Ciencia y Tecnología de los Alimentos: Avances en Inocuidad y Microbiología

Trabajos completos presentados al III Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Córdoba, Argentina. 2009

Rafael Borneo, Mirtha Nassetta y Nancy Passalacqua
Editores

Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Avances en Inocuidad y Microbiología. Trabajos completos presentados al III Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos
Córdoba, Argentina. 2009.
222 p., 24,5x17 cm
ISBN: 978-987-24620-7-9
Ciencia y tecnología de los alimentos

AUTORIDADES PROVINCIALES

Gobernador de la Provincia de Córdoba
Cr. Juan Schiaretti

Ministro de Ciencia y Tecnología
Ing. Tulio Abel Del Bono Verzura

Ministro de Agricultura, Ganadería y Alimentos
Don Carlos Mario Gutiérrez

Ministro de Industria, Comercio y Trabajo
Don Roberto Hugo Avalle

Secretario de Innovación y Vinculación Tecnológica - Ministerio de Ciencia y Tecnología

Dr. Carlos Walter Robledo

Secretario de Alimentos, Ministerio de Agricultura - Ganadería y Alimentos

Cr. Jose Luis Rovasio

Secretario de Industria, Ministerio de Industria - Comercio y Trabajo
Ing. Cesar Martinelli

SubSecretaria de Coordinación Técnica y Administrativa - Ministerio de Ciencia y Tecnología

Cra. Nancy Carrizo Aguilera

Directora de Vinculación Tecnológica - Ministerio de Ciencia y Tecnología

Dra. Victoria Rosati

Directora de Innovación Tecnológica - Ministerio de Ciencia y Tecnología

Dr. Mario Ignacio Buteler

PRESIDENCIA

Coordinador: Dr. Carlos Walter Robledo. Secretario de Innovación y Vinculación Tecnológica, Ministerio de Ciencia y Tecnología de la Provincia de Córdoba (MINCYT Cba).

Cr. Jose Luis Rovasio. Secretario de Alimentos- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentos de la Provincia de Córdoba. (MAGyA Cba)

Ing. Cesar Martinelli. Secretario de Industria- Ministerio de Industria, Comercio y Trabajo de la Provincia de Córdoba. (MICyT Cba)

COMITÉ ORGANIZADOR

Coordinadora: Dra. Victoria Rosati. Directora de Vinculación Tecnológica, MINCYT Cba.

Dr. Rafael Borneo. Subs. CEPROCOR, MINCYT Cba.

Dr. Alberto Edel León. CONICET - Universidad Nacional de Córdoba.

Bioq. Marcelo Daniel Machado. Subs. CEPROCOR, MINCYT Cba.

Mgter. Natalia Paola Masferrer. MINCYT Cba.

Dra. Mirtha Nassetta. Subs. CEPROCOR, MINCYT Cba.

Bioq. Esp. Nancy Passalacqua. Subs. CEPROCOR, MINCYT Cba.

Lic. Carolina Pedreti. Secretaría de Alimentos, MAGyA Cba.

Dr. Pablo Daniel Ribotta. CONICET - Universidad Nacional de Córdoba.

Ing. Manuel San Pedro. UVITEC - Unión Industrial Córdoba, Bolsa de Comercio y Cámara de Comercio Exterior.

Dr. Daniel Wunderlin. CONICET - Universidad Nacional de Córdoba.

COMITÉ CIENTIFICO

Coordinador: Dr. Alberto Edel León. CONICET - Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Dra. Analía Abraham. CONICET - Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

Dra. María Cristina Añón. CONICET - Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

Dr. Rafael Borneo. Subs. CEPROCOR - MINCYT Cba, Argentina.

Dra. Pilar Buera. Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Dra. Sofía Chulze. Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina

Dra. Concha Collar. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, España.

Dr. Miguel De Billerbeck. Gerencia Corporativa de Innovación. ARCOR S.A.I.C.

Dr. Marie De Lamballerie-Anton. Ecole Nationale D´Ingénieurs des techniques des industries agricoles et alimentaires, Francia.

Dra. Cristina Ferrero. CONICET - Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

Dr. John W. Finley. Louisana State University, USA.

Dr. Jurian Hoogewerff. University of East Anglia, United Kingdom.

Lic. Susana María Jiménez. Universidad Nacional del Litoral, Argentina.

Dr. Alain Le-BAIL. Ecole Nationale D´Ingénieurs des techniques des industries agricoles et alimentaires, Francia.

Mg. Mariane Lutz Riquelme. Centro de Investigación y Desarrollo en Alimentos Funcionales, Chile.

Dr. Rodolfo Mascheroni. CONICET - Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

Dr. Abel Guarda Moraga. Universidad de Santiago de Chile, Chile.

Dra. Mirtha Nassetta. Subs. CEPROCOR - MINCYT Cba, Argentina.

Mg. Sonia Olivarez Cortéz. Instituto de Nutricion y Tecnologia de los Alimentos, Chile.

