a través de un tamiz de 0.246 mm de tamaño de malla. Se preparó una suspensión de harina en agua destilada en una relación 1:6 p/v (harina/agua), se ajustó el pH a 11 con una solución de NaOH 0.5 N y se dejó en agitación por 1 h con un agitador mecá-

nico (Caframo RZ-1) a 400 rpm. Posteriormente, la suspensión se pasó por un molino de discos Kitchen-Aid y luego a través de tamices de malla 80 y 100 para separar el bagazo (rico en fibra) de la mezcla de almidón y proteína; el bagazo se lavó cinco veces con 200 ml de agua destilada (por cada Kg de harina) y el filtrado obtenido de estos lavados se incorporó con la mezcla de almidón y proteína obtenida anteriormente y se dejó reposar por 30 min a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de reposo (30 min) de la suspensión, se decantó el sobrenadante rico en proteína del sedimento rico en almidón. A este sobrenadante se le ajustó el pH a 4.5 con HCl 1N y posteriormente se centrifugó (centrífuga Mistral 3000i) a $1,317 \times g$ por 12 min para recuperar el precipitado, el cual se secó a -47°C y 13×10^{-3} mbar en un liofilizador Labconco. El sedimento rico en almidón y el bagazo se secaron a 60°C en una estufa de convección (Lab-Line).

Hidrólisis enzimática del concentrado proteínico de frijol lima (*P. lunatus*)

La hidrólisis enzimática del concentrado proteínico de frijol lima se efectuó de acuerdo al método reportado por Hamada (2000). Dicha hidrólisis se realizó bajo condiciones controladas de temperatura, pH y agitación en un vaso de precipitado acoplado a un baño de agua y equipado con un termómetro, un electrodo y un agitador mecánico. Dicho proceso se efectuó disolviendo en agua destilada el extracto proteínico de frijol lima para obtener una suspensión de proteína al 5% la cual se equilibró a 50°C y a pH 8 con NaOH 0.1 N para posteriormente añadir 25 mg de la enzima Alcalase® 2.4L la cual se dejó reaccionando durante 30 min. La hidrólisis se detuvo colocando las muestras en un baño de agua a 85°C durante 15 min y finalmente se centrifugaron a $10,000 \times g$ por 20 min.

Determinación del grado de hidrólisis

Se determinó el grado de hidrólisis (GH) utilizando el método reportado por Kim et al. (1990). Éste se estimó midiendo la cantidad de nitrógeno soluble en ácido tricloroacético (TCA) al 10% y su proporción con respecto a la cantidad de nitrógeno total en la suspensión de concentrado proteínico según la siguiente fórmula:

$$\%GH = (\text{Nitrógeno soluble en TCA al 10\%} / \text{Nitrógeno total}) \times 100.$$

Para evaluar la cantidad de nitrógeno soluble en TCA al 10%, se tomaron 10 ml del hidrolizado y se mezclaron con 10 ml de TCA al 20%. Esta mezcla se centrifugó a $12,100 \times g$ por 15 minutos y el nitrógeno presente en el sobrenadante se determinó por el método Kjeldahl (AOAC, 1997). El nitrógeno total se determinó tomando 10 ml de una suspensión de proteína preparada de

forma similar a la utilizada para desarrollar la hidrólisis enzimática pero sin la presencia de enzima y se le determinó el contenido de nitrógeno por el método Kjeldahl (AOAC, 1997) utilizando un sistema Kjeltec (Tecator, Sweden) y el método 954.01 de la AOAC (1997).

Composición proximal del hidrolizado proteínico de frijol lima

La composición proximal del hidrolizado proteínico de *P. lunatus* se determinó de acuerdo a los métodos oficiales descritos por la AOAC (1997). La humedad (método 925.09) se determinó por la pérdida de peso después de secar la muestra a 110°C por 4 horas. Las cenizas (método 923.03) se calcularon como el peso remanente después de calcinar la muestra en una mufla a 550°C durante 4 horas. El contenido de proteína (método 954.01) se calculó como nitrógeno x 6.25 utilizando el sistema Kjeltec (Tecator, Sweden). La grasa cruda (método 920.39) se cuantificó después de la extracción de la muestra durante 4 horas con hexano en un sistema soxhlet. La fibra cruda (método 962.09) se calculó después de su digestión ácida y alcalina con un sistema Fibertec (Tecator, Sweden). Los carbohidratos totales se estimaron como Extracto Libre de Nitrógeno (E.L.N.) por diferencia al 100% de los otros componentes proximales.

Pruebas biológicas en ratas como modelo experimental del hidrolizado proteínico

Se utilizó el método de Sammán y Farías (1993) para estimar la calidad alimenticia del hidrolizado proteínico de frijol lima. Para ello se elaboró una dieta libre en proteína y una dieta con el hidrolizado proteínico a evaluar (Cuadro 1). Los ingredientes de las mismas se mezclaron en un Kitchen-Aid y se les añadió agua hasta obtener una pasta manejable de la cual se elaboraron pellets en un molino Tor Rey Modelo 12 (25060) los cuales se sometieron durante 24 h a temperaturas de 60°C.

Cuadro 1. Composición de la dieta libre de proteínas y la dieta proteínica

Ingredientes	Dieta libre en proteínas	Dieta proteínica
Hidrolizado <i>P. lunatus</i>	-----	16 g
Glucosa	15 g	15 g
Almidón de maíz	76.90 g	61.01g
Celulosa	2 g	2 g
Aceite de maíz	5 ml	4.89 ml
Vitaminas	0.50 g	0.50 g
Minerales	0.60 g	0.60 g

Para realizar este ensayo se utilizaron ratas de 21 días raza Wistar alojadas de acuerdo al protocolo de manejo animal (Temperatura 25°C, humedad 85 ± 5, pe-

ríodos de 12 horas de luz/oscuridad). La calidad de la proteína de *P. lunatus* se evaluó una vez que las ratas se alimentaron durante 10 días con la dieta libre de proteína y presentaron después de este período de alimentación una pérdida de peso del 25% aproximadamente, en comparación con su peso inicial. De esta manera se obtuvieron 2 grupos de 4 ratas cada uno, las cuales fueron puestas en ayuno durante cuatro horas y fueron pesadas (W0). Posteriormente, a éstas se les proporcionó *ad libitum* agua y la dieta con hidrolizado de frijol lima a evaluar. Al finalizar el periodo de alimentación, se suspendieron las dietas y se determinó el peso de los animales (W1). Finalmente, las ratas se dejaron en ayuno un período de 4 horas y se midió el peso de las mismas (W2) para determinar la pérdida de peso (WL) expresado como porcentaje de peso ganado durante el periodo de alimentación de 24 horas (W1-W0) de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$WL\% = (W1 - W2) / (W1 - W0) \times 100 \quad [1]$$

El valor de la utilización neta de proteína (NPU) y el valor biológico (BV) fueron calculados usando las siguientes ecuaciones:

$$BV = 219.5 - 95.6 \log (WL\%) \quad [2]$$

$$NPU = 211.8 - 95.1 \log (WL\%) \quad [3]$$

Incorporación de hidrolizado proteínico de frijol lima en la formulación de crema de zanahoria

Se realizaron cuatro formulaciones de crema de zanahoria (Cuadro 2); la primera fue utilizada como control ya que se elaboró sin la incorporación de hidrolizado proteínico de frijol lima y las tres restantes se realizaron sustituyendo con hidrolizado un 25, 50 y 75% del contenido de leche semidescremada utilizada como ingrediente en la preparación de las cremas. Para la elaboración de los productos en primer lugar se efectuó la cocción de las zanahorias, posteriormente éstas se licuaron con una taza de agua y 500 ml de leche semidescremada (control) o la cantidad estimada de leche e hidrolizado proteínico correspondiente. Finalmente, se dejó hervir el producto y se añadió mantequilla y consomé.

Cuadro 2. Composición de las diferentes preparaciones de la crema de zanahoria

Ingredientes	Control	Hidrolizado al 25%	Hidrolizado al 50%	Hidrolizado al 75%
Zanahorias	520 g	520 g	520 g	520 g
Leche semidescremada	500 ml	375 ml	250 ml	125 ml
Agua	250 ml	250 ml	250 ml	250 ml
Consomé	11 g	11 g	11 g	11 g
Mantequilla	15 g	15 g	15 g	15 g
Hidrolizado	-----	125 ml	250 ml	375 ml

Composición proximal de las cremas de zanahoria

La composición proximal de las tres formulaciones de crema de zanahoria elaboradas a tres niveles de incorporación de hidrolizado proteínico de frijol lima así como la formulación control se determinó de acuerdo a los métodos oficiales descritos por la AOAC (1997) indicados anteriormente.

Evaluación sensorial de las cremas de zanahoria elaboradas con hidrolizado proteínico de frijol lima

La evaluación sensorial de las cuatro formulaciones de crema de zanahoria se realizó mediante una prueba del nivel de agrado, utilizando una escala hedónica estructurada de 5 puntos descriptivos en los cuales se puntualizó la característica de agrado (Anzaldúa, 1994). Dicha escala contó con un indicador del punto medio con el fin de proporcionarle a cada juez consumidor la facilidad de encontrar un punto de indiferencia al producto en cuestión (3= ni me gusta ni me disgusta). Los puntos mayores a 3 indicaron niveles de desagrado; me disgusta moderadamente (4), me disgusta mucho (5) mientras que los puntos menores a 3 indicaron niveles de agrado, me gusta mucho (1), me gusta moderadamente (2). Los productos elaborados se sirvieron a una temperatura de 66°C para ser evaluados sensorialmente por un panel conformado por 80 jueces no entrenados (hombres y mujeres entre 18 y 35 años de edad) los cuales señalaron el nivel de agrado del producto. Las formulaciones de crema de zanahoria elaboradas a tres niveles de incorporación con el hidrolizado proteínico de frijol lima y el producto control se proporcionaron a los jueces en recipientes de plástico codificados con un número al azar de tres dígitos junto como un vaso de agua para enjuagarse la boca entre muestra y muestra y una hoja de respuestas donde indicaron el nivel de agrado de los productos.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron evaluados mediante medidas de tendencia central y dispersión, así como análisis de varianza y comparación de medias (método Duncan) para establecer las diferencias con el paquete computacional Statgraphics plus versión 5.1 y de acuerdo a los métodos señalados por Montgomery (2004).

Resultados y Discusiones

Grado de hidrólisis del hidrolizado proteínico de frijol lima (*P. lunatus*) obtenido enzimáticamente

El porcentaje de grado de hidrólisis obtenido de la proteólisis de frijol lima con Alcalase® 2.4 L fue de 6.68%. Los parámetros que determinaron el GH del producto final fueron la concentración de sustrato, la relación enzima/sustrato, el tiempo de incubación, condicio-

nes fisicoquímicas como el pH y la temperatura así como la actividad enzimática, es decir su actividad específica y tipo de actividad. En este sentido, la endoproteasa Alcalase® 2.4 L producida por *Bacillus licheniformis* no solo influyó en el grado de hidrólisis sino también en el tipo de péptidos producidos por su componente principal la Subtilisina A la cual ha sido utilizada con éxito para mejorar las propiedades funcionales de proteínas animales (Wanasandura et al., 2002) y vegetales (Vioque et al., 2000). Esta propiedad fundamental del hidrolizado de frijol lima, es decir, el porcentaje de enlaces peptídicos rotos en relación a la proteína original o GH, determinará en gran medida las restantes características del mismo. Las características del hidrolizado obtenido estarán determinadas por el uso que se le quiera dar a este. Sin embargo, por el porcentaje de grado de hidrólisis obtenido en el frijol lima, puede clasificarse como hidrolizado potencial para la mejora de las propiedades funcionales al producir una disminución del tamaño de los péptidos y un incremento de la generación de grupos polares como NH₄ y COO- lo cual se traduce en un incremento de la solubilidad la cual es una premisa básica necesaria para la aplicación del hidrolizado en multitud de alimentos procesados. Otro factor a influir en la funcionalidad del hidrolizado de *P. lunatus* es la posible exposición de los residuos hidrófobos de la proteína que estaban inmersos en el interior de la proteína intacta. En este sentido, la hidrólisis limitada (GH menor del 10%) de las proteínas de frijol lima posiblemente mejore las propiedades funcionales de la proteína original, además de la solubilidad, como el poder emulsificante y espumante así como la capacidad de absorción de agua o aceite como resultado de un menor tamaño de los péptidos, un incremento de grupos NH₄ y COO- así como la exposición de sus grupos hidrófobos.

Pruebas biológicas en ratas del hidrolizado proteínico de *P. lunatus*

El estudio biológico de la calidad alimenticia del hidrolizado proteínico de frijol lima efectuado en ratas, puso de manifiesto un incremento en el peso de las ratas alimentadas con el hidrolizado proteínico de origen vegetal (Cuadro 3). El porcentaje de pérdida de peso obtenido, expresado como peso ganado por las ratas después de haber sido alimentadas con hidrolizado proteínico de *P. lunatus* durante 24 horas, estableció el buen balance de proteínas y la calidad nutricional del hidrolizado enzimático al presentar un valor de WL menor al reportado por Sarmán y Farías (1993) en el huevo (33.7%), el aislado de girasol (49.8%) y el gluten de trigo (110.5%) caracterizados por presentar un alto, medio y bajo balance de proteínas, respectivamente. El resultado obtenido en el presente estudio pone de manifiesto que la pérdida de peso observada en las ratas sujetas a períodos consecutivos de alimentación y ayuno permite la rápida y se-

micuantitativa determinación de la calidad nutritiva del hidrolizado proteínico de frijol lima.

Cuadro 3. Evaluación nutricional en ratas del hidrolizado de *P. lunatus*

Proteína	W ₁ -W ₀	W ₁ -W ₂	WL%	NPU	BV
Grupo 1 <i>P. lunatus</i>	2.28 ^a	0.26 ^a	11.72 ^a	111.09 ^a	118.26 ^a
Grupo 2 <i>P. lunatus</i>	1.94 ^a	0.24 ^a	12.44 ^a	108.14 ^a	115.30 ^a
Promedio	2.11	0.25	12.08	109.62	116.78

Sammán y Farías (1993) representan de manera simple y práctica la calidad nutricional de una proteína analizada, al asignar valores de %WL menores de 35%, en un rango de 35 a 50% y mayores a 50% para establecer una alta, buena y baja calidad nutricional (Figura 1).

Calidad Nutricional	Rango de Calidad			
	Alta	Buena	Baja	Muy baja
WL (%)	0 - 35	35 - 50	50 - 100	100 -
NPU	63 -	50 -	22 -	-
BV	72 -	57 -	28 -	-

Figura 1. Asociación entre la calidad nutricional de las proteínas y el porcentaje de pérdida de peso (%WL), la utilización neta de la proteína (NPU) y el valor biológico (BV)

Al relacionar el porcentaje de pérdida de peso expresado como el porcentaje de peso ganado durante el período de alimentación de 24 horas, con la utilización neta de proteína o medida del porcentaje de proteína que se retuvo en la rata en relación con la consumida, y el valor biológico o medida de la absorción de la proteína procedente de la ingesta de la dieta rica en hidrolizado de frijol lima que representa la capacidad máxima de utilización de la misma, los resultados determinaron la ganancia en peso del grupo de ratas alimentadas con hidrolizado enzimático de *P. lunatus*, demostrando con ello no solo la asimilación de la proteína hidrolizada sino también su calidad nutricional.

