

UTILIZACIÓN DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES PARA LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA MICROBIANA

Sonia Peñafiel Acosta

Guido Brito Zúñiga

Gianela Muñoz Shugulí

Docentes Investigadores Escuela Superior Politécnica de Chimborazo
(ESPOCH)-Ecuador

Anabel Zabala Peñafiel

Investigadora Universidad de las Américas (UDLA)-Ecuador

Ana Chafla Moina

Investigadora Universidad Estatal Amazónica(UEA)-Ecuador

Abstract

The effect of including whey in a mix of maracuya peel and whole ripe banana was evaluated, including analysis of bromotological factors, pH, ammonia, short chain fatty acids, and count of yeast by fermentation in solid state every 12 hours. A randomized design in factorial arrangement was employed, with 3 repetitions. The results show that pH values increase independently at the beginning, however, during the fermentation time, the value differs between treatments. The contents of NH₃ registered differences, obtaining a higher value in the treatment of 10% whey at 24 hours with the content of 24.72 meq/L, with respect of the lowest results with the control treatment. At 36 hours of fermentation time the values of NH₃ reduced in all the treatments. The number of yeasts increased when they were treated with 5% and 10% of whey, with respect to the control in the treatment of 15%. A highly significant relationship exists between the production of short chain fatty acids and the fermentation time. The control treatment increased 0.083 mmol/100g per day, while the treatment of 10% whey experienced increases of 1.310 mmol/100g. The (MS) decreased at the same rate when the whey level increased, with respect to the first initial material. Upon increasing the fermentation time, the MS in the treatments increased, with respect to the control, which gives evidence of a greater increase in the treatment of 15% at 36 hours of fermentation time. The raw fiber decreased at growing levels of whey. The true protein increased at the rate that the whey level and the

fermentation time increased in each treatment, being lowest in the control treatment.

Keywords: Agro-industrial waste, solid fermentation, microbial protein

Resumen

En el laboratorio de Biotecnología de la ESPOCH, se evaluó el efecto de la inclusión de suero láctico (SL) (0%, 5%, 10% y 15%) sobre mezcla (50:50) de cáscaras de maracuyá (*Passiflora edulis*) y banano maduro entero (*Musa paradisiaca*) analizando factores bromatológicos, pH, nitrógeno amoniacal (NH₃), ácidos grasos de cadena corta (AGCC), y conteo de levaduras mediante fermentación en estado sólido (FES) cada 12 horas (de 0 a 36 h). Se empleó un diseño aleatorizado en arreglo factorial (4x4) y 3 repeticiones. Los resultados muestran que los valores de pH incrementan independientemente del tratamiento de SL en el tiempo inicial. Sin embargo, durante el tiempo de fermentación (TF), el valor difiere entre tratamientos ($P \leq 0.001$). El contenido de NH₃ registró diferencias, obteniéndose un valor mayor en el tratamiento al 10% de SL a las 24 h ($P < 0.001$) con un contenido de 24.72 meq/L, con respecto a resultados más bajos del tratamiento control. A las 36 h de TF los valores de NH₃ se redujeron en todos los tratamientos. El número de levaduras incrementó ($P < 0.001$) al ser tratadas con 5% y 10% de SL, con respecto al control y al tratamiento de 15%. Existe una relación altamente significativa ($P < 0.001$) entre la producción de AGCC y el TF transcurrido. El tratamiento control incrementó 0.083 mmol/100g por día, mientras que en el tratamiento al 10% de SL se observó aumentos de 1.310 mmol/100g. La MS disminuyó a medida que aumentó el nivel de SL, con respecto a la materia prima inicial. Al aumentar el TF aumenta la MS en los tratamientos, con respecto al control, evidenciando un mayor incremento en el tratamiento al 15% a las 36 h de TF. La fibra cruda (FC) disminuyó ($P \leq 0.0001$) a niveles crecientes de SL. La proteína verdadera (PV) aumentó ($P \leq 0.0001$) a medida que se incrementó el nivel de SL y el TF en cada tratamiento, siendo menor en el tratamiento control.