Dr. Manuel Gómez Pallares. Universidad de Valladolid, España.

Bioq. Esp. Nancy Passalacqua. Subs. CEPROCOR - MINCYT Cba, Argentina.

Dra. Ruth Pedroza Islas. Universidad Iberoamericana, México.

Dra. Pilar Peral García. Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

Dra. Gabriela Pérez. CONICET - Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Dr. Pablo Daniel Ribotta. CONICET - Universidad Nacional de Córdoba, Argentina

Dra. Marta Rivas. Instituto Malbrán, Argentina.

Dra. Cristina Rosell. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, España.

Dr. Marcelo Rosmini. Universidad Católica de Córdoba, Argentina.

Dra. Viviana Salvadori. CONICET - Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

Dra. Carmen C. Tadini. Universidad de Sao Paulo, Brasil.

Dr. Fidel Toldrá. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, España.

Dr. Daniel Ramón Vidal. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, España.

Dr. Jorge Ricardo Wagner. Universidad Nacional de Quilmes, Argentina.

Dr. Daniel Wunderlin. CONICET - Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Dr. Lorenzo Zacarías. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, España.

COMITÉ TECNOLOGICO

Coordinador: Dr. Mario Ignacio Buteler. Director de Innovación Tecnológica. MINCYT Cba.

Cr. José Luis Rovasio. Secretaría de Alimentos, MAGyA Cba.
Ing. Cesar Martinelli. Secretaría de Industria, MICyT Cba.
Ing. Luis de La Cuesta. Secretaría de Industria, MICyT Cba.
Lic. Marta Domínguez. Gerencia de Legislación Alimentaria. ARCOR S.A.I.C.
Dr. Gabriel Raya Tonetti. Gerencia Corporativa de Innovación. ARCOR S.A.I.C.
Ing. Ricardo Cravero - Qinnova
Ing. Ivana Cavigliasso - Prodeman S.A.

SECRETARÍA TÉCNICA

Coordinadora: Mgter. Natalia Paola Masferrer. Dirección de Vinculación Tecnológica, MINCYT Cba.

Dipl. Verónica Amato. Cooperacion Internacional, MINCYT Cba.
Lic. Natalia Andretich. Comunicacion y prensa, MINCYT Cba.
Tec. Gastón Dunayevich. Comunicacion y prensa, MINCYT Cba.
Lic. Marisol Gomez Rojas. Cooperacion Internacional, MINCYT Cba.
Lic. Maribel Gonzalez. Cooperacion Internacional, MINCYT Cba.
Lic. Daniel Moyano. Comunicacion y prensa, MINCYT Cba.
Tec. Mirta Neira. Gestión de Proyectos. MINCYT Cba.
Tec. Sergio Rubino. Comunicacion y prensa, MINCYT Cba.
Lic. Irene Schubel. Comunicacion y prensa, MINCYT Cba.
Lic. Mariana Victoria. Secretaria de Alimentos, MAGyA Cba.
Tec. Ramón Roque Zapata. Comunicacion y prensa, MINCYT Cba.

SECRETARÍA ADMINISTRATIVA

Coordinadora: Cra. Nancy Carrizo Aguilera. SubSecretaria Técnica y Administrativa, MINCYT Cba.

As. Guillermo Ferreyra. MINCYT Cba.
As. Maria Cecilia Collino. MINCYT Cba.

SUBSECRETARÍA DE INFORMATICA Y TELECOMUNICACIONES

Coordinador: As. Daniel Pastorino

As. Horacio Velasco Vocos

PATROCINANTES

Gobierno de la Provincia de Córdoba

Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica -Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas

Third World Academy of Sciences

Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo - CYTED

Sealed Air

Instituto de Promoción de la Carne Vacuna Argentina

APOYO ECONÓMICO PARA ESTA EDICIÓN

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas

AUSPICIANTES

Universidad Nacional de Córdoba

Universidad Católica de Córdoba

Universidad Blas Pascal

Universidad Empresarial Siglo 21

Universidad Tecnológica Nacional - Facultad Regional Córdoba, San Francisco y Villa María

Universidad Nacional de Río Cuarto

Universidad Nacional de Villa María

Instituto Universitario Aeronáutico

Instituto Nacional de Tecnología Industrial

INTI Córdoba

Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria – Consejo del Centro Regional Córdoba

Organización Panamericana de la Salud- Argentina

SENASA Argentina

Colegio de Bioquímicos de la Provincia de Córdoba

Colegio de Nutricionistas de la Provincia de Córdoba

Asociación Argentina de Ingenieros Químicos

ÍNDICE

Presentación 2
Avelino F. F. 3
Boccalatte F. L. 9
Büchert A. M. 18
Capitani M. 24
Castañeda R E. 30
Castañeda R E. 34
Dubois M. E. 40
Faillaci S. M. 46
Hasperué J. H. 59
Herman C. 67
Hracek M. V. 74
Jiménez P. 80
Laoretani D. 91
Lehrke G. 100
Londoño M. 107
López O. 113
Marín M. A. 120
Martos M. A. 132
Morales L. L. 139
Palavecino N. 148
Pérez M. B. 154
Pucciarelli A. B. 161
Rivas, M. A. 170
Rodriguez A. 177
Rodríguez Vaquero M. J. 187
Sobral P. 193
Sologubik C. A. 200
Soto S. 207
Ordoñez M. R. 214