Composición proximal del hidrolizado proteínico de frijol lima y de las cremas de zanahoria

La incorporación de distintos niveles de hidrolizado proteínico de frijol lima a una crema de zanahoria dio como resultado un producto alimenticio de cali-

dad nutrimental con contenidos de proteína de hasta el 22.06%. La sustitución de leche semidescremada como fuente de proteína en la elaboración del producto alimenticio por 25, 50 y 75% de hidrolizado enzimático de *P. lunatus*, no mostró diferencia estadística significativa en el nivel de proteína de las cremas elaboradas así como con el producto control ($p < 0.05$). Los resultados ponen de manifiesto, la importancia de alternativas proteínicas de origen poco convencional como las fuentes vegetales en la elaboración de productos alimenticios cuya principal fuente de proteína es de origen animal, la cual por sus altos costos de producción y distribución así como sus altos niveles de grasa saturada han hecho necesario buscar fuentes alternas para la obtención de este importante nutrimento a un menor costo y con la viabilidad de reducir los riesgos de ciertas enfermedades crónicas. El hidrolizado proteínico de *P. lunatus* fue un componente nutrimental potencialmente importante en la elaboración de la crema de zanahoria cuyo contenido de proteína fue mayor al reportado en productos alimenticios como la crema de papa (17%), champiñones (8.57%) y espárragos (11.41%) los cuales a su vez muestran un contenido de grasa cruda mayor (19.5- 40.3%) a la observada en las diferentes formulaciones de crema de zanahoria elaboradas con hidrolizado de frijol lima (12.3- 16.68%) (Cuadro 4) (Datos obtenidos del Nutritionist Pro Versión demo 2.0.90).

Evaluación sensorial de las cremas de zanahoria elaboradas con hidrolizado proteínico de frijol lima

El análisis de varianza de los promedios de las calificaciones otorgadas por los jueces en la prueba de nivel de agrado de la crema de zanahoria elaborada con tres niveles de hidrolizado proteínico de frijol lima y el grupo control no mostró diferencia estadística significativa ($p > 0.05$) entre los productos elaborados. Con el análisis de comparación de medias de Duncan, se encontró que los cuatro productos fueron estadísticamente iguales ($p > 0.05$), presentando medias de 3.23, 3.15, 3.3 y 3.14 para el producto control y las cremas de zanahoria elaboradas con 25, 50 y 75% de hidrolizado enzimático, respectivamente, lo cual en la escala hedónica significó que los cuatro productos se encontraron en el punto de indiferencia (ni me gusta ni me disgusta) (Figura 2). Las propiedades funcionales del hidrolizado de *P. lunatus*, utilizado como ingrediente alimenticio en la elaboración de crema de zanahoria a tres niveles de incorporación, no influenciaron sobre el carácter sensorial de los mismos sin embargo, los tres productos elaborados a base de hidrolizado proteínico mostraron un papel similar, en el comportamiento físico del producto o de los ingredientes alimenticios durante su preparación y transformación, al observado en la crema elaborada con 100% de proteína de origen animal ya que no se observó diferencia estadística significativa en el nivel de agrado de los mismos por parte de los consumidores.

Cuadro 4. Composición proximal experimental del hidrolizado y de la crema de zanahoria y composición calculada de las distintas formulaciones

	Humedad (%)	Cenizas (%)	Proteína cruda (%)	Grasa cruda (%)	Fibra cruda (%)	E.L.N (%)
Hidrolizado de <i>Phaseolus lunatus</i>	3.62 ^a	7.59 ^b	61.60 ^b	1.35 ^a	0.08 ^a	29.39 ^a
Crema de zanahoria (Control)	10.7 ^c	6.63 ^a	21.4 ^a	13.83 ^c	3.73 ^b	54.41 ^d
Crema de zanahoria 25% hidrolizado	9.7 ^d	6.59 ^a	22.06 ^a	14.84 ^d	4.02 ^c	52.47 ^c
Crema zanahoria 50% hidrolizado	9.2 ^c	6.84 ^a	21.41 ^a	12.3 ^b	4.33 ^d	55.09 ^d
Crema de zanahoria 75% hidrolizado	8.3 ^b	6.14 ^a	21.56 ^a	16.86 ^e	4.69 ^d	50.75 ^b
*Crema de papa	13.33	11.02	17.47	19.50	NR	51.91
*Crema de Champiñones	18.78	11.71	8.57	40.3	NR	39.40
*Crema de espárragos	15.95	14.73	11.41	22.69	NR	53.41

*Datos obtenidos del Nutritionist Pro Versión 2.0.90

NR no reportado

a-e letras diferentes en la misma columna indica diferencia estadística significativa ($p < 0.05$)

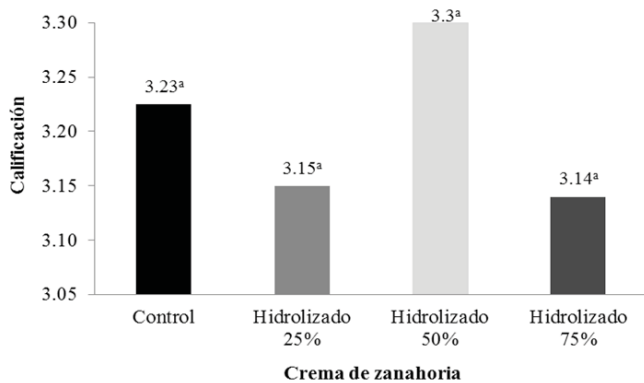


Figura 2. Calificaciones de la prueba de aceptación sensorial de las cremas de zanahoria elaboradas con distintos niveles de hidrolizado proteínico de frijol lima

La distribución de frecuencia de las calificaciones de las cuatro cremas de zanahoria evaluadas indicó que todos los productos fueron calificados en su mayoría de las veces con un valor cercano al punto de indiferencia (3), lo cual indica que los panelistas calificaron más frecuentemente “ni me gusta, ni me disgusta” particularmente en cuanto al sabor (Figura 3). Al elaborar las cremas de zanahorias con los hidrolizados proteínicos se esperaba que el producto elaborado a base de hidroliza-

dos de Alcalase de *P. lunatus*, no presentara diferencias en cuanto al nivel de agrado del producto control y los elaborados utilizando como fuente proteínica hidrolizado vegetal. Esta hipótesis fue comprobada en el presente estudio, ya que los resultados obtenidos indicaron que la frecuencia de los jueces no entrenados por calificar en el punto de indiferencia de la escala hedónica los productos elaborados a base de hidrolizado fue similar a la observada en la crema de zanahoria utilizada como control resultando una alternativa como promotor de la salud más allá del valor nutricional que el producto proporciona por ser fuente de componentes bioactivos como los procedentes de la hidrólisis de las proteínas alimentarias, es decir los péptidos biológicamente activos, los cuales por sus propiedades fisicoquímicas y fisiológicas entran en el concepto de nutrición personalizada abriendo un abanico de posibilidades en el mercado de los alimentos funcionales.

Durante la digestión fisiológica de las proteínas normalmente se generan péptidos en el tracto gastrointestinal. En este sentido, el frijol lima ha sido consumido de manera segura como producto alimenticio por años sin efectos dañinos aparentes, por lo que el riesgo de toxicidad causado por péptidos formados por hidrólisis enzimática es prácticamente nula. Aunque dichos pépti-

dos pueden ser absorbidos en la sangre, no existen reportes de toxicidad de péptidos o hidrolizados proteínicos de frijol lima hasta la fecha (Wang y Gonzalez de Mejía, 2005). A este respecto, estudios toxicológicos realizados en animales a corto y largo plazo así como en humanos para comprobar la seguridad de hidrolizados proteínicos o péptidos biológicamente activos obtenidos de diversas fuentes ponen de manifiesto que la administración de los mismos incluso a dosis muy altas, no genera efectos adversos (Segura-Campos et al. 2010).

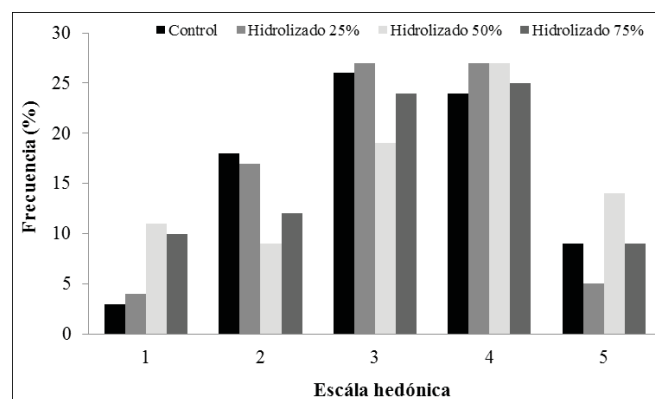


Figura 3. Distribución de frecuencias de las calificaciones de las cremas de zanahoria elaboradas con distintos niveles de hidrolizado proteínico de frijol lima

Conclusiones

El frijol lima es una importante fuente de proteínas, característica que lo ubica como una materia prima adecuada para la elaboración de productos proteínicos, siendo la hidrólisis proteínica empleando Alcalase® 2.4 L una alternativa aplicable para el aprovechamiento de este recurso vegetal. La hidrólisis enzimática permitió la formación de nuevos productos con propiedades superiores a las de la materia prima original sin hidrolizar. La relación del porcentaje de pérdida de peso, la utilización neta de proteína y el valor biológico puso de manifiesto la calidad nutrimental del hidrolizado proteínico de la leguminosa haciéndola factible de emplear en la elaboración de productos fisiológicamente funcionales. La incorporación de dicho hidrolizado como ingrediente en la elaboración de crema de zanahoria dio como resultado un producto de calidad nutrimental no observándose diferencia estadística significativa en el contenido de proteína del producto elaborado con 100% de fuente proteínica animal y aquellos adicionados con hidrolizado proteínico de frijol lima.

Referencias Bibliográficas

Anzaldúa, A. (1994). La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y la práctica. Ed. Acribia. Zaragoza, España.

Association of Official Analytical Chemists

(AOAC). (1997). In W. Horwitz (Ed.), Official methods of analysis (17th ed.). Washington, D.C., USA, AOAC.

Betancur-Ancona, D., Gallegos-Tintoré, S., Chel-Guerrero, L. (2004). Wet fractionation of *Phaseolus lunatus* seeds: partial characterization of starch and protein. Journal of the Science of Food and Agricultural, 84, 1193-1201.

Chel-Guerrero, L., Pérez-Flores, V., Betancur-Ancona, D., Dávila-Ortiz, G. (2002). Functional properties of flours and protein isolates from *Phaseolus lunatus* and *Canavalia ensiformis* seeds. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 584-591.

Doucet, D., Otter, D. E., Gauthier, S. F., Foegeding, E. A. (2003). Enzyme-induced gelation of extensively hydrolyzed whey proteins by Alcalase: peptide identification and determination of enzyme specificity. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51(21), 6300-6308.

Freitas, R. L., Teixeira, A. R. y Ferreira, R. B. (2004). Characterization of the proteins from *Vigna unguiculata* seeds. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52(6), 1682-1687.

Hamada, J. S. (2000). Characterization and functional properties of rice bran proteins modified by commercial exoproteases and endoproteases. Journal of Food Science, 65(2), 305-310.

Kim, Y. S., Park, W. S. P., Rhee, C. K. (1990). Functional properties of proteolytic enzyme modified soy protein isolate. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 38(3), 651-656.

Millán, F., Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Clemente, A., Pedroche, J., Bautista, J. (2000). "Hidrolizados proteicos para la preparación de alimentos específicos". En: Jornada Internacional Sobre Proteínas Alimentarias. Editado por Universidad de Sevilla, Secretariado de Publicaciones. España, pp. 99-110. ISBN: 84-472-0611-4.

Montgomery, D. (2004). Diseño y análisis de experimentos. Limusa-Wiley, México.

Morris Quevedo H. J., Almarales Arceo, A., Carrillo Farnés, O., Abdala Díaz, R.T. (2001). Combinaciones enzimáticas en la obtención de hidrolizados proteicos a partir de *Chlorella vulgaris*. Revista Cubana de Alimentación y Nutrición, 15 (2), 85-89.

Morris Quevedo, H.J., Borges Quintana L.B., Martínez Manrique, C.A., Carrillo Farnés, O. (2002). Aspectos bioquímicos de la recuperación de ratones BALB/c malnutridos con un hidrolizado proteico de *Chlorella vulgaris*. Revista Cubana de Alimentación y Nutrición, 16(1), 5-12.

Sammán, N. y Farías, N. (1993). A 28-h method for estimating protein nutritional quality. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 41, 52-56.

Segura-Campos, M., Chel-Guerrero, L., Betancur-Ancona, D. (2008). Synthesis and partial characterization of octenylsuccinic starch from *Phaseolus lunatus*. Food Hydrocolloids, 22, 1457-1474.

Segura-Campos, M.R., Chel-Guerrero, L.A., y Betancur-Ancona, D.A. (2010). Biological studies of angiotensin converting enzyme inhibiting peptides. In: *Nutraceutical and Functional Foods*. Editores: M.E. Jaramillo-Flores, L. Chel-Guerrero, E.C. Lugo-cervantes. Studium Press LLC. Houston, Texas. EE.UU. ISBN 1-933699-59-0.

Tardioli, P. W., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J. M. y Giordano, R. L. C. (2003). Design of new immobilized-stabilized carboxypeptidase A derivative for production of aromatic free hydrolysates of proteins. *Biotechnology Progress*, 19(2), 565-574.

Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Clemente, A., Pedroche, J. y Millán, F. (2000a). Partially hydrolyzed rapeseed protein isolates with improved functional properties. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77, 447-450.

Wanasundara, P. K. J. P. D., Amarowicz, R., Pegg, R. B. y Shand, P. J. (2002). Preparation and characterization of hydrolyzed proteins from defibrinated bovine plasma. *Journal of Food Science*, 67, 623-630.

Wang, W. y Gonzalez de Mejía, E. A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent ge-related chronic diseases. (2005). *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 4, 63-78.

CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE HIDROLIZADOS ENZIMÁTICOS DE LA PROTEÍNA DE FRIJOL TERCIOPELO *Mucuna pruriens*.

G. Cruz-Cervera, A. Castellanos-Ruelas, G. Rosado-Rubio, L. Chel-Guerrero¹.

Introducción

Una problemática que nos envuelve en tiempos actuales es el deterioro de la capa de ozono, que incrementa la frecuencia de enfermedades ocasionadas por la exposición a los rayos del sol y los radicales libres, principalmente las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno se encuentran como el hidroxilo (OH•), ion superóxido (O₂•), óxido nítrico (NO•), alcoxilo (RO•) y el peroxilo (ROO•) (Vázquez et al, 2006). O₂ y OH causantes de enfermedades de la piel, envejecimiento, cáncer, infecciones virales, trastornos neurodegenerativos y trastornos cardiovasculares, entre otros. Una alternativa para reducir el efecto dañino de todos estos problemas es la incorporación en los alimentos de péptidos bioactivos bien sea en forma purificada o como componentes de los denominados hidrolizados proteínicos. A esta categoría pertenecen los péptidos antioxidantes que, como otros antioxidantes naturales, pueden inhibir la oxidación de moléculas previniendo los procesos de envejecimiento celular y el riesgo de padecer aquellas enfermedades degenerativas. Algunos aminoácidos que abundan en estos péptidos son tirosina, histidina, metionina, lisina, prolina y triptófano ya que son susceptibles a la oxidación (Dean et al, 1997; Chen et al, 1998).