Palabras clave: Residuos agroindustriales, fermentación sólida, proteína microbiana

Introducción

Entre la comunidad científica, a nivel mundial, la preocupación por el aprovechamiento de residuos ha tomado gran fuerza, sobre todo a nivel industrial, donde los procesos de transformación generan subproductos que pueden ser útiles en otras actividades. Estudios recientes han demostrado que

las cáscaras de frutas poseen excelentes características en su composición química, valor nutritivo y palatabilidad (Rodríguez *et al*, 2008).

A pesar de esto, los residuos generados en las transformaciones agroindustriales y por pérdidas postcosecha en Ecuador, aún no son aprovechados eficientemente, en parte, porque su valor aún desconocido y, sobretodo, por la falta de métodos apropiados para la preparación y caracterización de sustancias de mayor valor agregado con la suficiente calidad e inocuidad como para ser usadas en procesos alimenticios. La estrategia de valorización de tales residuos debe contemplar una serie de criterios adicionales, tales como el calendario y volumen de producción, localización de las áreas que los generan, relación con las zonas de mayor consumo potencial y coste del transporte.

La agroindustria ecuatoriana genera una enorme masa de subproductos, algunos de ellos son arrojados a vertederos a cielo abierto, convirtiéndose en focos de contaminación por su elevado contenido de materia orgánica. Los subproductos generados son principalmente residuos de camales, suero de leche, desechos agrícolas, así como desperdicios de la industria de pulpas y mermeladas. En la actualidad, esta ingente biomasa de subproductos representa un importante problema ambiental para los productores, con doble incidencia tanto en la sanidad ambiental como en la economía local, lo que genera considerables gastos económicos en vista a minimizar los efectos.

Por otra parte, existe gran interés de ganaderos y profesionales del sector pecuario en incorporar desechos y/o residuos agroindustriales en la alimentación animal. Su utilización se ha visto estimulada en los últimos años debido al elevado costo de los insumos empleados tradicionalmente, como también por la modernización de los sistemas de producción de carne.

La fermentación en estado sólido (FES), es un proceso biotecnológico para preservar o desarrollar nuevos alimentos a partir de la utilización de carbohidratos mediante el uso de microorganismos. Las levaduras son microorganismos unicelulares de crecimiento vegetativo que, dependiendo de la especie, pueden utilizar compuestos como las pentosas, metil pentosas, alcoholes de azúcar, ácidos orgánicos, polisacáridos e incluso compuestos lignocelulolíticos y casi todas las especies, con raras excepciones, utilizan iones de amonio para la síntesis de proteína (Miller *et al.*, 2000).

Durante la FES de subproductos agroindustriales ricos en azúcares y celulósicos, la energía de esos carbohidratos y la urea como fuente de nitrógeno (N) son utilizados para el crecimiento de la microflora epífita de los subproductos, duplicando la biomasa en 5.2 minutos, lo que hace posible obtener un incremento en la población de levaduras y bacterias

principalmente, aún en la fase de secado, sin la utilización de inóculo en el sistema (Valiño *et al.*, 1992).

La presente investigación busca aprovechar los residuos agroindustriales por su valor nutritivo y sus propiedades particulares, en la obtención de proteína microbiana por fermentación sólida, empleando como sustratos la mezcla de residual compuesta por cáscara de *Passiflora edulis* (maracuyá) y *Musa paradisiaca* (banano maduro entero) enriquecida con suero de leche a diferentes concentraciones.

Hipótesis

El empleo de residuos agroindustriales como sustrato fermentable en fermentación en estado sólido (FES), puede ser una alternativa para el aprovechamiento de los desechos de las industrias procesadoras a escala artesanal y debido a sus características nutritivas, puede ser incluido en la alimentación animal.

Materiales y metodos

Recolección, transformación y caracterización del residual agroindustrial

Los subproductos de maracuyá (cáscara) y banano maduro entero en mezcla (50:50), se obtuvieron de los mercados de la ciudad de Riobamba. Se recolectó 1 kg de cada subproducto diariamente durante una semana, en bolsas de polietileno y conservadas en refrigeración. Posteriormente fueron trasladadas bajo las mismas condiciones al laboratorio de Biotecnología de la ESPOCH. Después de 2 h de acondicionamiento a temperatura ambiente, se procedió a picar y homogeneizar. El tamaño de partícula fue de 1 a 2 cm aproximadamente. A partir de 100 g de muestra fresca, se determinó la humedad inicial en estufa de aire a 65⁰C durante 4 h. Las muestras fueron molidas en un tamiz de malla 0.5 mm, envasadas y etiquetadas para su posterior análisis.