Presentación

En el año 2004, gracias a la iniciativa y esfuerzo de un grupo de Investigadores de la Provincia de Córdoba, se realizó el Primer Congreso de Ciencia y Tecnología de los Alimentos como un ámbito para la interacción profesional y la difusión del conocimiento científico-tecnológico ligado al área de los Alimentos. El primer evento fue todo un éxito. Luego vino la segunda convocatoria en el 2006, y posteriormente, en Abril del 2009, la tercera. Los tres congresos han contado con excelentes invitados Internacionales y Nacionales y, además, cada vez con un creciente número de asistentes. Las presentaciones, orales y en formato posters, las deliberaciones y conclusiones de estos congresos han sido cada vez más entusiastas y confirman la aceptación que este evento ha alcanzado en el ambiente provincial, nacional e internacional de los profesionales de la Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Como parte de las actividades del III Congreso de Ciencia y Tecnología de los Alimentos el comité científico se propuso editar y publicar trabajos de investigación completos sobre la base de las presentaciones realizadas en el mismo. Ha sido una ardua pero gratificante labor.
La inocuidad, calidad, microbiología y conservación de los alimentos son áreas del conocimiento que indudablemente están ligadas entre si. Es por ello que todos los trabajos completos en donde se discute sobre el avance del área han sido agrupados en este libro. Aquí pueden consultarse 30 trabajos completos de una alta calidad científica que fueron sometidos a una revisión exhaustiva por parte del comité científico y editor. Creemos que este libro es una contribución más a la difusión del conocimiento científico-tecnológico en el área de los alimentos que se desarrolla en Argentina, Latinoamérica y el mundo.

Comité Editor

Dr. Rafael Borneo
Dra. Mirtha Nassetta
Bioq. Esp. Nancy Passalacqua
MINISTERIO DE CIENCIA Y TECNOLOGIA
PROVINCIA DE CORDOBA

Recuperación de *Escherichia coli* potencialmente patógenas de helados de leche expendidos en Puebla, México

Recovery of potentially pathogenic *Escherichia coli* in milk ice creams expended in Puebla, Mexico.

Avelino FF (1), Martínez ML (2), Avelino FMCG (2), Chávez BE (1), Castañeda REI(1)

(1) CICM-ICUAP, (2) Ingeniería en Alimentos, BUAP, México. Edificio 103-J Ciudad Universitaria San Manuel, Puebla, México
iracena@yahoo.com

RESUMEN
El objetivo del presente trabajo fue determinar el patogrupo de las cepas de *Escherichia coli* aisladas de helados de leche expendidos en la ciudad de Puebla, México, para lo cual se analizaron 100 muestras de helado de leche, de las cuales 56 correspondieron a helados semi-industriales, 36 a helados de marca registrada y 8 a helados artesanales, para aislar cepas de *E. coli*. La cuantificación de Organismos Coliformes Fecales (OCF) se llevó a cabo en base a la NOM-112-SSA1-1994, para el aislamiento de *E. coli*, las muestras se sembraron en agar Mac Conkey y EMB, las colonias lactosa positivas fueron analizadas presuntivamente por pruebas bioquímicas y confirmadas por VYTEK. Las cepas confirmadas se clasificaron en los diferentes patogrupos por PCR para amplificar los genes bfpA para EPEC y lng para ETEC y por Dot- blot se determinaron los factores de colonización de ETEC (CFA I, CS1, CS2, CS4, CS6), y FAA/I y FAA/II para EAEC**.** Se aislaron 79 cepas de *E. coli* de las cuales el 31.6% correspondieron a EPEC, 31.6% a ETEC, 15.1% a EAEC y 21.5% no pudieron clasificarse. Los helados con mayor incidencia de cepas patógenas fueron los semi-industriales. Los resultados obtenidos muestran que los tres tipos de helados pueden ser vehículos de enfermedades transmitidas por alimentos.

ABSTRACT
The aim of this research was to determinate the pathogrup of *E. coli* strains isolated of milk ice creams expended in Puebla, México for which 100 samples of milk ice cream were analyzed for detection of *E. coli*, of which 56 corresponded to semi-industrial ice creams, 36 to ice creams of registered trademark and 8 to handcrafted ice creams. OCF's quantification was carried out in agreement of the NOM-112-SSA1-1994 Mexican Official Norm. For the isolation of E. coli, the samples were cultured in Mac Conkey agar and EMB agar; the lactose positive colonies were analyzed previously by tests biochemical and confirmed by VYTEK. E. coli strains were classified in the different pathogroups by PCR to amplify the gene *bfpA* for EPEC strains and *lng* gen for ETEC strains. Dot- blot analysis were used for classification of *E. coli* in ETEC (CFA I, CS1, CS2, CS4, CS6) and EAEC (AAF/I and AAF/II). 79 *E. coli* strains were isolated of which 31.6 % corresponded to EPEC, 31.6 % to ETEC, 15.1 % to EAEC and 21.5 %, were not classified. Pathogenic E. coli strains were more frequent in semi-industrial ice cream. The Results did show that the ice cream maybe will produce foodborne outbreaks.