Nutritionalmente, las proteínas son fuente de nitrógeno y aminoácidos esenciales y en cierta proporción de energía, que son necesarios para el crecimiento y mantenimiento del cuerpo (Van der Ven *et al.*, 2001; Janitha *et al.*, 2002). En la actualidad, se tienen cuatro formas para incluir aminoácidos en nuestra sangre: las proteínas de los alimentos, aminoácidos libres, hidrolizados proteínicos y suplementos de proteínas intactas (Maninen, 2004) Sin embargo, el consumo de estos últimos productos puede causar reacciones alérgicas en individuos sensibles. Como una alternativa a este problema, están los hidrolizados proteínicos los cuales pueden ser utilizados en la dieta conservando su valor nutricional (Van der Ven *et al.*, 2001) adicionalmente a cierta capacidad bioactiva que se genere. Durante la hidrólisis de las proteínas, la elección de la enzima y las condiciones del proceso influyen en la composición del hidrolizado y por lo tanto en sus propiedades bioactivas. La funcionalidad fisiológica o bioactividad (biofuncionalidad) que es la capacidad que tienen cuando son consumidas de tener efecto antihipertensivo, antioxidante, antimicrobiano, antitrombótica, inmunomodificación, anticariogénica, entre otras.

En 1950 se observó que los péptidos fosforilados derivados de la caseína reforzaban la calcificación de los huesos en infantes raquíticos independientemente de la vitamina D (Mellander, 1950). Siendo ésta observación considerada como el primer indicador de péptidos bioactivos derivados de alimentos y desde entonces han sido identificados numerosas fracciones peptídicas con diversas funciones biológicas, siendo las más estudiadas las derivadas de las proteínas de la leche por ser esta uno de los primeros nutrimentos con los que tenemos contacto en nuestra vida (Korhonen y Pihlanto, 2003). Sin embargo, la gran diversidad de efectos fisiológicos

¹Facultad de Ingeniería Química-UADY.Periférico Norte
Kilometro 33.5, Tablaje Catastral 13615, Col. Chuburna
de Hidalgo Inn, C.P. 97203. Mérida, Yucatán, México.
e-mail: eguererr@uady.mx

obtenidos de los mismos ha motivado el interés por obtener péptidos de fuentes tan diversas como el plasma de la sangre de humanos (Nakagomi et al., 2000) y plasma de sangre de bovino (Wanasundara et al., 2002), la carne de pollo (Saiga et al., 2006), músculo y esqueleto de pescado (Neves et al., 2004; Je et al., 2004), el girasol (Megías et al., 2004), garbanzo (Clemente et al., 1999), espinaca (Yang et al., 2003), chícharo (Taylor et al., 2004) sorgo (Kamath et al., 2007), frijol mungo (Hong et al., 2005), huevo (Yoshii et al., 2001; Miguel et al., 2006) y la soya (Jeong et al., 2003), entre otras. Sin embargo, el interés por el aprovechamiento de los residuos agroindustriales ricos en proteínas, principalmente semillas o granos, ha conducido en los últimos años al desarrollo de procesos de hidrólisis enzimática de aislados proteínicos vegetales, como el garbanzo, espinaca, girasol y soya, etc (Pedroche et al., 2002; Yang et al., 2003; Megías et al., 2004).

Peña y Xiong (2002) obtuvieron aislados proteínicos de soya sometidos a tratamientos con temperatura e hidrolizados por medio de 3 proteasas purificadas (pepsina, papaína y quimotripsina) y 3 crudas (alcalasa, protamex y flavourzyme). Los hidrolizados fueron incubados en un sistema oxidativo liposomal para evaluar la actividad antioxidante. El grado de hidrólisis de los aislados proteínicos varió desde 1.7 hasta 20.6%. Los tratamientos que presentaron mayor efecto inhibitorio de la oxidación lipídica fueron para los hidrolizados con quimotripsina y flavourzyme. En estudios recientes (Vioque et al., 2006) el aislamiento de péptidos provenientes del hidrolizado proteínico de garbanzo obtenidos con alcalasa presentó una elevada actividad antioxidante, y al purificar una fracción peptídica del mismo, se observó un poder antioxidante 100 veces mayor que el del hidrolizado del cual provino.

En la península de Yucatán, existe una gran variedad de fuentes proteínicas susceptibles de utilizarse en la obtención de proteínas o derivados como son los hidrolizados que contengan péptidos tecnológicos y biológicamente activos, como por ejemplo el piñoncillo (*Jatropha curcas*) y las leguminosas caupi (*Vigna unguiculata*) frijol lima (*Phaseolus lunatus*) y frijol terciopelo (*Mucuna pruriens*) por mencionar algunos ejemplos; estos son considerados componentes nutrimentales potencialmente importantes en la dieta del ser humano debido a su importante aporte de proteínas y carbohidratos (Chel et al., 2002; Aregheore et al., 2003).

En el sureste de México y, principalmente en el estado de Yucatán, se ha incrementado la presencia de *Mucuna pruriens*, como abono verde y de cobertura en el sistema de milpa. Una consecuencia de esta práctica agrícola, ha sido el incremento en la disponibilidad de *M. pruriens* en la zona. Se han reportado producciones de 0.7 a 1.25 ton/ha de semilla, esto en cultivos mixtos con maíz (Loyra, 2007) bajo las condiciones climatológicas propias de la región. Las semillas crudas de frijol terciopelo

contienen alrededor de 27% de proteínas, 56.5 % de almidón. El aprovechamiento integral de este grano se ha establecido mediante una molienda húmeda en la cual se separan las proteínas en forma de concentrado, obteniéndose como coproducto el almidón y subproducto la fibra (Corzo, 2000). Por lo anterior un aspecto importante para el desarrollo de preparaciones nuevas de proteínas o sus derivados en forma de concentrados o aislados proteínicos o bien de los hidrolizados son la intensidad de la hidrólisis y la capacidad bioactiva de los productos.

Objetivo

Evaluar la capacidad antioxidante de los hidrolizados enzimáticos obtenidos de la proteína concentrada de los granos de frijol terciopelo (*Mucuna pruriens*).

Materiales y Métodos

Obtención de la harina

Los granos de *M. pruriens*, se colectaron de parcelas experimentales localizadas en la población de Muna, Yucatán. Los granos se quebraron en un molino Grinding modelo 4-E (Quaker City, USA), con el fin de separar la cáscara y el endospermo por medio de soplado con aire. Posteriormente los granos quebrados se molieron en un equipo Thomas-Wiley modelo 4 (Thomas Scientific, USA) con un tamiz integrado de 5mm de apertura. La harina obtenida se pasó en un tamiz con una apertura de malla de 60 y se almacenó a temperatura ambiente en un recipiente cerrado de plástico hasta su posterior utilización.

Obtención del concentrado proteínico

Para la obtención del concentrado proteínico de frijol terciopelo (CPM) se empleó el método reportado por Betancur et al. (2004) con modificaciones. Se preparó una dispersión de harina de frijol terciopelo con una solución de bisulfito de sodio al 0.3% en una relación 1:6 (p/v). Posteriormente el pH se ajustó a 11 con hidróxido de sodio (NaOH) 1 N y se agitó por 1h a 400 rpm con un mixer Stir-pak modelo 50002-30, (Cole-Palmer Instrument Company, USA). Pasado este tiempo se dejó sedimentar la suspensión por 30 min y posteriormente se pasó a través de una malla 80, separando el sólido (fibra), de la parte líquida con proteína y almidón. El residuo sólido se lavó cinco veces con 200 mL de bisulfito al 0.3% y la suspensión resultante se filtró nuevamente a través de una malla 80 y el sobrenadante se unió con el anterior y se pasaron por una malla 100. El residuo de fibra se descartó y la suspensión se dejó reposar hasta la completa sedimentación del almidón, aproximadamente 1h, y después por sifoneo se separó la proteína solubilizada que se encuentra en el sobrenadante, precipitándola en el punto isoeléctrico (PI)

ajustándolo con HCl 0.1 N o NaOH 0.1 N. Previamente se determinó el PI por medio de una curva de solubilidad de nitrógeno según la metodología reportada por Chel *et al.*, (2002). Se recuperó el precipitado centrifugando a 2500 r.p.m. durante 15 min en un equipo marca Mistral 3000i (Fisons Scientific Equipment, USA) y se secó a -47°C y 0.045mBAR en un liofilizador Freezone 4.5 (Labconco, USA) durante 96 h y se almacenó en un desecador con sílice gel hasta su posterior uso, considerándolo como el CPM.

Hidrólisis Enzimática

Se realizó posteriormente la hidrólisis enzimática del CPM empleando la enzima comercial de Alcalasa® 2.4L (Novo Nordisk) a diferentes concentraciones: 0.3, 0.06 y 0.03 AU/g, así como de manera secuencial de esa enzima y Flavourzyme® 500 LAPU/g (Novo Nordisk) a diferentes tiempos, según el caso (desde 5 hasta 120 min). La concentración de la enzima Flavourzyme fue de 50 LAPU/g. El experimento se realizó de acuerdo a un diseño en bloques incompletos al azar donde los tratamientos fueron los diferentes tiempos de reacción, los bloques los diferentes sistemas enzimáticos y la variable de respuesta fue el grado de hidrólisis (GH). Las condiciones para el tratamiento de hidrólisis fueron de acuerdo a Yust *et al.* (2003) con algunas modificaciones. Se preparó una suspensión al 5% (p/v) en relación con el contenido de proteína del CPM y se hidrolizó a los tiempos ya citados con una relación enzima-sustrato para todos los casos de 1:10 (v/v), ajustando a un pH 7.5 para A y 7 para F, con NaOH 1N o HCl 1N y a una temperatura de 50°C con agitación constante. La hidrólisis enzimática se detuvo por calentamiento a 85°C por 15 minutos en un baño de con agua. En el caso del sistema secuencial la mitad del tiempo de hidrólisis se efectuó con cada una de las enzimas. Una vez finalizado el tratamiento, los hidrolizados fueron centrifugados en un equipo Beckman LE 80K a $16211 \times g$, durante 30 min a 4°C . Se descartó el precipitado obtenido y los sobrenadantes, que contenían los péptidos provenientes de la hidrólisis se liofilizaron en un equipo Labconco a -43°C y 0.045 mBAR.

Determinación del grado de hidrólisis

El grado de hidrólisis (GH) fue determinado en todos los tratamientos mediante la técnica del orto-ftaldialdehído (OPA) que se basa en la determinación de grupos aminos libres, propuesta por Nielsen *et al.*, (2001) con algunas modificaciones. Se preparó una curva de calibración empleando como testigo diferentes volúmenes de serina en dilución 1:10(v/v), la cual fue preparada con 30.6 mg en 30 mL de agua destilada, y 1.5 mL del reactivo de OPA, el cual será preparado con 150 mL de agua destilada, 7.62 g de tetraborato de sodio y 200 mg de dodecil sulfato de sodio (SDS). Por otra parte se disol-

vieron 160 mg de orto-ftaldialdehído (OPA) en 4 mL de etanol. Previo a la determinación se mezclaron las soluciones anteriores y se agregaron 176 mg de ditiotreitilo (DTT), las cuales se aforaron a 200 mL con agua destilada. El reactivo de OPA y el testigo fueron agitados en un vórtex durante 5 s y las absorbancias fueron leídas a 340 nm, después de 2 min

Cuadro 1. Curva de calibración del estándar L-serina

	H ₂ O (μl)	Testigo: L-serina (μl)	[] de L-serina (mg/mL)
Blanco	200	---	0
Testigo 1	150	50	0.025
Testigo 2	100	100	0.05
Testigo 3	50	150	0.075
Testigo 4	---	200	0.1

De la curva se procedió a evaluar el grado de hidrólisis del CPM para lo cual se agregaron 1.5 mL del reactivo de OPA y 200 μl del hidrolizado proteínico. Esta solución se agitó durante 5 s y se leyó a 340 nm luego de 2 min. Las absorbancias fueron empleadas para hallar la concentración de grupos aminos libres que están presentes en el hidrolizado. Para lo anterior, se utilizó la ecuación de la recta que se obtuvo de la curva de calibración de L-serina. Finalmente, se aplicó la siguiente fórmula para hallar el grado de hidrólisis (%):

$$\%GH = \frac{h}{h_{total}} \times 100$$

Donde h es la concentración de grupos aminos libres medida en las muestras y h_{tot} es el número total de enlaces peptídicos presentes en el CPM de *M. pruriens* y se obtendrá hidrolizando muestra al 100% utilizando la metodología de Badadani M. *et al.*, (2006) la cual consiste en hidrolizar la muestra en una autoclave a 15Psi (121°C) por 60 min con HCl 6N (10mg de muestra en 10 ml de HCl).

Selección de los hidrolizados para el estudio

Una vez determinados los GH en los diferentes tiempos, se seleccionaron los de más altos GH entre todos los tratamientos, que son los que usualmente proporcionan bioactividad, empleando el sobrenadante, para determinar su contenido de proteína por el método de Lowry *et al.* (1951) y la capacidad antioxidante según la metodología descrita más adelante.

Composición proximal de la materia prima y productos

A la harina del frijol terciopelo y al concentrado proteínico obtenido se les determinó el contenido proximal según los métodos de la A.O.A.C. (1995).

Actividad antioxidante

Se empleó el método de Pukalskas *et al.*, (2002), para el cual se preparó el radical ABTS·+, el cual está formado por 10 mL de solución stock de ABTS 2 mM y 40 µL de solución de persulfato potásico (K₂S₂O₈) 70 mM. Este reactivo es necesario reposarlo en un cuarto oscuro a temperatura ambiente durante 16-17 h antes de su uso. Posteriormente, se diluyó el radical con el buffer de fosfatos PBS (pH 7.4) hasta una obtener una absorbancia de 0.8 ± 0.03, a una longitud de onda de 734 nm. La absorbancia medida será A_b. Se preparó la curva estándar del utilizando el 6-hidroxi-2, 5, 7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico (TROLOX) como antioxidante estandar, más 990 µL del radical ABTS·+ (Abs_{734nm} = 0.8 ± 0.03) diluido con 10 µL de las soluciones de trolox de concentración 0.5, 1, 1.5, 2.5, 3.5 mM. Se colocó la mezcla en una celda de cuarzo y se leyó la absorbancia a 734 nm para cada concentración de trolox exactamente después de 6 min (esta operación se realizó por triplicado). Las absorbancias medidas serán A_T. Posteriormente se calculó el porcentaje de inhibición (% I) de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Inhibición} = \left(\frac{A_b - A_T}{A_b} \right) \times 100$$

A_b = Absorbancia del blanco a tiempo cero

A_M = Absorbancia del trolox después de 6 min

Se graficó la concentración del trolox (mM) vs % inhibición y de esta manera se obtuvo la línea de tendencia y su ecuación con intersección= 0. Finalmente, se midió la actividad antioxidante del hidrolizado proteínico mezclando 990 mL de radical ABTS·+ (Abs_{734nm} = 0.8 ± 0.03), 10 mL del buffer PBS y (5, 10 ó 20 mg) del hidrolizado como se señaló anteriormente.

$$\% I_M = \left(\frac{A_b - A_M}{A_b} \right) \times 100$$

En donde:

% IM = % de inhibición de la muestra

A_b = Absorbancia del blanco a tiempo cero

A_M = Absorbancia de la muestra después de 6 min

Posteriormente se calculó el coeficiente antioxidante equivalente de trolox (TEAC)

$$TEAC = \frac{\%I_M - b}{m}$$

Donde:

%I_M es el % de inhibición de la muestra, b es el intercepto de la curva estándar de trolox y m es la pendiente de la curva estándar de trolox.