Análisis físico-químicos

De los residuos deshidratados se analizó: el contenido de materia seca (AOAC 934.16), ceniza (AOAC 942.05), proteína (AOAC 920.152), fibra cruda (AOAC 962.09), extracto etéreo (AOAC 954.02), azúcares totales (MO-LSAIA-21), pH (MO-LSAIA-09).

Procesos de fermentación

Al residuo agroindustrial en mezcla se adicionó: 2% de melaza, 3% de yogurt natural, 0.5% de sales minerales, 1.5% de urea, 0.2 sulfato de amonio y suero láctico en diferentes concentraciones (0%, 5%, 10%, 15%). Para los procesos fermentativos, se empleó 48 matraces Erlenmeyer estériles

de 500 mL de capacidad, los cuales se llenaron con aproximadamente 250 g de la mezclas descritas anteriormente, según cada tratamiento. Todos los matraces Erlenmeyer se taponaron con algodón e incubaron a 32°C. Los tiempos de fermentación fueron de 0, 12, 24 y 36 h, con agitación cada tres horas. Para la determinación del conteo de levaduras, parámetros fermentativos y calidad de sustrato se utilizó la metodología descrita por (Castillo *et al.*, 2011).

Análisis Estadísticos: Análisis de Varianza para las diferencias (ADEVA), Separación de medias de acuerdo a la Prueba de Tukey al nivel de significancia de $P < 0.05$.

Resultados y discusión

Composición química del subproducto

La composición química de los subproductos en mezcla cáscara de maracuyá y banano maduro entero, utilizados como sustratos en la FES se muestra en la tabla 1. Como se observa, la composición de los residuos permite considerarlos como buenos sustratos para el cultivo de microorganismos, lo cual garantiza la posibilidad de realizar su aprovechamiento biotecnológico mediante FES (Barnett *et al.*, 1988). Tabla 1

Procesos de fermentación

Se encontró interacción significativa ($P < 0.001$) entre el nivel de inclusión de SL y el TF para el pH. A medida que aumentó el TF, el pH disminuyó, en los niveles 0 y 10 % de inclusión de SL a las 36 h (tabla 2). Los valores de pH de los niveles 5 y 15 % de inclusión de SL fueron mayores ($P < 0.001$) con respecto al tratamiento control, a las 36 h de fermentación. Esta variación en los valores de pH, pueda darse debido a que los microorganismos en el proceso de FES consumen carbohidratos de fácil fermentación lo que conlleva a un incremento en la concentración de los ácidos grasos de cadena corta y ácido láctico (Elías *et al.* 1990 y Castillo *et al.* 2009). El contenido de NH_3 , registró grandes diferencias, obteniéndose un mayor valor en el tratamiento al 10% de inclusión a las 24 h ($P < 0.001$) ya que presentó un contenido de 24.72 meq/L., con respecto al tratamiento control que reporta los más bajos resultados. A las 36 h de fermentación los valores de NH_3 en todos los tratamientos se reducen. El contenido de amoníaco en la FES está condicionado principalmente como un reflejo de fermentaciones negativas, aunque en la práctica es imposible evitar totalmente su producción. Siempre se encuentra asociado a los ácidos orgánicos en forma de sales de amonio, por lo que no favorece la disminución del pH dentro de la masa fermentada, (Wilkins *et al.*, 1999). Tabla 2

Al inicio del proceso de FES, no se pudieron hallar diferencias significativas entre los valores de AGCC totales. Sin embargo, a partir de las 12 h, se encontraron diferencias significativas ($P < 0.001$) entre los tratamientos. Resultados en correspondencia con los hallados por Vidotti (2001). La mayor producción de AGCC se evidencia en el tratamiento al 10% de SL a las 24 h.