PALABRAS CLAVE: *Helados de leche, patotipos de E. coli, riesgos en alimentos.*

KEYWORDS: *Ice creams of milk, pathotype of E.coli, risks in foods*.

INTRODUCCIÓN
El helado se define como un alimento de sabor dulce que se consume en estado congelado, además de contener agua y azúcar, muchas veces contiene componentes lácteos, frutas y otros aditivos sápidos, sustancias aromáticas y colorantes (Fritz 1989).

Existen diferentes tipos de helados, según lo establecido por la legislación alemana, basándose en su contenido de grasa y el porcentaje de aire incluido en la mezcla (overrum), que le confieren la consistencia cremosa (Robinson 2002).
Los helados de acuerdo al tipo de producción se clasifican en industriales, semi-industriales y artesanales. Algunos factores que contribuyen al desarrollo de la industria de helados son: la perfecta refrigeración y adaptación de la industria alimenticia, la mejora en el método de manufactura y el desarrollo de los equipos de procesamiento de mejor calidad semejante a sistemas de operación continua automatizada, más y mejores ingredientes con mejora de conocimiento en el uso de ellos. La capacidad de producción es de 2 000 litros / hora, los tipos de productos que se producen son copas, conos, barras y contenedores o recipientes tamaño familiar. Los sabores varían y se combinan de uno, dos o tres sabores por producto en caso de ser posible, pueden tener coberturas como nueces, baño de chocolate, etc. Las materias primas utilizadas para la elaboración del helado son: Leche en polvo desnatada, aceite de coco, azúcar, suero en polvo, agua purificada, emulsificantes, colorantes, estabilizadores, saborizantes. Estos helados son de fácil acceso y se encuentran principalmente en supermercados y centros comerciales. Los métodos y las maquinarias usadas en la producción de helados son muy importantes para el mantenimiento de altos estándares de higiene, con altos beneficios.
Los helados de tipo industrial son un poco más caros que los obtenidos semi-industrialmente debido al uso de maquinaria de alto costo, sin embargo el helado semi-industrial es de fácil acceso ya que se encuentra en un establecimiento fijo, su precio varia de 10-20 pesos dependiendo del sabor. Es elaborado mediante una base de helado a lo que los manipuladores le llaman la crema del helado, la cual mezclan con diferentes ingredientes extras (nuez, fresa, frutas secas, coco, etc.). Debido a estas razones los dueños pueden producir una mayor variedad de sabores de helado y una mayor cantidad. Este permanece dentro de un congelador hasta que se termine el producto, y es cuando producen un nuevo lote, los helados son vendidos en conos o en vasos y cuentan con 2 o 3 servidores para todas las variedades de helados; estos servidores se encuentran dentro de un recipiente con agua. La maquinaria con la que cuentan estos establecimientos es una máquina llamada “fábrica de helados” en la cual se elaboran helados y paletas. Estos son elaborados mediante un proceso batch.
Los helados artesanales se encuentran en la calle, son de fácil acceso para el mercado, no sólo por su ubicación sino también por el precio ya que esté varia entre 3 y 10 pesos. Son elaborados y vendidos el mismo día, regularmente cada recipiente que contiene el producto cuenta con su propia cuchara. Los ingredientes de este tipo de helado son leche, agua, frutas, sacarosa y algunos saborizantes, no contienen gomas, estabilizantes ni colorantes por lo que este tipo de helado podría recibir el nombre de helado de leche o sorbetes según sea el caso. La producción de cada bote es de aproximadamente 10 litros de helado por sabor y dependiendo del espacio y el mercado con el que cuente el productor será la variedad de sabores que él elaborará. La maquinaria con la que se cuenta es la más rústica es un bote de madera de mayor tamaño, un bote de aluminio, una cuchara, sal y hielo.
El helado elaborado con leche es considerado uno de los derivados lácteos de mayor consumo, por ser fuente de proteínas, carbohidratos, lípidos y minerales, se caracteriza porque debe llevar al menos un 70% de leche íntegra que puede ser sustituida por leche concentrada o en polvo (Fritz 1989).
Los helados son un alimento completo y accesible para muchos de los microorganismos, incluyendo patógenos, bajo condiciones de manipulación incorrectas pueden servir como medio de transporte para ellos e incluso para que se reproduzcan, por lo que pueden constituir un riesgo para el consumidor cuando no se lleva un control de calidad microbiológica adecuado.
Existen reportes de brotes epidémicos relacionados con el consumo de helados como los acontecidos en 1994 en Minesota (Hennessy *et al.* 1996), en 1997 en Reino Unido (Dodhia 1998) y recientemente en 2007 en Bélgica (De Schrijver 2008). Por otro lado el Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis (INPPAZ/OPS/OMS) y la Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe, han reportado 4,948 brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) en los años de 1995-2000 en 21 países de América Latina y el Caribe en donde 155,304 personas se enfermaron y 264 fallecieron. Los principales agentes causales de dichos brotes fueron, *Salmonella* spp, *Staphylococus aureus*, *Clostridium perfringens* y *Escherichia coli* (Parrilla-Cerrillo 1993, Wouafo 1994 y CDC 1994).