Análisis Estadístico

Los resultados de las curvas de progreso de los hidrolizados proteínicos de *M. pruriens* fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, para establecer diferencias estadísticas significativas (P < 0.05). En los casos donde existió diferencia significativa se realizó una comparación de medias por el método de la diferencia significativa mínima (DSM). La evaluación de las actividades biológicas se realizó por duplicado. Los datos fueron procesados estadísticamente para determinar las medidas de tendencia central y dispersión. Para conocer si existió diferencia entre estos resultados se realizó un análisis de varianza de una vía y una comparación de medias por el método de Duncan de acuerdo a los métodos señalados por Montgomery (2004). Para realizar el análisis estadístico de todos los resultados se empleó el paquete computacional Statgraphics plus versión 5.1.

Resultados y Discusión

Determinación del punto isoeléctrico por medio de la solubilidad de nitrógeno

La solubilidad de nitrógeno fue dependiente del pH (Figura 1) ya que al evaluar su solubilidad desde pH 4 a 5, como en la generalidad de las proteínas de las leguminosas, se encontró un mínimo de solubilidad al pH de 4.6. Este fue diferente al reportado por Adebowale (2008) y por Corzo *et al.* (2000) que fue de 4.0 para harina de *M. pruriens*. El PI es similar al hallado por Chel *et al.* (2002) para *Phaseolus lunatus* y *Canavalia ensiformis* quienes encontraron la menor solubilidad a pH 4.5 para ambas leguminosas. El perfil de solubilidad de una proteína ayuda a comprender mejor el alcance de la desnaturalización o la agregación irreversible y precipitaciones que podrían haber ocurrido durante el proceso de aislamiento, así también da una indicación de los tipos de alimentos o bebidas en el que podría ser la proteína incorporada (Adebowale, 2008).

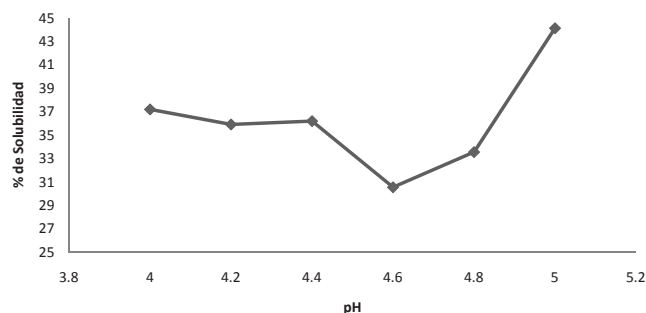


Figura 1. Efecto del pH en la Solubilidad de Nitrógeno de *M. pruriens*

Determinación de la composición proximal

La composición proximal de la harina integral y concentrado proteínico de la leguminosa *M. pruriens* (Cuadro 2), indicó una cantidad de proteína cruda de la harina de 29.14% y para el concentrado proteínico de 50.33% siendo diferentes estadísticamente ($P < 0.05$). La cantidad de proteína en la harina fue similar a la reportada (27.795) por Corzo *et al.* (2000), aunque en el concentrado de *M. pruriens* resultó significativamente menor (65.98%). Chel *et al.* (2002) hallaron contenidos de proteínas en harina y concentrado proteínico de *Canavalia ensiformis* de 26.86 y 73.75% respectivamente. También Torruco (2008) encontró para la especie *Phaseolus lunatus* harina y concentrado con un contenido de proteína de 26.0 y 71.8% respectivamente. Estas diferencias de contenidos de proteína hallados en *M. pruriens*, con respecto a los encontrados por otros investigadores, tal vez se deba a las condiciones de cultivo, madurez del grano, la composición original de las materia primas y a las condiciones del método empleado en la preparación de la extracción proteínica (Betancur *et al.*, 2009; Chel *et al.*, 2002). Otro aspecto importante que posiblemente influya en el contenido proteínico puede ser debida a la presencia de L-dihidroxifenilalanina que es nitrógeno no proteínico y se considera como un factor antinutricio y cuyo contenido puede oscilar entre 2.8 a 8.37% (Vadivel y Janardhanan, 2005; Pugalenthi, *et al.* 2005) en harina de granos, aunque el contenido de factores antinutricios de los aislados de proteínas de harina de *M. pruriens* se ve reducido significativamente durante el proceso de extracción de la proteína (Betancur *et al.*, 2008).

Las cenizas fueron 3.56 y 7.12% para harina y concentrado, el valor del concentrado difiere con lo reportado por Corzo *et al.* (2000) con 1.84%. Betancur *et al.* (2008) reportan para la misma leguminosa 2.8 y 4.2% respectivamente que aunque es distinto a lo obtenido tiene la misma tendencia a aumentar. Asimismo Chel *et al.* (2002) obtuvieron para harina y concentrado de *C. ensiformis* 2.79 y 4.16%. Se cita (Bressani, 2007) que los niveles de minerales en *Mucuna* varían considerablemente ya que tiene valores relativamente altos de potasio y hierro, esto es de especial interés debido a su deficiencia en

las dietas de muchos países en desarrollo, en particular entre los habitantes de zonas rurales.

Cuadro 2. Composición proximal de la harina integral y concentrado proteínico de *M. pruriens* (%B.S).

Componente (%)	Harina	Concentrado proteínico
Humedad	(9.59)	(3.46)
Proteína Cruda	29.14	50.33
Grasa cruda	7.06	13.11
Fibra cruda	3.26	3.19
Cenizas	3.56	7.12
ELN ¹	56.98	26.25

^{a-b} Letras diferentes en la misma fila indican diferencia estadística ($P < 0.05$),

¹ (ELN) extracto libre de nitrógeno, calculado por diferencia a los demás componentes.

Los valores de grasa cruda obtenidos para harina y concentrado proteínico de *M. pruriens* fueron de 7.06 y 13.11% respectivamente, con tendencia similar a lo reportado por Corzo *et al.* (2000) con 2.83 y 19.26% en *M. pruriens* y diferente a Betancur *et al.* (2002) que obtuvieron un 2.4 y 4.7% de grasa cruda en harina y concentrado proteínico *M. pruriens*. En la *Canavalia ensiformis* se halló un contenido de 1.67 y 5.12% y fue reportado por Chel *et al.* (2002). Este contenido graso mayoritario en el concentrado puede deberse a la asociación de los lípidos con las proteínas que se produce durante su preparación, la cual se ve favorecida por la desnaturalización de las proteínas durante el proceso, como resultado de la exposición de los aminoácidos hidrofóbicos, ocultos en la proteína nativa y la posterior asociación entre las cadenas alifáticas de los lípidos y los aminoácidos hidrofóbicos (Sanchez *et al.*, 1999).

La extracción proteínica de *M. pruriens* con los contenidos de este componente obtenidos puede ser importante para la obtención de hidrolizados ya que éste método, puede mejorar o modificar algunas propiedades funcionales del material inicial, e incluso pueden producirse algunos componentes bioactivos.

Hidrólisis enzimática del CPM.

En la figura 2 se observan las curvas de hidrólisis obtenidas con la enzima Alcalasa (A) y el sistema secuencial Alcalasa-Flavourzyme (A-F). En los tratamientos con A se pudo observar que el efecto de la hidrólisis se incrementó con el aumento en la concentración de la enzima desde 0.03 a 0.3AU/g.

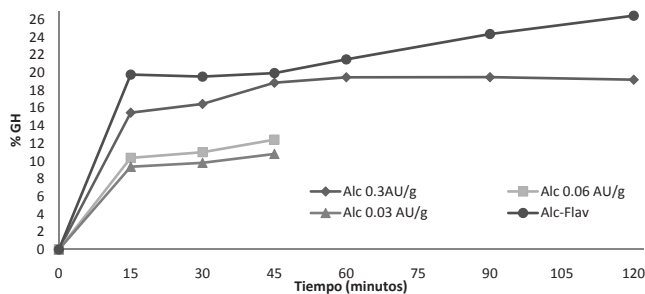


Figura 2. Curvas de hidrólisis del concentrado proteínico de *Mucuna pruriens* con la enzima Alcalasa a diferentes concentraciones y del sistema secuencial Alcalasa-Flavourzyme a 50°C.

Se encontró que los diferentes tratamientos con Alcalasa a los tiempos de reacción 15, 30 y 45 tuvieron diferencia significativa ($p < 0.05$) en relación con la concentración de enzima. Esto significa, que el aumento de la concentración de la enzima, con la concentración de sustrato empleada tiene una correlación positiva, obteniendo los GH más altos en la solución enzimática más concentrada (0.3AU/g).

También se puede observar en la figura 1 que los GH obtenidos en los diferentes tratamientos se incrementan conforme aumenta el tiempo de hidrólisis, este comportamiento es similar a lo reportado por otros autores (Lqari *et al.*, 2005; Nilsang *et al.*, 2005). El sistema Alc 0.03AU/g mostró diferencia significativa entre el primer tiempo (15 min, 9.36% GH) y el último (45min, 10.82% GH) ($p > 0.05$), siendo el de 30 min igual a cada uno de los tiempos anteriores. El tratamiento con 0.06AU/g de Alc no tuvo diferencia estadística entre los tiempos de reacción 15,30, 45 min ($p < 0.05$). En el otro tratamiento (0.3AU/g de A) se identificaron dos grupos homogéneos, los cuales fueron estadísticamente diferentes entre sí, (15 a 60 min y 90 a 120 min). En todos los tratamientos con A hubo un rápido incremento en el punto inicial y una posterior fase estacionaria, esto puede deberse a la reducción del número de enlaces peptídicos susceptibles a hidrólisis, a la inhibición de la enzima por los productos y/o sustratos o la inactivación de la enzima (Chabanon *et al.*, 2007; Clemente *et al.*, 1999 y Jung *et al.*, 2004). Con propósito comparativo se tiene que Martínez (2003) obtuvo hidrolizados de concentrado proteínico de la leguminosa *Phaseolus lunatus* empleando Alcalasa 0.3 AU/g, reportando 16.9% GH a los 60 min de reacción, lo cual se logró en el presente caso a los 30 min con la misma concentración de enzima.

Se pudo observar que los GH más elevados fueron del sistema secuencial, ya que con A 0.3 AU/g se halló el valor más alto, de 19.50GH, a 90 min, mientras que al mismo tiempo con A-F se obtuvo un valor de 24.38%. En estos resultados influye el hecho de que Flavourzyme tiene actividad de endoproteasa y exopep-

tidasa, por lo que los enlaces internos que no hubiesen sido hidrolizados por Alcalase, serían atacados por Flavourzyme dando como resultado los mayores GH obtenidos. Asimismo, con el sistema secuencial A-F se identificaron cuatro grupos homogéneos ($p < 0.05$), los cuales fueron estadísticamente diferentes entre sí (15 min, 30 a 60 min, 90 min y 120). El sistema secuencial mostró un comportamiento similar al reportado por otros autores (Clemente *et al.*, 1999; Pedroche *et al.*, 2002, Salazar, 2008), con un incremento rápido en la fase inicial de la hidrólisis seguido por una fase estacionaria y un posterior incremento a partir de los 60 min, concordando con lo reportado por los autores mencionados. Pedroche *et al.*, (2002) obtuvieron hidrolizados proteínicos con un GH de 63% utilizando un sistema secuencial A-F sobre aislados proteínicos de garbanzo (*Cicer arietinum*) a 150 min, hecho que pone de manifiesto que si se desean obtener hidrolizados con elevados GH, deben emplearse sistemas secuenciales. El valor de GH reportado para el sistema secuencial fue de 26.45 a 120 min, de acuerdo con lo reportado por Salazar (2008), quien utilizó las mismas condiciones para hidrolizar concentrados proteínicos de chia (*Salvia hispanica*), siendo explicable esto por la composición aminoacídica de los mismos.

Evaluación de actividad antioxidante

El coeficiente antioxidante equivalente de trolox obtenido para los hidrolizados con Alcalase (A) al 0.3 AU/g y el sistema secuencial que proporcionaron los mayores grados de hidrólisis se observan en el Cuadro 3. Se halló que fueron estadísticamente iguales ($p > 0.05$) independientemente del grado de hidrólisis, siendo cercanos a 21 TEAC.

Cuadro 3. Actividad equivalente de trolox (TEAC) de los diferentes hidrolizados, harina y concentrado de *Mucuna pruriens*.

Hidrolizado	TEAC (mM/mg proteína)
A45	20.9 ^a
A60	21.0 ^a
A90	20.9 ^a
A-F90	20.1 ^a
A-F120	20.8 ^a
CPM	18.4 ^b
Harina	16.0 ^c

Estos valores son mejores hasta del orden de 2 a 3 veces mejor que los reportados por Salazar (2008) para hidrolizados de chía (*Salvia hispanica*) obtenidos con las proteasas Alcalasa y Flavorzima a 90 y 120 min con 7.31 y 4.66 mM/mg proteína respectivamente, y del orden de 10 mil veces mejores que para hidrolizados de aislado proteínico de soya preparados con Alcalasa durante 6 h (Peña y Xiong, 2002) con valores de 2.3 y 2.2 μM /mg proteína. A diferencia de otros productos resultantes de la hidrólisis que dependen del GH, en este caso no se observó diferencia entre los valores de capacidad antioxidante probablemente debido a la notable capacidad antioxidante inherente a esta materia prima, ya que desde su forma de harina presentó una importante capacidad antioxidante del orden de 16 mM/mg de proteína TEAC, la cual se incrementó significativamente ($p < 0.05$) al concentrar la proteína y aún más en los hidrolizados (Cuadro 3). Esto puede explicarse por el contenido de polifenoles remanentes, ya que se reporta un contenido en harina de 5.8% de la materia seca (Sidduraju y Becker, 2003; Vaidivel y Janardhanan, 2005).

Conclusiones

Se observó un incremento en el grado de hidrólisis (GH) en función del contenido de la enzima alcalasa el cual se incrementó cuando se empleó de manera secuencial con la endo - exoproteasa flavourzyme. Aun en períodos cortos de tiempo (15 min) se obtuvieron hidrolizados extensivos, excepto con la más baja concentración de enzima. Esto es de tomarse en consideración para preparar hidrolizados en los que se busque mejorar las propiedades tecnológicas. A diferencia de hidrolizados provenientes de otras fuentes vegetales y preparados con las mismas o diferentes enzimas y condiciones, la capacidad antioxidante fue independiente del GH, siendo éste de alrededor de 20 mM/mg proteína equivalentes de trolox, los cuales fueron superiores a los reportados para esos. Esto probablemente se debió al efecto sinérgico por el probable contenido residual de polifenoles de la materia prima.

Referencias

Adebowale, Y.A. (2008). A study of the control variables during the preparation of protein isolate from *Mucuna* bean (*Mucuna pruriens*). *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*. 7(9):3223-3238

A.O.A.C. (1995). Official methods of analysis. 15^o ed., Washington, DC, Association of Analytical Chemists. pp. 1110-1117.

Aregheore, E.; Becker, K.; Makkar, H. (2003). Detoxification of a toxic variety of *Jatropha curcas* using heat and chemical treatments, and preliminary nutritional evaluation with rats. *Journal Natural Science*. 21:50-56.