Los datos del conteo de levaduras, expresados en \log_{10} , en los diferentes tratamientos a través del tiempo (Tabla 2) mostraron interacción significativa ($P < 0.0001$) entre los niveles de inclusión de SL y el TF. La comparación entre medias mostró que la interacción de 10 y 15 % de inclusión de SL a las 24 h produjo conteos más altos de células de levaduras existentes en ese tiempo ($P < 0.001$). Los resultados más bajos en los conteos de levadura de tratamiento control, a las 0 y 12 h con respecto a los niveles 10 y 15 % a las 24 y 36 h. Se puede atribuir estos resultados debido a la variación de pH y ausencia de sustancias nutritivas para la producción de microorganismos (Elías, 1994). Los indicadores bromatológicos (Tabla 3) presentaron efecto en la interacción (SL+TF) ($P < 0.0001$). La MS disminuyó a medida que aumentaron los niveles de SL, lo que se explica por el mayor porcentaje de humedad en el SL con respecto a la materia prima inicial. La no inclusión de SL produjo un mayor contenido de MS con el aumento del TF. Sin embargo, con el incremento del SL se obtuvo disminución de la MS a las 0 h aumentando después a las 12 h, sin existir diferencias significativas con respecto a la hora inicial de la fermentación, con 5 y 10 % de SL. No se produjo cambio en la concentración de MS en el nivel de 15 % de inclusión a partir de las 12 h de fermentación. La disminución de la MS en productos ricos en azúcares se debe a un proceso fermentativo de estos carbohidratos en FES, con incremento notable en la concentración de AGV totales y descenso del pH (Elías et al. 1990). Esto concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo, que están relacionados con un desarrollo considerable de microorganismos y, consecuentemente, con un mayor uso de los nutrientes azucarados que forman parte del sustrato (Ruiz *et al.* 2008). El EE también aumentó con el incremento de los SL, lo que se atribuyó al mayor contenido de este nutriente en este producto con respecto a la materia prima (Tabla 1), lo que representó una concentración no mayor entre los tratamientos. Esta aumentó en los tratamientos donde se incluyeron los SL a las 24 h manteniéndose hasta las 36 h. Para la FC, a medida que se incrementó el nivel de SL, tendió a disminuir, lo que está relacionado con el contenido de MS y el material fibroso de estos residuos (Tabla 1). El mayor contenido de FC en los tiempos de 0 y 12 h de fermentación, se evidencia en el tratamiento control y al 5% de inclusión como consecuencia de la rápida utilización de los carbohidratos fácilmente fermentables por parte de los microorganismos. Esto produce un efecto de dispersión de la fibra que

repercute en su concentración, resultados similares obtuvieron Rodríguez *et al.* (2001). Con el incremento de los SL, la PV disminuyó con respecto al contenido en la materia prima, pero existió un incremento en función del TF en cada tratamiento. La PV aumentó en todos los tratamientos, a medida que se incrementó el nivel de SL y el TF, excepto en el tratamiento con 0 % de inclusión a las 0 y 12 h. El aumento de la PV en la FES está estrechamente relacionado con el desarrollo de microorganismos (levaduras y bacterias) que se generan en el sistema. Estos utilizan al nitrógeno amoniacal como fuente nitrogenada y a los ácidos grasos como fuente de energía para sintetizar proteína unicelular (Elías *et al.* 2001). Tabla

Conclusion

La FES de los residuos agroindustriales como cáscara de maracuyá, banano maduro entero y suero de leche como sustratos fermentables, presentaron los mejores valores de pH en los tratamientos donde se incluyó SL, permitiendo obtener un producto rico en microorganismos, fundamentalmente levaduras, lo que incrementó las concentraciones de MS, EE y PV y disminuyó el contenido fibroso, mejorando las características bromatológicas. Sin embargo, se observaron mejores resultados en los indicadores fermentativos de la FES al incluir niveles de suero lácteo al 10%.

El estudio de los parámetros fermentativos en el proceso de FES empleando yogurt y melaza, permite obtener bacterias lácticas y azúcares solubles que aportaran una mejor respuesta a los procesos de FES. Utilizar los residuos agroindustriales como sustrato fermentable en FES, puede ser una alternativa para el aprovechamiento de los desechos de las industrias procesadoras a escala artesanal y por sus características nutritivas puede ser incluido dentro de la alimentación animal.