Cuando las condiciones higiénicas son inadecuadas, tanto en el manejo de la materia prima como durante la elaboración de los helados, los riesgos microbiológicos aumentan considerablemente, sobretodo en la fabricación artesanal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizaron 100 muestras de helado de leche, de las cuales 56 correspondieron a helados semi-industriales, 36 a helados de marca registrada y 8 a helados artesanales.

Los helados se tomaron en condiciones asépticas como lo establece la NOM -109-SSA1-1994 (Bienes y servicios. "Procedimientos para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico") y se transportaron a 4º C al laboratorio de Patogenicidad Microbiana del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas de la BUAP, en donde fueron procesadas y analizadas microbiológicamente.

La cuantificación de organismos coliformes fecales (OCF) se llevó a cabo en base a la NOM-112-SSA1-1994 (Bienes y servicios. Determinación de Bacterias Coliformes. Técnica del Número más Probable), para ello se inocularon una serie de tres tubos por triplicado con las diluciones apropiadas (en agua peptonada al 0,1%), de caldo lauril sulfato triptosa (CLST) que contenían campana de Durham. Los tubos que después de las 48 horas de incubación a 35 ± 1ºC mostraron la presencia de gas dentro de la campana de Durham se consideraron positivos y se sembraron por azada en caldo EC e incubados a 45 ± 0,2 ºC en baño de agua circulante por 24 horas a fin de observar la presencia de gas; la lectura de los tubos se realizó con la Tabla de NMP.

Los tubos que fueron positivos se sembraron en agar Mac Conkey y agar Eosina y azul de metileno, las placas se incubaron por 24 horas a 35 ± 1ºC, se seleccionaron 5 UFC lactosa positivas y se purificaron, posteriormente se les realizaron pruebas bioquímicas y las cepas que tuvieron características de *E. coli* se confirmaron por VYTEK.

Las cepas confirmadas por VYTEC se clasificaron en patogrupos mediante técnicas inmunológicas y moleculares. Se usó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección del gen *bfpA* de *Esherichia coli* enteropatógena (EPEC) y del gen *lng*A de *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC), los fragmentos de DNA amplificados fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 1%, y teñidos con bromuro de etidio para observar una banda de 326 pb correspondiente al gen *bfpA* y de 708 pb para el gen *lngA* en un transiluminador de luz UV.

Las cepas que no amplificaron por PCR se clasificaron por Dot-Blot para determinar los factores de colonización de ETEC (CFA I, CS1, CS2, CS4, CS6), y FAA/I y FAA/II para EAEC. Para llevar a cabo el Dot-Blot, las cepas fueron crecidas en caldo LB por 24 horas a 35 ± 2ºC y el cultivo se ajustó a una OD600=1.1. Se colocó sobre círculos de membrana de nitrocelulosa una gota de 30 ml del cultivo ajustado se dejo secar a 37ºC y se bloqueó con 100 ml de una solución de leche descremada en polvo al 3% en PBS-Tween al 0.5%, durante 2 h a 37ºC y se incubó con el anticuerpo correspondiente diluido en PBS-Tween al 0.5% durante 1 h a 37ºC y posteriormente con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa. Se revelaron con diaminobencidina en presencia de peróxido de hidrógeno.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las 100 muestras de helados analizadas, el 82% fueron positivas a la prueba de coliformes fecales, el 100% de los helados artesanales estuvieron contaminados con CF (8/8), el 91% de los helados semi-industriales (51/56) y el 52.5% de los helados industriales (19/36) (**Figura 1**), la contaminación de los helados artesanales se debió principalmente a la presencia de *E. coli* no clasificadas, *Enterobacter* sp y *Citrobacter* sp. Se aislaron 79 cepas de *E. coli*, de las cuales 25 (31.6%) correspondieron a *E. coli* enteropatógena (EPEC), 25 (31.6%) a *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), 12 (15.1%) a *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y 17 (21.5%) no corresponden a ninguno de los patogrupos buscados (**Figura 2**), cabe destacar que la mayoría de las cepas de *E. coli* recuperadas fueron patógenas (62/79) y que las otras 17 cepas que no se pudieron clasificar pueden ser no patógenas pero también pueden pertenecer a alguno de los grupos no buscados. Los porcentajes de recuperación de *E. coli* en los helados de tipo industrial fue del 75% (27/36), en los semi-industriales del 87.5% (49/56) y en los artesanales del 37.5% (3/8). Los helados que presentaron un mayor porcentaje de recuperación de *E. coli* diarrogénicas fueron los de tipo semi-industrial (**Tabla 1**).