Badadani, M.; Sureshbabu, S.; Shetty, K.T.

(2007). Optimum conditions of autoclaving for hydrolysis of proteins and urinary peptides of prolyl and hydroxyprolyl residues and HPLC analysis. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in The Biomedical and Life sciences*. 847(2):267-274.

Bressani, R. (2007). Factors Influencing Nutritive Value in Food Grain Legumes: *Mucuna* Compared to Other Grain Legumes. Centro de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Instituto de Investigaciones, Universidad del Valle de Guatemala, Guatemala.

Betancur-Ancona, D.; Gallegos-Tintoré S.; Chel-Guerrero, L. (2004). Wet fractionation of *Phaseolus lunatus* seeds: partial characterization of starch and protein. *Journal of Science of Food and Agriculture*. 84:1193-1201.

Betancur, D., Gallegos, S., Delgado, A., Pérez, V., Castellanos, A., y Chel, L. (2008). Some physicochemical and antinutritional properties of raw flours and protein isolates from *Mucuna pruriens* (velvet bean) and *Canavalia ensiformis* (jack bean). *International Journal of Food Science and Technology*. 43:816-823.

Betancur, D., Martínez, R., Corona, A., Castellanos, A., Jaramillo, E., y Chel, L. (2009). Functional properties of hydrolysates from *Phaseolus lunatus* seeds. *International Journal of Food Science and Technology*. 44:128-137.

Chabanon, G.; Chevalot, I.; Framboisier, X.; Chenu, S.; Marc, I. (2007) Hydrolysis of rapeseed protein isolates: Kinetics, characterization and functional properties of hydrolysates. *Process Biochemistry*. 42:1419-1428.

Chel-Guerrero, L.; Pérez-Flores, V.; Betancur-Ancona, D; Dávila-Ortiz, G. (2002). Functional Properties of Flours and Protein Isolates from *Phaseolus lunatus* and *Canavalia ensiformis* Seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50(3):584-591.

Chen, H.; Muramoto, K.; Yamauchi, F.; Fujimoto, K.; Nokihara, K. (1998). Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46:49-53.

Clemente, A.; Vioque, J.; Millán, F. (1999). Hidrolizados proteicos de origen vegetal. *Revisión*. 2(6):289-296.

Clemente, A.; Vioque, J.; Sanchez, R.; Pedroche, J.; Millan, F. (1999). Production of extensive chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein hydrolysates with reduced antigenic activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47(9):3776-3781.

Corzo, L.; Chel, L.; Betancur, D. (2000). Extracción de las fracciones de almidón y proteína del grano de la leguminosa *Mucuna pruriens*. *Tecnología Ciencia y Educación*. 15(1):37-41.

Dean, R.; Fu, S.; Stocker, R.; Davies, M. (1997). Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *The Biochemical Journal*. 324:1-18.

- Hong, G.; Wei, G.; Liu, H.; Hui, Y. (2005). Mung-bean protein hydrolysates obtained with alcalase exhibit angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity. *Journal of Food Science and Technology International*. 11(4):281-287.
- Janitha, P., Ross, A., Amarowics, R., Ambrose, S., Pegg, R., Shand, P. (2002). Peptides with angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity from defibrinated, hydrolyzed bovine plasma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50(24):6981-6988.
- Je, J. Y.; Park, P. J.; Kwon, J. Y.; Kim, A. K. (2004). A Novel Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Peptide from Alaska Pollack (*Theragra chalcogramma*) Frame Protein Hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52:7842-7845.
- Jeong, J. H.; Park, H. J.; Lam, Y., and De Lumen, O. B. (2003). Characterization of Lunasin Isolated from Soybean. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51(27):7901-7906.
- Jung, S.; Roussel-Philippe, C.; Briggs, J.; Murphy, P.; Johnson, L. (2004) Limited Hydrolysis of Soy Proteins with Endo- and Exoproteases. *Journal of American Oil Chemists' Society*. 81:953-960.
- Kamath, V.; Niketh, S.; Chandrashekar, A.; Rajini, S. P. (2007). Chymotryptic Hydrolysates of α -Kafrin, the Storage Protein of Sorghum (*Sorghum bicolor*) Exhibited Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Activity. *Food Chemistry*. 100:306-311.
- Korhonen, H.; Pihlanto, A. (2003). Food-derived Bioactive Peptides-Opportunities for Designing Future Foods. *Current Pharmaceutical Desing*. 9(16):1297-1308.
- Loyra, E. (2007). Digestibilidad de nutrimentos y valor energético de *Mucuna pruriens* en ovinos pelibuey. Tesis de Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia. FMVZ-UADY, Mérida, Yucatán, México. pp. 3.
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. (1951). Protein measurement with Folin-Phenol reagents. *Journal of Biological Chemistry*. 193:265-275.
- Lqari, H.; Pedroche, J.; Giron-Calle, J.; Vioque, J.; Millan, F. (2005) Production of *Lupinus angustifolius* protein hydrolysates with improved functional properties. *Grasas y Aceites*. 56(2): 135-140.
- Manninem, A. (2004). Protein hydrolysates in sports and exercise: A brief review. *Journal of Sports Science and Medicine*. 3: 60-63.
- Martínez, R. (2003). Hidrólisis enzimática de concentrados proteínicos de *Phaseolus lunatus* utilizando proteasas comerciales. Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. FIQ-UADY. Pp. 33-34.
- Megías, C.; Yust, M.; Pedroche, J.; Lquari, H.; Girón, J.; Alaiz, M.; Millán, F.; Vioque, J. (2004). Purification of an ACE inhibitory peptide alter hydrolysis of sunflower (*Helianthus annuus* L.) protein isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52(7):1928-1932.
- Mellander, O. (1950). The physiological importance of the casein phosphopeptide calcium salts. II Peroral calcium dosage of infants. *Acta Societatis Medicorum Uppsaliensis* 55:247-255.
- Miguel, M.; Aleixandre, A.M.; Ramos, M.; López-Fandiño, R. (2006). Effect of Simulated Gastrointestinal Digestion on the Antihypertensive Properties of ACE-Inhibitory Peptides Derived from Ovalbumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54:726-731.
- Montgomery, D. (2004). Diseño y análisis de experimentos. 2° ed. México. Limusa-Wiley. pp 83-104.
- Nakagomi, K.; Yamada, R.; Ebisu, H.; Sadakane, Y.; Akizawa, T.; Tanimura, T. (2000). Isolation of Casein-2, a Novel Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptide Derived from a Tryptic Hydrolysate of Human Plasma. *Federation of European Biochemical Societies Letters*. 467:235-238.
- Neves, M. R. A.; De Mira, M. N. V.; Marquez, L. U. M. (2004). Caracterição de Hidrolisados Enzimáticos de Pescado. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 24(1):101-108.
- Nielsen, M.P.; Petersen, D.; Dambmann, C. (2001). Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *Journal of Food Science*. 66(5):642-646.
- Nilsang, S.; Lertsiri, S.; Suphantharika, M.; Asavanig, A. (2005) Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases. *Journal of Food Engineering*. 70:571-578.
- Pedroche, J.; Yust, M.; Girón J.; Alaiz M.; Millan, F.; Vioque, J. (2002). Utilization of chickpea protein isolates for production of peptides with angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity. *Journal Science Food Agricultural*. 82:960-965.
- Peña, E.; Xiong, Y. (2002). Antioxidant activity of soy protein hydrolysates in a liposomal system. *Food Chemistry and Toxicology*. 67 (8):2952-2956.
- Pugalenthi, M.; Vadivel, V.; Siddhuraju, P. (2005). Alternatives food/feed perspectives of an underutilized legume *Mucuna pruriens*. *Plant Foods for Human Nutrition*. 60:201-218.
- Pukalskas, A.; Van Beek, T.; Venskutonis, R.; Linsen, J.; Van Veldhuizen, A.; De Groot, A. (2002). Identification of radical scavengers in sweet grass (*Hierochloa odorata*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50:2914-2919.
- Saiga, A.; Okumura, T.; Makihara, T.; Katsuda, A-I.; Morimatsu, F.; Nishimura, T. (2006). Action Mechanism of an Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptide Derived from Chicken Breast Muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54: 942-945.
- Sánchez, R., Vioque, J., Clemente, A., Pedroche, J., Bautista, J., y Millan, F. (1999). Interaction of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Legumin with Oxidized Linoleic Acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.

47:813-818.

Salazar, I.;(2008). Evaluación de hidrolizados proteínicos de chíá (*Salvia hispanica* L.) para su incorporación en alimentos funcionales. Tesis de Maestría en Ciencias Alimentarias. FIQ-UADY, Mérida, Yucatán. México. pp 34 y 38.

Sidduraju, P.; Becker, K. (2003) Comparative nutritional evaluation of differentially processed mucuna seeds (*Mucuna pruriens*) var. *utilis* on growth performance, feed utilization and body composition in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) Aquaculture Research. 34:487-500.

Taylor, G. W.; Sutherland, H. D.; Olson, H. D. J.; Ross, S. A. R.; Fields, G. P. (2004). Insecticidal Components from Field Pea Extracts: Sequences of Some Variants of Pea Albumin 1b. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 52:7499-7506.

Torruco, J., Dávila, G., Chel, L., y Betancur, D. (2008). Actividad antihipertensiva de fracciones peptídicas obtenidas por ultrafiltración a partir de frijol lima (*Phaseolus lunatus*). Ciencia y Tecnología de Alimentos. 18:11-15.

Vadivel, V.; Janardhanan, K.; (2005) Nutritional and Antinutritional Characteristics of Seven South Indian Wild Legumes. Plants Food for Human Nutrition.60:69-75.

Van der Ven, C.; Gruppen, H.; De Bont, D.; Vorage, A. (2001). Emulsion properties of casein and whey protein hydrolysates and the relation with other hydrolysate Characteristics. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 49:5005-5012.

Vázquez, J.; Rosado, G.; Betancur, D. (2006). Métodos químicos para cuantificar la actividad antioxidante en los alimentos. Revista de la Facultad de Ingeniería Química, 42:40-47.

Vioque, J., Pedroche, J., Yust, M., Lquari, H., Megias, C., Girón, J., Alaiz, M., Millán, F. (2006). Péptidos bioactivos en proteínas vegetales de reserva. Brazilian Journal of Food Technology. pp 99-102.

Wanasundara, P. D. P. K. J.; Amarowicz, R.; Pegg, B. R.; Shand, J. P. (2002). Preparation and Characterization of Hydrolyzed Proteins Defibrinated Bovine Plasma. Journal of Food Science. 67(2):623-630.

Yang, Y.; Marczak, E.; Yokoo, M., Usui, H.; Yoshikawa, M. (2003). Isolation and antihypertensive effect of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from Spinach Rubisco. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 51(17):4897-4902.

Yoshii, H.; Tachi, N.; Ohba, R.; Sakamura, O.; Takeyama, H.; Itani, T. (2001). Atihypertensive Effect of ACE Inhibitory Oligopeptides from Chicken Egg Yolks. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology. 128: 27-33.

Yust M.; Pedroche, J.; Girón, J. Alainz, M.; Millan, F.; Vioque, J. (2003). Production of ace inhibitory peptides by digestion of chickpea legumin with alcalase.

Food Chemistry. 81:363-369.

ESTABILIDAD FISICOQUÍMICA Y TIEMPO DE VIDA DE ANAQUEL DE PRODUCTOS ENVASADOS DE PULPO *Octopus maya*

A. García-Lira, J. Ruiz-Ruiz, L. G. Cantón-Castillo, D. Betancur-Ancona y L. Chel-Guerrero.

RESUMEN

En el presente trabajo se desarrollaron productos procesados de pulpo para incrementar tanto su vida de anaquel como su valor de comercialización. Se presentan los resultados de las pruebas necesarias para asegurar la adaptación de los productos a la normatividad mexicana en materia de inocuidad alimentaria, envasado, tiempo de vida de anaquel y evaluación sensorial aplicada a los consumidores finales potenciales; para establecer la viabilidad comercial de los productos obtenidos. Los análisis fisicoquímicos indicaron que las características del producto se mantuvieron estables después de su envasado y durante el tiempo que duro el estudio de vida de anaquel; la ausencia de microorganismos en ambas etapas evidencian que los procesos térmicos empleados garantizan la inocuidad del producto y su conservación. Los resultados obtenidos demuestran que el desarrollo de este tipo de productos es factible desde el punto de vista de inocuidad alimentaria y tiempo de vida de anaquel, por lo que podrían plantearse como una alternativa de industrialización y comercialización de este recurso pesquero.

Palabras clave: pulpo, desarrollo de productos, inocuidad, vida de anaquel.

Introducción

En el ámbito nacional el pulpo ocupa el doceavo lugar en cuanto a captura, en tanto que en el litoral del Golfo de México y Caribe es la cuarta pesquería más importante. Actualmente el aumento en el volumen de producción y la demanda internacional han llevado a esta pesquería a ocupar el tercer lugar nacional por su valor comercial, destacando Yucatán, Campeche y Quintana Roó como las principales entidades productoras, ya que en conjunto aportan el 95% de la producción nacional (INEGI, 2009). En la zona geográfica constituida por estos tres estados la principal especie de pulpo es la *Octopus maya*, también conocido como pulpo rojo (Solís, 1997).

La producción del pulpo *Octopus maya* se ha mantenido estable gracias a los programas que controlan la pesca ilegal en las épocas de reproducción, lo que ha permitido mantener una producción que fluctúa actualmente entre 800 y 1500 Ton/año, exportándose entre 40% y 50% como producto congelado (Santos-Valencia, 2000). En estadísticas y estudios realizados a nivel nacional durante los noventa se estableció la existencia de una demanda internacional y nacional para esta pesquería, una prueba de ello es la existencia de productos industrializados y comercializados como platillos y conservas enlatadas en la costa del pacífico (García-Lira y col., 2008).

En el caso específico del pulpo producido en la península de Yucatán, este es principalmente exportado en forma congelada a los mercados Europeos, en donde es industrializado como conservas enlatadas, dándole así un valor agregado al producto, el cual puede ser comercializado a un precio superior al monto que fue pagado por la materia prima original (García-Lira y col., 2008). Lo anterior hace evidente la necesidad de inversiones de tipo tecnológico para el desarrollo de productos que favorezcan su industrialización y comercialización. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la estabilidad fisicoquímica y el tiempo de vida de anaquel de productos enlatados elaborados a base de pulpo *Octopus maya*.

Materiales y métodos

Materia prima

35 kg de pulpo (*Octopus maya*) fueron proporcionados por una empresa empacadora del puerto de Progreso, Yucatán. La materia prima se mantuvo en congelación a una temperatura de -18 °C. Antes de su utilización el producto se sometió a descongelación controlada de acuerdo al código de prácticas CAC/RCP 52-2003, Rev. 2-2005.

Prueba de reducción de peso.

Se efectuó una prueba de reducción de materia prima para determinar la pérdida de líquidos por efecto del tratamiento térmico; para ello se efectuó una cocción convencional de 5 kg de pulpo eviscerado fresco en 15 litros de agua por un tiempo de 60 min a 100 °C. Al término del tiempo de cocción

se drenó el líquido y se determinó la pérdida de peso del producto cocido (CAC/GL 31-1999).

Preparación del pulpo precocido.