Referencias:

- AOAC. 1995. Official Methods of Analysis. Association of Official Agricultural Chemists (16th edition). Washington, District of Columbia, pp 1 465
- ANRIQUE, R. 2003. Efecto de la pulpa de manzana ensilada en la ración de vacas lecheras sobre el consumo, la tasa de sustitución y la producción de leche. Archivos de medicina Veterinaria. 35:13
- BARNETT, H.L. & HUNTER, B.B. 1989. Illustrate Genera Imperfect. Ed. Burges & Publishing Company. p.83
- BUITRAGO J., ESCOBAR A. 2009. Aplicación de levadura *Candida spp* como una alternativa viable para la retardación en la pudrición del banano (musa acuminata). Trabajo de grado de microbiología industrial Pontificia Universidad Javeriana.

- CASTILLO, Y., RUIZ, O., ELÍAS, A.. 2009. Kinetics of fermentation of Apple residues. *J. Anim. Sci.* 87:90
- CAYON D., GIRALDO G., ARCILA M., 2000. Postcosecha y agroindustria del plátano en el eje cafetero de Colombia, CORPOICA, Armenia, Quindío.
- CULLISON, A. 1983. Tablas sobre la composición de las materias primas. Alimentos y alimentación de animales. Ed. Diana. México. 420 pp.
- ELÍAS, A., LEZCANO, O. & HERRERA, F. R. 2001. Algunos indicadores bromatológicos y productos finales de la fermentación para la obtención de cuatro tipos de Sacharinas inoculadas con Vitafert. *Rev. Cubana Cienc. Agríc.* 35:153
- ELÍAS, A., LEZCANO, O., LEZCANO, P. & CORDERO, J. 1990. Reseña descriptiva sobre el desarrollo de una tecnología de enriquecimiento proteico en la caña de azúcar mediante fermentación en estado sólido (Saccharina). *Rev. Cubana Cienc. Agríc.* 24:1
- IYAYI E.A, ZAID A. 2004. Enhancement of the feeding value of some agroindustrial by products for laying hens after their solid state fermentation with *Trichoderma viride*. *African J. Biotechnol.* 3:182.
- LOMAS DE LEON, Y.; ROJAS, C. Aprovechamiento de suero de leche de cabra como sustrato para el desarrollo de un producto fermentado probiótico con *Bidobacterium bidum* y *Lactobacillus acidophilus*. En: Universidad de Guanajuato; Universidad de Nuevo León. VII Congreso Nacional de Ciencia de los Alimentos y III Foro de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, (Guanajuato 1-3 de octubre 2005). Guanajuato: Universidad de Guanajuato, 2005. pp.475-484.
- MARTORREL, P. 2006. Desarrollo y aplicación de sistemas rápidos para la detección, identificación y caracterización de levaduras alterantes de alimentos. Tesis Dr. Universidad de Valencia. Departamento de Biotecnología. 221pp.
- MILLER, G., 2000. Ecology, W. H. Freeman and Company, 4Ed, New York.
- RODRÍGUEZ, Z., BOCOURT, R., ELÍAS, A. & MADERA, M. 2001. Dinámica de fermentación de mezcla de caña (*Saccharum officinarum*) y boniato (*Ipomoea batata* Lam.). *Rev. Cubana Cienc. Agríc.* 35:147
- RUIZ, O., CASTILLO, Y., RODRÍGUEZ, C., ELÍAS, A., GARCÍA, H., ARZOLA, C., LA O, O. 2008. Caracterización bromatológica de un fermentado de bagazo de manzana bajo condiciones de microanaerobilidad. XXXVI Reunión Anual Asociación Mexicana de Producción Animal. Monterrey, Nuevo León. México. pp. 193-196
- SALSBURY, R. L., R. E. MATHER., Y C. B. BENDER. 1949. Various carbohydrate as energy sources for some mixed cultures of silage of silage organisms. *J. Dairy Science*, 32(11):901-906.

SERNA, L.; RODRIGUEZ, A. Producción biotecnológica de ácido láctico: estado del arte. En: Cienc. Tecnol. Aliment. 2005, 5 (1):54-65.