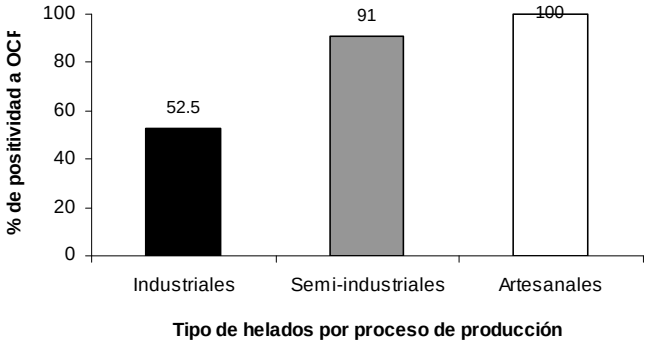


Figura 1. La mayoría de las muestras de helados de diferente tipo de elaboración presentaron contaminación con organismos coliformes fecales, los más contaminados fueron los artesanales y los menos contaminados los de tipo industrial.

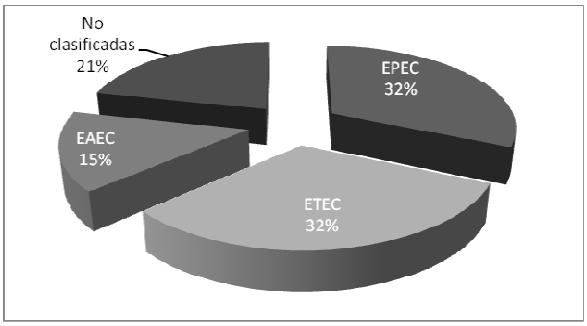


Figura 2. El porcentaje de presencia de cepas de *E. coli* diarrogénicas de los patotipos EPEC y ETEC fueron muy similares, con lo que pone de manifiesto que los helados pueden ser un vehículo de transmisión de ETA.

Tabla 1. Número de cepas de *E. coli* diarrogénicas en base al patotipo al que pertenecen y al tipo de helado del que fueron recuperadas.

Helados tipo…	EPEC	ETEC	EAEC	Sin clasificar	Total
Industrial	12	5	3	7	27
Semi-industrial	10	20	9	10	49
Artesanal	3	0	0	0	3
Total	25	25	12	17	79

El aislamiento de *E. coli* en un porcentaje alto en los helados demuestra contaminación intestinal y condiciones sanitarias deficientes en la mayoría de los establecimientos muestreados. Las principales causas de contaminación microbiana en los helados son, entre otras, personas vehiculizadoras de gérmenes (enfermas), refrigeración insuficiente del producto, ausencia o deficiencia de calentamiento de la mezcla, prolongados tiempos de reposo de la mezcla (no inmediato enfriamiento), materias primas de deficiente calidad sanitaria.

Uno de los factores que se observó al visitar los diferentes establecimientos es que el agua en donde se enjuagan los servidores de los helados se cambiaba solo dos veces al día, tiempo suficiente para que los microorganismos puedan incluso reproducirse, en un agua que contiene algunos nutrientes provenientes del helado (datos no se muestran).

Los resultados obtenidos concuerdan con los obtenidos por Arias en Costa Rica, quienes reportaron que el 100% de helados caseros estuvieron contaminados con CF (Arias 1990), y con los hallazgos de Kruy y colaboradores quienes reportaron que el 30% de las muestras de helados de venta ambulante presentaron también este grupo bacteriano (Kruy 2001).

Windrantz reportó que el 82% de helados artesanales y el 56.7% de helados industriales no cumplieron con la norma establecida para los CF, resultados parecidos a los que se obtuvieron en el presente estudio, para la recuperación de *E. coli* los datos si difieren ya que ellos reportaron el 51.4% en helados artesanales y 21.7% en helados industriales (Windrantz 2000), sin embargo nosotros

encontramos un menor porcentaje en helados artesanales, esto puede deberse a que el tamaño de muestra fue menor que el de ellos.
Si se toma en cuenta que la mayoría de cepas aisladas de los helados se consideran potencialmente patógenas, es decir causantes de enfermedades infecciosas gastrointestinales, podemos concluir que los helados pueden ser considerados como una posible fuente de transmisión de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA).