Se llevó a cabo siguiendo las consideraciones establecidas en el código de prácticas CAC/RCP 52-2003, Rev. 2-2005. Se emplearon 30 kg de pulpo, se eliminaron las vísceras, los ojos, el pico, el saco de tinta y el tejido que recubre la parte interna de los tentáculos; la limpieza se llevó a cabo con agua. El pulpo limpio y eviscerado se coció en un volumen de 30 litros de agua durante 60 min a 100 °C, concluida la cocción se drenó el líquido y se troceó el pulpo, se empacó al vacío en paquetes de 2kg y se almacenaron en enfriamiento a una temperatura de 7 °C hasta su posterior uso.

Formulación de platillos

Basados en un estudio de mercado realizado por García-Lira y col. (2008). Se formularon dos platillos de pulpo: “en escabeche” y “al ajillo” (Cuadro 1). El primer platillo es ampliamente consumido a nivel nacional y el segundo es comercializado a nivel internacional. La preparación consistió en mezclar los ingredientes y efectuar una cocción durante 30 min a 80 °C.

Cuadro 1. Formulación de los platillos de pulpo

Pulpo “en escabeche”	Pulpo “al ajillo”
20 g de pimienta	43 g de pimienta
30 g de sal	90 g de sal
500 g de condimento para escabeche	400 g de chiles guajillos
4.8 kg de zanahoria	1.5 kg de cilantro
8 kg de cebolla	2.2 kg de ajo
400 mL de aceite de oliva	7 kg de cebolla
3.2 L de vinagre blanco	200 mL de aceite de oliva
6.25 L de agua	20 kg de pulpo eviscerado precocido
20 kg de pulpo eviscerado precocido	

Procedimiento de enlatado

El procedimiento de enlatado se describe en la figura 1. Las condiciones de esterilización fueron las siguientes: temperatura 121 °C y 15 lb de presión, aplicadas durante 15 min. Al terminar la esterilización las latas se sometieron a un choque térmico con agua a una tem-

peratura de 4 °C. Las latas se almacenaron a temperatura ambiente hasta la realización de los análisis fisicoquímicos y el estudio de tiempo de vida de anaquel.

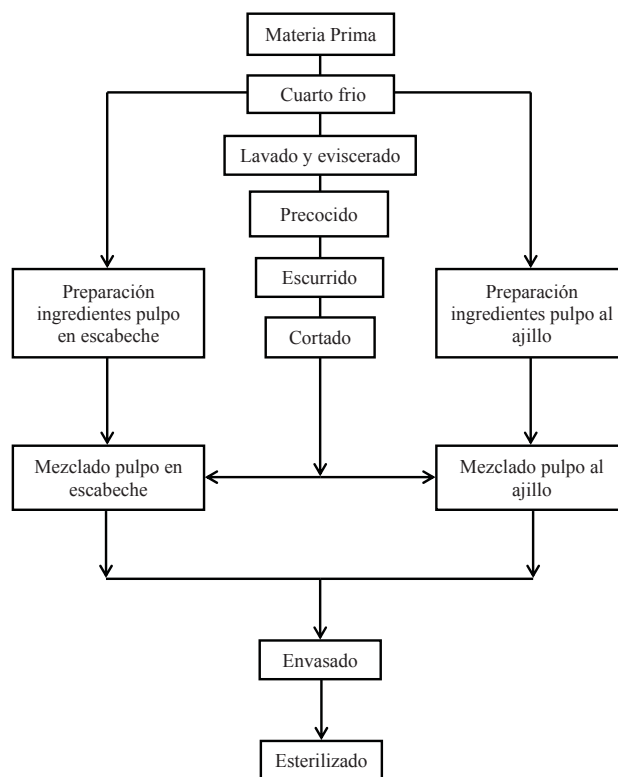


Figura 1. Proceso de Elaboración de los productos

Análisis fisicoquímicos

Determinación de pH. Se procedió de acuerdo a lo establecido en la NMX-F-317-S-1978; en el caso de los productos enlatados el líquido se drenó del envase aplicando la Norma NMX-F-315-1978. La porción sólida se molió en una licuadora con 20 ml de agua destilada por cada 100 g de producto, se determinó el pH de ambas porciones por separado y finalmente se mezclaron ambas porciones (100 g sólido/20 mL líquido) y se determinó el pH. Las determinaciones se realizaron con potenciómetro a una temperatura de 20 °C.

Determinación de cloruros. Se realizó según la NMX-F-360-S-1981. A una muestra de alimento en base seca se le determinaron cenizas, aplicando la NMX-F-066-S-1978, se disolvieron las cenizas en ácido nítrico, se filtraron, lavaron y colectaron en un matraz Erlenmeyer; se agregaron 5 mL de una solución de nitrato de plata, 5 mL de sulfato férrico amónico y 3 mL de ácido nítrico. Se titula el exceso de plata con solución de tiocianato de potasio 0.1 N. Se calculó el porcentaje de cloruros como cloruro de sodio, mediante la siguiente expresión: %NaCl = ((A - B) N x 0.0585/M) x 100. Donde: A = mL de solución de nitrato de plata 0.1 N. B = mL de solución de tiocianato de potasio 0.1 N. N = Normalidad del tiocianato de potasio.

M = Peso de la muestra en gramos.
0.0585 = Miliequivalentes del cloruro de sodio.

Análisis microbiológicos

Para la preparación y dilución de las muestras se siguió la norma NOM-110-SSA1-1994.

Determinación de bacterias aerobias, se efectuó siguiendo la metodología propuesta por la norma NOM-092-SSA1-1994.

Determinación de bacterias coliformes, se realizó según las normas NOM-112-SSA1-1994 y NOM-113-SSA1-1994.

Determinación de mohos y levaduras, se llevó a cabo siguiendo la metodología establecida por la NOM-111-SSA1-1994.

Tiempo de vida de anaquel

Para las pruebas de tiempo de vida de anaquel se siguió el procedimiento establecido en la norma NOM-130-SSA1-1995. El objetivo de este estudio fue determinar cambios en los parámetros fisicoquímicos y la presencia de microorganismos viables latentes, que pudieran producir alteraciones en el alimento. Las latas fueron incubadas a 35 °C durante 20 días para el tiempo de vida de anaquel acelerado y a temperatura ambiente durante 2 meses para el almacenamiento convencional. El análisis microbiológico se realizó de acuerdo con lo establecido en la norma NMX-F-358-S-1981.

Evaluación sensorial

Se utilizó una escala hedónica de 5 puntos, con 35 jueces no entrenados, mediante pruebas afectivas (prueba de nivel de agrado, preferencia y aceptación). La calificación de 1 se usó cuando las características del platillo se consideraron muy buenas y la de 5 cuando el producto desagradó al juez, siguiendo la metodología establecida en las directrices del Codex CAG/GL-31-1999.

Resultados y discusión

Análisis fisicoquímicos

Los resultados de los parámetros fisicoquímicos evaluados en el pulpo precocido y los platillos preparados a base de pulpo se presentan en el cuadro 2. El pH del pulpo fresco fue de 6.42, valor que se considera adecuado tratándose de una especie marina, ya que valores de pH superiores a 7.7 serían indicativos de un proceso de descomposición (Quitral-Robles y col., 2003). El pulpo precocido presentó un valor de pH de 6.45, valor similar al que presenta en estado fresco, indicativo de que el tratamiento térmico inicial no afectó las características del producto. En el caso de los platillos, ambos presentaron valores de pH \leq 4.6, los cuales se encuentran ubicados

dentro de las especificaciones establecidas por la norma NOM-130-SSA1-1995 para alimentos marinos sometidos a tratamiento térmico. La modificación del pH en los platillos preparados con pulpo se debió a los ingredientes empleados en su formulación.

Cuadro 2. pH y cloruros del pulpo precocido y los platillos preparados a base de pulpo.

Muestra	pH	Cloruros (% NaCl)
Pulpo precocido	6.45	3.90
Pulpo al ajillo	4.56	4.64
Pulpo en escabeche	4.50	4.54

El % de cloruros fue un 15% mayor en los platillos en comparación con el pulpo precocido (Cuadro 2), esto se debió a que la formulación de ambos platillos incluye sal como ingrediente. De acuerdo a su formulación, el pulpo al ajillo tiene un contenido de sal de 0.41 g/100 g de producto y el pulpo en escabeche un contenido de 0.47 g / 100 g de producto, que corresponden al 17% y 20% de la ingesta diaria de sodio recomendada; valores que se consideran adecuados para productos enlatados, en este sentido la norma NOM-130-SSA1-1995 establece que el uso de sal así como la cantidad agregada depende de las buenas prácticas de fabricación, es decir el cloruro de sodio se agrega en cantidades que permiten mantener en los productos las especificaciones requeridas para su uso.

Análisis microbiológico de pulpo precocido y platillos recién preparados

Los parámetros microbiológicos evaluados en la materia prima y los platillos preparados a base de pulpo se presentan en el cuadro 3. En cuanto a la presencia de bacterias del tipo mesófilas aerobias debe considerarse que la técnica empleada, basada en la NOM-092-SSA1-1994, establece que el número de colonias contadas constituyen una estimación de la cifra de microorganismos presente en la muestra, misma que refleja si el manejo sanitario del producto ha sido el adecuado. En este sentido el pulpo fresco presentó un contenido de bacterias mesófilas aerobias 80% mayor al que presentaron el pulpo precocido y los platillos elaborados con pulpo. De acuerdo con Hernández-Herrero y col. (1999), los tratamientos térmicos superiores a los 80 °C sólo inhiben parcialmente la carga microbiana, por lo que sería factible que se desarrolle actividad bacteriana posterior, que en el caso de productos marinos es más acentuada en las proteínas. Lo anterior explicaría la disminución de la carga microbiana en pulpo precocido y en los platillos.

Cuadro 3. Calidad microbiológica del pulpo precocido y los platillos elaborados con pulpo.

Muestra	Mesófilos aerobios (UFC/g)	Coliformes totales (UFC/g)	Mohos y levaduras (UFC/g)
Pulpo fresco	6000		
Pulpo precocido	1180		
Pulpo al ajillo	1200	Negativo	Negativo
Pulpo en escabeche	1315		

En el caso de coliformes totales y mohos y levaduras la presencia de UFC fue negativa en el pulpo fresco, precocido y platillos, lo cual concuerda con lo establecido en la norma NOM-027-SSA1-1993.

Tiempo de vida de anaquel de los productos enlatados

Inicialmente se evaluó el pH y el vacío de los productos enlatados (Cuadro 4). El pH de ambos platillos se encuentra ubicado dentro de las especificaciones establecidas por la NOM-130-SSA1-1995, para este tipo de productos. Al comparar los valores de pH obtenidos del estudio de vida de anaquel con los reportados en los platillos recién preparados se observa un incremento de pH en ambos productos, en el pulpo al ajillo el pH se incrementó en un 21% y en el pulpo en escabeche un 2%. Los productos marinos tratados por altas temperaturas presentan aumento de pH, lo que se relaciona con las aminas liberadas durante la aplicación de calor, estas aminas están presentes naturalmente en especies marinas y otorgan un carácter alcalino a la carne (Quitral-Robles y col., 2003). Lo anterior podría relacionarse con el aumento de pH observado en ambos platillos, en el caso del pulpo en escabeche el aumento de pH fue menor debido a que en su formulación se incluye vinagre como ingrediente, lo cual pudo neutralizar parcialmente el efecto alcalino de las aminas liberadas durante el tratamiento térmico. En cuanto al vacío de las latas, la norma NMX-F-485-SCFI-2000 establece un vacío mínimo de 100 mm de Hg, los productos presentaron un valor mayor lo que indica que el proceso de envasado fue efectivo (Cuadro 4). En cuanto a los resultados de los tiempos de vida de anaquel acelerado (20 días) y convencional (2 meses), los valores de pH se mantuvieron estables, lo cual indica el productos no experimentaron ningún tipo de deterioro, lo cual es común que se correlacione con cambios bruscos de pH (Hernández-Herrero y col., 1999). En cuanto al vacío este también se mantuvo por encima de los parámetros establecidos por la norma NMX-F-485-SCFI-2000, que establece un mínimo de 100 mm de Hg, lo cual indica que se mantiene la integridad del envase.

Cuadro 4. pH y vacío de los productos enlatados.

Muestra	Recién enlatado		Tiempo de vida de anaquel acelerado (20 días)		Tiempo de vida de anaquel (2 meses)	
	pH	Vacío (mm de Hg)	pH	Vacío (mm de Hg)	pH	Vacío (mm de Hg)
Pulpo al ajillo	5.8	150	5.8	150	5.8	150
Pulpo en escabeche	4.6	150	4.6	150	4.6	150

Los productos enlatados se sometieron a un proceso de incubación para determinar la calidad microbiológica de los alimentos de acuerdo con los parámetros establecidos por la NOM-130-SSA1-1995. En el caso de los platillos de pulpo enlatados, la presencia de microorganismos aerobios y anaerobios, tanto mesófilos como termófilos fue negativa (Cuadro 5). De acuerdo con la norma NOM-130-SSA1-1995 la ausencia de microorganismos sería indicativa de que el proceso de esterilización comercial fue adecuado. Ambos productos recibieron tratamientos térmicos durante la obtención del pulpo precocido (100 °C por 60 min), la preparación del platillo (80 °C por 30 min) y el proceso de enlatado (121 °C por 15 min); en la primera etapa se logró disminuir la carga biológica de la materia prima, en la segunda se mantuvo estable dicha carga y finalmente en la etapa de enlatado se logró la esterilización comercial del producto.

Cuadro 5. Calidad microbiológica del estudio de vida de anaquel de los productos enlatados.

Tiempo de vida de anaquel	Muestra	Mesófilos aerobios	Termófilos aerobios	Mesófilos anaerobios	Termófilos anaerobios
Recién enlatado					
Acelerado (20 días)	Pulpo al ajillo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Convencional (2 meses)	Pulpo en escabeche				

Evaluación sensorial

Los productos elaborados se evaluaron sensorialmente por medio de un panel de 35 jueces no entrenados los cuales señalaron el nivel de agrado o desagra-

do mediante una escala hedónica estructurada de cinco puntos descriptivos. Dicha escala contó con un indicador del punto medio (3 puntos) con el fin de proporcionarle a cada juez consumidor la facilidad de encontrar un punto de indiferencia al producto en cuestión (Torricella y col. 1989). Los puntos indicaron niveles de agrado, me gusta mucho (1), me gusta (2); ni me gusta ni me disgusta (3), me disgusta (4) y me disgusta mucho (5). Los resultados se analizaron basándose en un diseño estadístico con una distribución completamente al azar. La variable de respuesta fue el nivel de agrado o aceptación de los productos. La distribución de frecuencias de las calificaciones obtenidas de la evaluación sensorial (Figura 2) indicó que los productos fueron calificados mayoritariamente con un valor superior al punto de indiferencia (3), lo cual indicó el agrado de los panelistas por los productos al calificarlos.

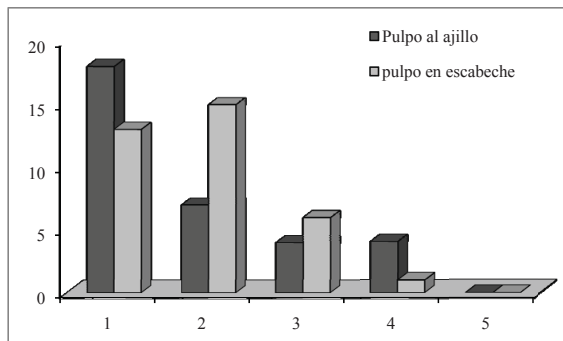


Figura 2. Distribución de frecuencias de las calificaciones de la evaluación sensorial de los platillos elaborados con pulpo.