STEFANIE, J1999. Silage fermentation processes and their manipulation. FAO Electronic Conference on Tropical Silage. Versión electronic disponible in: <http://www.fao.org/wha/cent/agricult/agpc/gp/silage/contents.Htm>

VALIÑO E., ELÍAS A., ÁLVAREZ E. Y CORDERO J. 1992. Dynamics of growth of sugar cane microbiotes in Saccharina production. Cuban J. Agric. Sci. 26:297

VALIÑO E., ELÍAS A., GALINDO J. LUGO S., ALBELO N., LEZCANO O. Y PIEDRA R. 1999. Proceso fermentativo de la caña de azúcar en un sistema de fermentación en estado sólido compacto (empacado). RCCA.33:199

VIDOTTI, R.M. 2001. Producto e utilização de silagens de peixe na nutricio do piracanjuba (Brycon orbignyanus). Tesis Dr.Sci Universidad de São Paulo. São Paulo, pp. 59

Tabla 1. Composición química de la materia prima en base seca.

INDICADOR	MARACUYA/BANANO (50:50)
Materia seca (%)	76.3
Ceniza (%)	6.81
Proteína bruta (%)	6.30
Fibra bruta (%)	32.6
Extracto etéreo (%)	1.24
Azúcares Totales (°Brix, %)	12.61
pH	5.13

Tabla 2. Indicadores fermentativos de la materia prima, con inclusión de suero láctico en función del tiempo de fermentación.

INDICADOR	NIVEL %Suero	TIEMPO DE FERMENTACIÓN (h)				EE±	VALOR DE P
		0	12	24	36		
pH	0	5,13d	4,89b	4,17a	4,15a	0,15	0.001
	5	5,21d	5,19b	4,58a	4,38b		
	10	5,33d	5,28c	4,42b	4,10a		
	15	5,45d	5,38d	4,63b	4,58b		
NH ₃ (meq/L)	0	1,56c	12,28d	16,45d	5,74b	0,18	0,0001
	5	2,21c	16,13c	21,65c	12,54d		
	10	2,45b	19,21a	24,72a	21,15b		
	15	2,48a	18,33b	22,15b	16,28b		
AGCC (meq/L)	0	4,43d	5,32c	6,34c	6,11c	0,4	0.001
	5	7,34c	19,22b	36,55c	36,42b		
	10	9,18b	23,59a	39,31a	38,25a		

	15	9,45b	23,42a	38,20a	37,16d		
Lev (log10)	0	8,41a	8,67c	9,15c	9,91c	0,4	0.0001
	5	8,54b	9,15d	10,12g	10,15d		
	10	8,91d	9,93e	10,86h	10,31h		
	15	9,23e	9,95f	10,94h	10,54h		

Tabla 3. Parámetros bromatológicos de la FES, con inclusión de suero láctico en función del tiempo de fermentación.

INDICADOR	NIVEL % Suero	TIEMPO DE FERMENTACION				EE±	VALOR DE P
		0	12	24	36		
MS (%)	0	79,43a	78,28b	79,63b	78,42b	0	0
	5	75,28c	77,12d	79,37c	80,05c	0	0
	10	71,83d	74,28f	78,16d	79,14de	0,55	0.0001
	15	68,45e	74,05e	75,94e	75,25e	0	0
EE (%)	0	1,32a	1,38a	1,41b	1,38a	0	0
	5	1,39a	1,41d	1,83d	1,81d	0	0
	10	1,43d	1,47a	1,86e	1,85f	0,18	0.01
	15	1,45e	1,51f	1,82f	1,79e	0	0
PB (%)	0	5,81a	5,91a	10,61b	11,05b	0	0
	5	5,53c	5,85d	11,65b	11,28b	0	0
	10	5,36e	5,89a	12,97c	12,75bc	0,48	0.0001
	15	5,23e	5,58c	12,05g	11,78d	0	0
PV (%)	0	2,53a	2,89a	4,78a	4,55a	0	0
	5	2,63b	2,91c	5,69c	5,19c	0	0
	10	2,65d	2,95c	6,93c	5,87c	0,45	0.0001
	15	2,73d	2,98c	6,84c	5,78c	0	0
FB (%)	0	33,51a	32,54c	31,18b	31,21d	0	0
	5	32,93c	31,15b	30,21d	30,16b	0	0
	10	31,76e	30,28e	30,01e	30,14b	0,58	0.0001
	15	30,23f	30,16e	30,42g	29,17e	0	0