CONCLUSIONES

En los tres tipos de helados estudiados se identificaron cepas de *E. coli* potencialmente patógenas de los patogrupos: EPEC, ETEC y EAEC. De las cuales EPEC y ETEC fueron las más frecuentes en su aislamiento.
La frecuencia de recuperación de *E. coli* patógenas en los diferentes tipos de helados fue mayor en los helados de tipo semi-industrial y menor en los helados industriales, los cuales presentaron también los valores más bajos de cuenta de coliformes fecales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arias Echandi M.L., Antillón Guerrero F., Montoya Chaves A. 1990. Bacteriological analysis of ice cream, cheeses, small meat and cheese pies bought at street sellings (peddlings) Rev. Costarric. Cienc. Méd; 11(3/4):7-11.

CDC. 1994. Outbreak of *Salmonella enteritidis* associated associated with nationally distributed ice cream products-Minnesota, South Dakota, and Wisconsin. MMWR. Morb Mortal Wkly Rep 43(40):740-741.

De Schrijver K., Buvens G., Poseé B., Van den Branden D., Oosterlynch O., De Zutter L., Eilers K., Piérard D., Dierick K., Van Damme-Lombaertz R., Lauwers C. y Jacobs R. 2008. Outbreak of verocytotoxin-producing *E. coli* O145 and O26 infections associated with the consumption of ice cream produced at a farm, Belgium, 2007.

Dobhia H., Kearney J. y Warburton F. 1998. A birthday party, home-made ice cream, and an outbreak of *Salmonella enteritidis* phage type 6 infection. Commun Dis Public Health, 1: 31-34.

Doyle M.P., Beuchat L.R y Montville T.J. 1997. Food Microbiology.Fundamentals and Frontiers, Washington D.C., U.S.A., ASM Press

Fritz T. 1989. Fabricación de helados. Zaragoza, España,Editorial Acribia, S.A. pag 1-30 y 99-144.

Hennessy T. W., Hedberg C. W., Slutsker L., White K. E., Besser-Wiek J. M., Moen M. E., Feldman J., Coleman W. W., Edmonson L. M., MacDonald K. L. y Osterholm M. T. 1996. A National outbreak of *Salmonella enteritidis* infections from ice cream. The investigation team. N Engl J Med 334: 1281-1286.

Kruy SL, Soares JL, Ping S, Sainte-Marie FF 2001. Microbiological quality of “ice, ice cream, sorbet” sold on the streets of Phnom Penh; April 1996-April 1997. Bull Soc Pathol Exot, 94 (5): 411-4

NOM -109-SSA1-1994 Bienes y servicios. “Procedimientos para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico”

NOM-112-SSA1-1994 Bienes y servicios. Determinación de Bacterias Coniformes. Técnica del Número más Probable.

Parrilla-Cerrillo M.C., Vázquez-Castellanos J. L., Saldate-Castañeda O., Nava-Fernandez L.M. 1993. Brotes de toxiinfecciones alimentarias de origen microbiano y parasitario. Salud Pública de México, 35 (5)

Robinson R.K. 2002. Dairy Microbiology Handbook. The Microbiology of milk and milk products. Third Edition. USA. Wiley-Interscience a John Wiley & Son S. Inc., Publication.

Wouafo MN, Njine T, Tailliex R. 1994. Hygiene and microbiologic quality of ice cream produced in Cameroon. A public health problem. Bull Soc Pathol Exot, 89(5):358-362.

Estudio de la cinética de deshidratación osmótica de manzanas y del efecto sobre la calidad final del producto deshidratado

Study of the osmotic dehydration kinetics of apples and the effect on the dehydrated product final quality

Boccalatte FL (1), Pagano AM (1,2)

(1) TECSE, Depto. de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería – UNICEN
(2) PROGRAMA INSTITUCIONAL ALIMENTOS – UNICEN
Av. Del Valle 5737, 7400 (Olavarría), Buenos Aires, Argentina,
Email apagano@fio.unicen.edu.ar

RESUMEN

El propósito del presente trabajo fue estudiar la cinética de deshidratación osmótica de cubos de manzanas de las variedades *Red Delicious* y *Granny Smith*. Se utilizaron soluciones osmóticas de sacarosa y glucosa en agua con concentraciones de 40% p/p y 60% p/p, a temperaturas de 25°C, 40°C y 60°C, empleando una relación fruta/jarabe de 1/15, sin agitación. Durante la prueba experimental se midió la concentración de sólidos solubles, índice de refracción y humedad. Se obtuvieron curvas que relacionaron la pérdida de agua (WL), la ganancia de sólidos (SG) y la reducción de peso (WR) con el tiempo.

Los sólidos solubles aumentaron desde un valor inicial de 13° a 35,5-58 °Brix; la humedad se redujo desde 88,5% b.h. (base húmeda) hasta valores en el rango 40-60% b.h.; WL, SG y WR aumentaron en el tiempo, siendo en todos los casos mayor la pérdida de agua que la ganancia de sólidos.