Los comentarios hechos por los jueces durante la evaluación sensorial señalaron que los productos presentaban los sabores, olores y texturas características de los platillos elaborados con pulpo. Esto sugiere que ambos platillos tendrían una potencial aceptación comercial en el mercado de productos marinos enlatados.

Conclusión

El pH de los platillos elaborados con pulpo se modificó después del proceso de esterilización comercial, sin embargo quedó ubicado dentro de los parámetros establecidos por la normatividad. Los valores de pH se mantuvieron estables durante el tiempo que duró el estudio de vida de anaquel, lo cual indica que los productos no sufrieron modificaciones relacionadas con sus características químicas. Los tratamientos térmicos aplicados durante la elaboración de los platillos junto con el proceso de esterilización comercial garantizaron la inocuidad de los alimentos desde el punto de vista microbiológico, ya que no se observó crecimiento de microorganismos durante el estudio de vida de anaquel. La evaluación sensorial de los platillos fue favorable indicando que ambos

platillos podrían tener una potencial aceptación comercial en el mercado de productos marinos enlatados.

Referencias

- CAC/GL 31-1999. Directrices del código para la evaluación sensorial del pescado y los mariscos en laboratorio.
- (CAC/RCP 52-2003, Rev. 2-2005) Código de prácticas para el pescado y los productos pesqueros.
- García Lira, A., Chel-Guerrero, L., Betancur-Ancona, D., Delgado-Herrera, A., Dr. Lara-Flores, M., G.Cantón-Castillo, L. 2008. Integración de un paquete tecnológico para enlatados de Pulpo y su evaluación económica.
- Hernández-Herrero MM, Roig-Sagués AX, López-Sabater EI, Rodríguez-Jerez JJ y Mora-Ventura MT. 1999. Total volatile basic nitrogen and other physicochemical and microbiological characteristics as related to ripening of salted anchovies. *Journal of Food Science*. 64(2): 344-347.
- INEGI. 2009. El sector alimentario en México 2008. Serie estadísticas sectoriales.
- NMX-F-066-2-1978. Determinación de cenizas en alimentos.
- NMX-F-315-1978. Determinación de la masa drenada o escurrida en alimentos envasados.
- NMX-F-317-S-1978, Determinación de pH en Alimentos.
- NMX-F-358-S-1981. Alimentos para Humanos. Alimentos envasados. Análisis microbiológico.
- NMX-F-360-S-1981 Alimentos para Humanos. Determinación de Cloruros como Cloruro de Sodio (Método De VOLHARD).
- NMX-F-485-SCFI-2000. Productos de la pesca. Pulpo enlatado en su tinta. Especificaciones.
- NOM-027-SSA1-1993, Bienes y servicios. Productos de la pesca. Pescados frescos-refrigerados y congelados. Especificaciones sanitarias.
- NOM-092-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.
- NOM-110-SSA1-1994. Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.
- NOM-111-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.
- NOM-112-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Determinación de Bacterias Coliformes. Técnica del Número más Probable.
- NOM-113-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa.
- NOM-130-SSA1-1995. Bienes y servicios. Alimentos envasados en recipientes de cierre hermético y sometidos a tratamiento térmico. Disposiciones y especificaciones sanitarias.
- Santos-Valencia, J. 2000. Aspectos reproductivos

del pulpo de costa *Octopus maya* (voss y Solís, 1966) en el litoral de Campeche. Informe Técnico, Instituto Nacional de la Pesca, México 1-25.

Solis, M.J. 1997. The Octopus maya fishery of the Yucatán Peninsula. Err. Lang, Hochberg & Ambrose (Eds.). The Fishery and Market Potential of Octopus in California, CMSC: pp. 1-10.

Quitral-Robles, V., Abugoch, L.J., Vinagre, J.L., Guarda, A.M., Larrain, A.B., Santana, G.R. 2003. Efecto de tratamientos termicos sobre las características químicas de carne de jaiba mora (*Homalaspis plana*). Archivos Latinoamericanos de Nutrición, 53(1).

Torricela, M.R.; Zamora, U.E.; Pulido A.H. 1989. Evaluación sensorial aplicada al desarrollo de la calidad en la industria alimentaria. Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia. La Habana, Cuba.

IDENTIFICACIÓN DEL GRADO DE CONCEPTUALIZACIÓN DE LA LOGÍSTICA EN LAS EMPRESAS DE MÉRIDA..

A. Medina-Lara e I. Monsreal-Barrera.

RESUMEN

La logística se ha convertido en un factor clave para la competitividad y el éxito de las organizaciones en la nueva dinámica de la comercialización en el mercado.

La Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Autónoma de Yucatán realizó un estudio para determinar el grado de conceptualización de la logística en las empresas de Mérida, de los sectores industrial, comercial y de servicios, con el objetivo de saber cuánto ha permeado el término en las empresas de la Ciudad de Mérida, e identificar las variables logísticas con mayor y menor grado de conceptualización, con la finalidad de ofrecer alternativas para la capacitación en estas áreas de oportunidad detectadas.

Se determinaron seis variables logísticas las cuales fueron: transporte, aprovisionamiento, tecnologías de información, almacenamiento, servicio al cliente y costos logísticos (BALLOU, 2004; CHOPRA, 2008).

El estudio se aplicó a mandos medios de 103 empresas de la región, siendo las tecnologías de información y aprovisionamiento las variables que obtuvieron menor puntuación, y por lo tanto un menor grado de conceptualización.

Palabras Clave: *logística, competitividad, capacitación, variables logísticas.*

Antecedentes.

Hasta finales del siglo pasado, la logística era solamente obtener el producto requerido, en el lugar adecuado y en el momento oportuno, y todo ello al menor costo posible. Actualmente todas estas actividades han sido redefinidas, constituyendo todo un proceso que requiere de personal calificado para plantear estrategias diferenciadas que les aporten ventajas competitivas a las organizaciones.

En México se han realizado diversas investigaciones con el fin de conocer cómo avanzan las empresas del país en el desarrollo de sus actividades logísticas. Se ha encontrado que las empresas no desarrollan la logística de manera integral, si no como actividades independientes, de igual manera se ha logrado identificar que la principal restricción que México y sus empresas deben superar para alcanzar mayores niveles de competitividad no es la carencia de infraestructura logística, si no la deficiencia de profesionalización de la actividad logística, es decir, la formación, capacitación y desarrollo del “know how” de los profesionales inmersos en el área.

En la Agenda en Competitividad en Logística 2008-2012 de la Secretaría de Economía se reconoce que actualmente sólo se cuentan con 14 cursos que están completamente enfocados a la logística, y 37 carreras dentro de todo el país que cuentan con alguna materia de la misma dentro de sus planes de estudio. Esto demuestra que la capacitación dentro del país es muy escasa y se refleja dentro de la agenda de competitividad logística 2008-2012, siendo únicamente el 36% de todo el personal que se involucra en actividades logísticas, los que se encuentran en capacitación formal. <http://www.elogistica.economia.gob.mx/file/LOGISTICA0812.pdf>

Problemática.

Las empresas mexicanas carecen del capital intelectual adecuado para enfrentar la competitividad internacional, esta necesidad debe atenderse de inmediato, con una visión estratégica, resolviendo la necesidad de formar recursos humanos especializados en logística para integrarlos en las empresas de la región, a fin de que éstas sean más competitivas en los mercados globales.

La logística posee un alto impacto en la competitividad de una empresa; sin embargo, no se habían realizado investigaciones en la región sureste del país que reflejen el grado de conocimiento de las empresas en este tema, por tal motivo fue importante determinar qué tanto las empresas medianas y grandes de los sectores industria, comercio y servicio de la ciudad de Mérida, conocen de los conceptos básicos de logística, para ofrecer alternativas que den respuesta a las necesidades que se identificaron.

Metodología.

1. Determinación de la población de estudio

La primera actividad que se realizó durante la investigación, fue la determinación de la población de estudio. Para esta, fue necesaria la descarga de información de las empresas, realizada por medio del SIEM; la información contenía: *Datos de contacto, Dueño o director de la empresa, teléfono, ubicación geográfica, correo electrónico y total de trabajadores* De modo que, se estableció como unidad de estudio a las empresas medianas y grandes de la ciudad de Mérida.

2. Elaboración de una base de datos que integre la información relevante de contacto

Una vez establecida la población objetivo del estudio, se procedió a determinar la cantidad total de empresas en cada una de los sectores: industria, comercio y servicios en relación a su tamaño. Para ello, se realizó un documento de Excel, el cual concentró todos los datos que fueron importantes para el contacto directo con las empresas, de modo, que se contenían únicamente datos que fueran útiles para la investigación, eliminando aquellas empresas que no cubrían con el perfil común de las empresas que son de interés para la investigación, es decir: el giro educativo. De igual manera, se eliminaron aquellas empresas que contenían más de un registro, considerando todos los adicionales como una sola empresa.

3. Diseño del plan de muestreo

Para la elaboración del plan de muestreo, se procedió a determinar el tamaño de la muestra usando un nivel de confianza del 93%.

Para el diseño del plan de muestreo, se determinó el tamaño de la muestra mediante la fórmula de cálculo de tamaño de la muestra. Debido a que se utilizó el muestreo estratificado, se obtuvieron los tamaños de las muestras en relación a los estratos utilizados, en este caso el tamaño. Posteriormente se determinó mediante la proporción de los sectores: Industria, Comercio y Servicios, el tamaño de la muestra en cada uno de los tipos de empresas, para luego realizar la división de las empresas que estaban contenidas en la población, las cuales fueron elegidas en base a su importancia y renombre. La tabla 1 muestra las cantidades de empresas que fueron obtenidas mediante el diseño del muestreo.

4. Diseño del instrumento de recolección de datos

Dentro del proceso del diseño de cuestionario, se tomaron en cuenta dos factores primordiales, la agilidad para su lectura y comprensión, para así ser contestado en un tiempo breve, y la practicidad para su aplicación, motivo por el cual se elaboraron dos diseños, uno físico (cuestionario impreso) y uno virtual, cuyo diseño fue elaborado con la ayuda del sitio Formsite.

5. Piloteo del instrumento de investigación.

Se llevó a cabo la prueba piloto del cuestionario para corroborar que los términos en los que estaba redactado fueran los comúnmente utilizados, y por tanto, entendibles para las personas a quienes se aplicaría el cuestionario.

6. Reestructuración del instrumento de investigación.

Se reestructuró el cuestionario agregando las sugerencias reportadas en la prueba piloto.

7. Trabajo de campo

Se realizó el trabajo de campo en 103 empresas, 35 en el sector Industrial, 31 en el comercial y 37 en el de Servicios.

8. Análisis de resultados.

Se analizaron los resultados usando estadística descriptiva para procesar cada reactivo del instrumento de investigación.

Tabla 1 Tamaño de la muestra.

Tamaño de la muestra con 93% de confianza				
Sector	Grandes	Medianas	Totales	% de Participación
Comercio	4	27	31	30%
Industria	9	26	35	34%
Servicio	7	30	37	36%
Total			103	100%

Análisis de los resultados.

El análisis se derivó de los datos obtenidos del procesamiento de las encuestas, y sirvió para identificar el grado de conocimiento en términos de logística de nuestra unidad de estudio.

Analizando las calificaciones y todas las posibles combinaciones de tamaño y sector, se calculó un promedio de los resultados obtenidos, de esta forma, se obtuvo una calificación que midió el grado de conceptualización de las empresas. La calificación general de la prueba se obtuvo multiplicando los resultados de las empresas de cada sector, en los dos tamaños estudiados (medianas y grandes) por el porcentaje de participación de cada estrato, obteniendo así una calificación ponderada para cada empresa de cada tamaño y sector. Posteriormente se sumaron estas calificaciones para obtener la calificación general de 5.75.

Tabla 2 Calificaciones general de las empresas

Calificaciones General Tamaño/Sector							
	Grandes (19%)	% Part.	Cal. Ponde- rada	Medianas (81%)	% Part.	Calif. Ponde- rada	Total
Comercio	6.00	4%	0.23	5.28	26%	1.38	1.62
Industria	5.82	9%	0.51	5.38	25%	1.36	1.87
Servicios	5.86	7%	0.40	6.40	29%	1.86	2.26
Total	5.89	19%	1.14	5.69	81%	4.61	5.75

Posteriormente se comparó las calificaciones de las empresas teniendo en cuenta únicamente como referencia el tamaño de las mismas. Los resultados que se obtuvieron reflejan que las empresas medianas cuentan con una mejor calificación con respecto a las empresas grandes. De igual manera se tomó como referencia el sector de las empresas y se observó que el sector de servicios tiene más grado de conceptualización que los otros dos sectores. Observar las gráficas 1 y 2 respectivamente para tales resultados.

Con el objetivo de profundizar en la conceptualización de logística se les otorgó una calificación de acuerdo a su desempeño en cada una de las variables logísticas.

Relacionando las variables con el tamaño de las empresas se puede observar que el transporte tiene el mayor índice de conocimiento por parte de las empresas comparada con las demás variables y tecnología de información es la que menos relacionan las empresas con la logística.

Relacionando las variables entre los diferentes sectores, el comercio e industria tienen una mayor calificación en transporte, en cambio, en el sector servicios la variable con mayor puntuación fue la de servicio al cliente. Las calificaciones más bajas se encuentran en la variable de tecnología de información, esta tendencia está presente en cada una de los sectores analizados.

Relacionando las variables con los diferentes tamaños y sectores de las empresas, se observó que el transporte es la variable que posee calificaciones más elevadas, en contraste con las variables de tecnología de información y aprovisionamiento que son las menos mencionadas en las empresas como un variable fundamental dentro de la logística.

Observar las gráficas 3 y 4 respectivamente.

Conclusiones

Las empresas de servicios obtuvieron un mejor desempeño en el cuestionario (6.27), por lo tanto poseen

mayor grado de conceptualización que las empresas del sector industrial (5.58) y comercial (5.94).

No existe relación alguna entre el tamaño de la empresa y el grado de conceptualización.

La variable con mayor grado de conceptualización es el transporte (9.36).

El grado de conceptualización de la logística es bajo tanto en las empresas medianas y grandes (6.0 y 5.86 respectivamente)

Las empresas del sector industrial tienen el menor grado de conceptualización de logística, al obtener un resultado en la encuesta de 5.58.

La variable con menor grado de conceptualización es Tecnologías de Información.

El concepto de logística aún no ha permeado completamente en las empresas medianas y grandes de Mérida.

El personal de las empresas que labora en el área de logística necesita capacitación formal especialmente en Tecnologías de Información y Aprovisionamiento.

Para aumentar la competitividad de las empresas de todos los sectores, es necesario impartir cursos enfocados en las variables logísticas evaluadas, en el orden que se presenta a continuación:

- Tecnologías de Información.
- Aprovisionamiento.
- Costos Logísticos.
- Servicio al Cliente.
- Almacenamiento.

Referencias bibliográficas

Ballou, R. (2004). Logística. Administración de la cadena de suministro. México: Ed. PEARSON.

Chopra, S. (2008). Administración de la cadena de suministro: Estrategia, planeación y operación. México: Ed. PEARSON.

Referencias de Internet.

SECRETARÍA DE ECONOMÍA. Agenda en Competitividad en Logística 2008-2012, Subsecretaría de Industria y Comercio Dirección General de Comercio Interior y Economía Digital. Abril 2008. Extraído el 7 de diciembre de 2009.

<http://www.elogistica.economia.gob.mx/file/LOGISTICA0812.pdf>

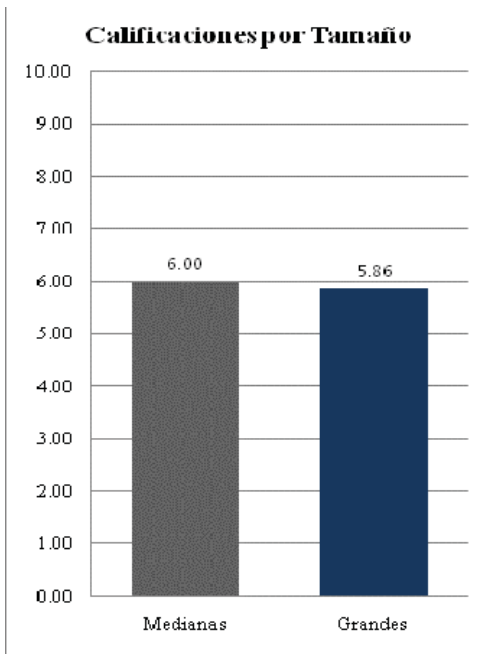


Gráfico 1 Calificaciones por tamaño

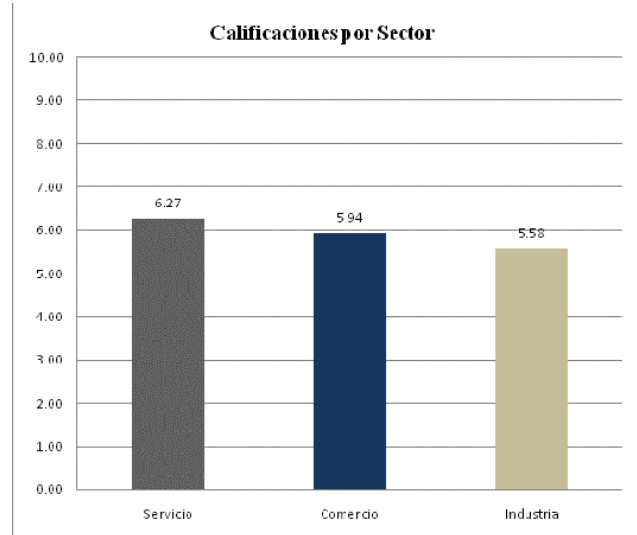


Gráfico 2 Calificaciones por giro

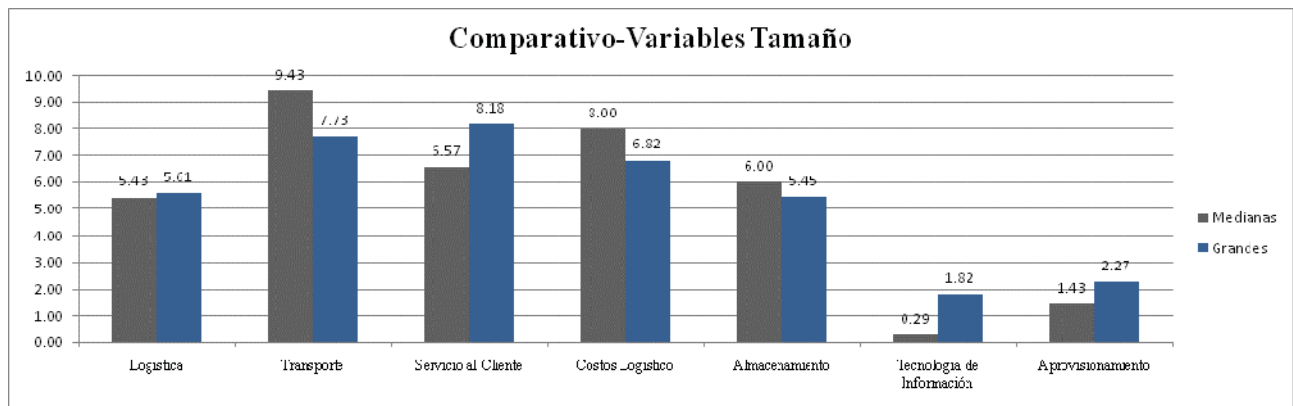


Gráfico 3. Comparativo de calificaciones con respecto al tamaño de empresas.

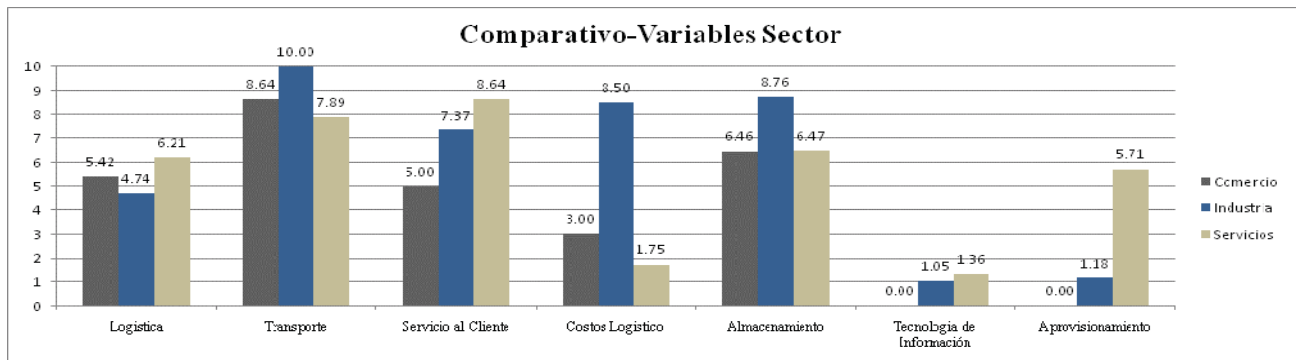


Gráfico 4. Comparativo de calificaciones con respecto al sector de mas empresas.

INSTRUCCIONES A LOS AUTORES

La Revista de la FIQ es una revista multidisciplinaria de difusión científica y tecnológica que considera para publicación trabajos originales y revisiones en cualquier área de la ciencia o la tecnología. Los ARTÍCULOS describen un estudio completo y definitivo. Una NOTA un proyecto completo, pero más corto, que se refiere a hallazgos originales o importantes modificaciones de técnicas ya descritas. Un ENSAYO trata aspectos relacionados con la ciencia pero no está basado en resultados experimentales originales. Una REVISION es un artículo que comenta la literatura más reciente sobre un tema especializado. La sección AVANCES DE INVESTIGACIÓN esta dirigida a comunicaciones cortas de resultados que requieran una publicación rápida. Las secciones EDITORIAL y OPINION están abiertas a toda la comunidad científica.

Los trabajos deberán ser enviados a Periférico Nte. Km 33.5, Tablaje Catastral 13615, Col. Chuburna de Hidalgo Inn, C.P. 97203. Mérida, Yucatán México, Facultad de Ingeniería Química o al correo electrónico revista@fiq.uady.mx. La aceptación de los trabajos esta basada en el contenido técnico-científico y sobre la presentación del material de acuerdo a las normas editoriales de la revista. Se aceptarán trabajos escritos en español. Todos los artículos deben tener un resumen.

Someter un trabajo a publicación implica que el mismo no ha sido publicado ni ha sido enviado en revistas de impacto similar. Se publican preferentemente artículos inéditos; sin embargo podrán ser considerados también, los artículos que hayan sido presentados en congresos, seminarios, o convenciones, siempre y cuando cumplan con los lineamientos. Los autores deben enviar una copia del texto aceptado y corregido en formato electrónico con su correspondiente medio de almacenamiento y una copia impresa indicando el lugar exacto de los Cuadros y Figuras.

Los trabajos que se publican en la Revista de la FIQ deberán contener los componentes que a continuación se indican, empezando cada uno de ellos en página aparte: Página del título, Resumen en español, Texto, Agradecimientos, Literatura citada, Cuadros y Figuras

PÁGINA DEL TÍTULO. Debe contener a) el título del trabajo, que debe ser conciso pero informativo; b) nombre(s) y apellidos de cada autor, acompañados de su afiliación institucional; c) nombre del departamento o departamentos y la institución o instituciones a los que se debe atribuir el trabajo; d) declaraciones de descargo de responsabilidades, si las hay; e) nombre y dirección del autor y correo electrónico a quien deben dirigirse las solicitudes de separatas, y f) origen del apoyo recibido en forma de subvenciones, equipo y otros.

RESUMEN EN ESPAÑOL. Los artículos de difusión científica y notas de investigación deberán incluir un resumen que no pase de 250 palabras. Se indicarán los propósitos del estudio o investigación; los procedimientos básicos y la metodología empleada; los resultados más importantes encontrados, y de ser posible, su significación estadística y las conclusiones principales. A continuación del resumen, en punto y aparte, agregue debidamente rotuladas, de 3 a 10 palabras o frases cortas clave que ayuden a los indicadores a clasificar el trabajo, las cuales se publicarán junto con el resumen.

TEXTO. Las tres categorías de trabajos que se publican en la revista de la FIQ consisten en lo siguiente:

a) **ARTICULOS CIENTÍFICOS.** Deben ser informes de trabajos originales derivados de resultados parciales o finales de investigaciones. El texto del Artículo científico se divide en secciones que llevan estos encabezados:

Introducción

Materiales y Métodos

Resultados y discusión

Conclusiones o implicaciones

En los artículos que así lo requieran puede ser necesario agregar subtítulos dentro de estas divisiones a fin de hacer más claro el contenido, sobre todo en las secciones de Resultados y Discusión, las cuales pueden presentarse como una sola sección.

b) **NOTAS DE INVESTIGACIÓN.** Deben ser breves, pueden consistir en modificaciones a técnicas, informes de casos de interés especial, preliminares de trabajos o estudios en desarrollo; así como resultados de investigación que a juicio de los editores deban así ser publicados. El texto contendrá la misma información del método experimental señalado en el inciso a), pero su redacción será corrida del principio al final del trabajo; esto no quiere decir que sólo se supriman los subtítulos, sino que se redacte en forma continua y coherente.

c) **REVISIONES BIBLIOGRÁFICAS.** Consisten en el tratamiento y exposición de un tema o tópico relevante, actual e importante. Su finalidad es la de resumir, analizar y discutir, así como poner a disposición del lector información ya publicada sobre un tema específico. El texto se divide en: Introducción, (las secciones que correspondan al desarrollo del tema en cuestión) y Discusión.

AGRADECIMIENTOS. Siempre que corresponda, se deben especificar las colaboraciones que necesitan ser reconocidas, tales como a) la ayuda técnica recibida; b) el agradecimiento por el apoyo financiero y material, especificando la índole del mismo; c) las relaciones financieras que pudieran suscitar un conflicto de intereses. Las per

sonas que colaboraron pueden ser citadas por su nombre, añadiendo su función o tipo de colaboración; por ejemplo: “Asesor científico”, “revisión crítica de la propuesta para el estudio”, “recolección de datos”, etc.

LITERATURA CITADA. Las referencias a trabajos publicados deberán ser indicadas en el lugar apropiado en el texto, empleando el apellido del autor (es) y el año de publicación. Sólo utilice dos apellidos como máximo. En caso de existir más de dos autores, utilice el apellido del primer autor seguido de la abreviación et al. Liste las referencias en riguroso orden alfabético por autor al final del texto y antes de las ilustraciones. Los títulos abreviados de las revistas periódicas deberán seguir el formato usado en el Chemical Abstracts.

Para algunos ejemplos de referenciación solicitar la presentación electrónica a la siguiente dirección electrónica revista@fiq.uady.mx.

CUADROS, GRÁFICAS E ILUSTRACIONES. Es preferible que sean pocos, concisos, contando con los datos necesarios para que sean autosuficientes, que se entiendan por sí mismos sin necesidad de leer el texto. Se presentarán uno en cada hoja. Para las notas al pie se deberán utilizar los símbolos convencionales.

VERSIÓN FINAL. Es el documento en el cual los autores ya integraron las correcciones y modificaciones indicadas por el Comité Revisor. Se deberá entregar un solo original en hojas blancas, así como en un medio de almacenamiento. Los trabajos deberán ser elaborados con el procesador de texto de su preferencia en formato rtf. Las gráficas y figuras se deberán entregar como imagen en formato tiff por separado con una resolución mínima de 150 dpi.

Los trabajos no aceptados para su publicación se regresarán al autor, con un anexo en el que se explicarán los motivos por los que se rechaza o las modificaciones que deberán hacerse para ser reevaluados.

UNIDADES. Deberán ser expresadas de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana: NOM-008-SCFI-2002.

Cualquier otra abreviatura se pondrá entre paréntesis inmediatamente después de la(s) palabra(s) completa(s).

Los nombres científicos y otras locuciones latinas se deben escribir en cursivas.

Algunos Ejemplos Formato de Referencias:

Libro

Autor/editor (año de publicación). Título del libro (edición) (volumen). Lugar de publicación: editor o casa publicadora.

Ejemplo: Selltiz, C., Jahoda, M., Deutsch, M. y Cook, S. W. (1976). Métodos de investigación en las relaciones sociales (8a. ed.). Madrid: Rialp.

Artículo o capítulo dentro de un libro editado

Autor/editor (año de publicación). Título del artículo o capítulo. En Título de la obra (números de páginas) (edición) (volumen). Lugar de publicación: editor o casa publicadora.

Ejemplo: Hernández, R., Fernández, C. y Baptista, P. (1998). Recolección de los datos. En Metodología de la investigación (pp. 233-339). México: McGraw-Hill.

Artículo en un libro de congreso:

Marsh, S. (1994). Optimism and pesimism in trust. En Iberamia 94. IV Congreso de Inteligencia Artificial (Comp.) (pp. 286-297). Caracas: McGraw-Hill.

Artículo de revista científica

Autor (año de publicación). Título del artículo. Título de la revista, volumen (número de la edición), números de páginas.

Ejemplo: Parra, R. E. y González, A. (1994). Magnetismo en aleaciones metálicas diluidas. CIENCIA, 3(2), 67-74.

Documentos electrónicos, bases de datos y programas de computadoras

Autor/responsable (fecha de publicación). Título (edición), [tipo de medio]. Lugar de publicación: editor. Disponible en: especifique la vía [fecha de acceso].

Ejemplo: Hernández, M. E. (1998). Parque Nacional Canaima, [en línea]. Caracas: Universidad Central de Venezuela. Disponible en: <http://cenamb.rect.ucv.ve/siamaz/dicciona/canaima/canaima2.htm> [2000, 3 de junio].

El editor en jefe revisará los trabajos recibidos y aquellos trabajos que no cumplan con el formato solicitado no serán enviados a revisión de texto hasta que no cumplan con el mismo. El comité editorial revisará el contenido del trabajo y determinará la aceptación del mismo de acuerdo con los lineamientos de la revista. Cuando así lo requieran se solicitarán modificaciones a la forma de la presentación y se harán sugerencias al fondo del contenido. Los autores revisarán estas sugerencias y en caso de considerar que son pertinentes, harán las correcciones necesarias y enviarán el trabajo corregido. En caso de considerar que las sugerencias no son pertinentes, los autores enviarán por escrito los comentarios y la justificación por la cual no consideran hacer las correcciones y quedará a juicio del comité editorial la aceptación del trabajo. El contenido de los trabajos es responsabilidad de los autores.