Los resultados experimentales de las variables WR, WL y SG, así como la humedad adimensional (MR) y el contenido de sólidos adimensional (SR) se evaluaron mediante análisis de varianza a fin de determinar las variables significativas sobre la cinética del proceso. Sobre la base de este análisis, para las dos variedades se observaron los mismos efectos a lo largo del proceso en cuanto al comportamiento de la variable principal WL (dependiente de la concentración) y también de la variable SR (dependiente de la temperatura, concentración y de la interacción entre ellas), presentándose además influencias individuales y/o combinadas que incluyen el efecto de la temperatura y la concentración sobre las restantes variables SG, WR y MR. El tipo de agente osmótico no fue una variable significativa sobre los parámetros estudiados.

Los datos experimentales de MR se ajustaron con los modelos de Newton, Page, Page Modificado, Henderson-Pabis, Logarítmico, Exponencial de dos términos, Wang-Singh, Verma y col., Henderson-Pabis modificado, Midilli y col. a fin de evaluar cuál de ellos puede representar de manera más adecuada la cinética de osmodeshidratación. Para ambas variedades el modelo de Page obtuvo el mejor ajuste.

Se estimaron los coeficientes de difusividad de agua resultando comprendidos en el rango de 4,29 x 10^{-10} a 9,12 x 10^{-10} m^2/s para *Granny Smith* y 3,92 x 10^{-10} a 1,24 x 10^{-9} m^2/s para *Red Delicious*, hallándose además efecto significativo de la concentración sobre este parámetro para ambas variedades de manzanas.

ABSTRACT

The objective of this work was to study the osmotic dehydration kinetic of apple cubes of *Red Delicious* and *Granny Smith* varieties. Sucrose and glucose solutions with concentrations of about 40% w/w and 60% w/w were employed, at temperatures of 25°C, 40°C and 60°C, using fruit/solution relation of 1/15, without stirring. Concentration of soluble solids, refracting index and moisture content were measured during the runs. Experimental curves water loss (WL), soluble solids gain (SG) and weight reduction (WR) against time were obtained.

Soluble solids increased from an initial value of 13°Brix to 35,8-58°Brix, moisture content reduced from 88,5% d.b. (dry basis) to values in the range 40-60% d.b.; WL, SG and WR increased with the process time, being water losses higher than soluble solids gains in all the cases.

Experimental results of WR, WL and SG, as soon as adimensional moisture content (MR) and adimensional soluble solids (SR) were evaluated by analysis of variance in order to determine the significant variables on the dehydration kinetics. For both varieties, similar effects on the main variable WL (dependent on the solution concentration) and on SR (dependent on temperature, concentration and temperature-concentration interaction) were observed, appearing also individual and/or combined influences on SG, WR and MR including temperature and concentration. The kind of osmotic agent was not a significant variable on the studied parameters.
Experimental data of MR were adjusted by the models of Newton, Page, Modified Page, Henderson-Pabis, Logarithmic, Exponential of Two Terms, Wang-Singh, Verma *y col.*, Modified Henderson-Pabis, Midilli *y col.* in order to evaluate which of them can accurately describe the osmo-dehydration kinetics. For both varieties Page model was the most appropriated.
Water diffusivity coefficients were estimated resulting in the range from 4,29 x 10^{-10} to 9,12 x 10^{-10} m^2/s for *Granny Smith* and 3,92 x 10^{-10} a 1,24 x 10^{-9} m^2/s for *Red Delicious*, finding additionally significant effect of the concentration on diffusivity coefficient for both varieties.

PALABRAS CLAVE: *Deshidratación osmótica, modelado matemático, coeficiente de difusión.*

KEYWORDS: *osmotic dehydration, mathematical models, effective diffusivity.*

INTRODUCCIÓN

La deshidratación osmótica (DO) consiste en la inmersión de alimentos sólidos como frutas y vegetales enteros o en trozos, en soluciones acuosas concentradas en solutos a un tiempo y temperaturas específicos para producir una eliminación parcial del agua de los alimentos (UNAL 2004). Debido a que las membranas de los alimentos son semipermeables esta técnica provoca tres mecanismos de transferencia simultáneos: un importante flujo de agua del interior de la fruta hacia el exterior, la entrada de soluto (aunque en menor cantidad) desde la parte externa hacia el interior del producto a deshidratar, y por último aunque casi insignificante, un flujo desde el interior hacia la solución que consiste en una mínima pérdida de solutos propios del alimento (azúcares, sales minerales, ácidos orgánicos y otros). La DO es un método que, reduce hasta un 80% del agua original de los alimentos y permite obtener productos de humedad intermedia; si bien el producto obtenido no es estable para su conservación, su composición química permite, después de un secado con aire caliente o mediante un proceso de congelación, obtener un producto final con una buena calidad organoléptica (UNAL 2004). Como consecuencia de este proceso el producto pierde agua (WL), gana sólidos solubles (SG) y reduce su peso (WR) (Spiazzi y Mascheroni 2001).
El objetivo de este trabajo es estudiar la cinética de deshidratación osmótica de manzanas bajo diferentes condiciones y el efecto del proceso sobre la calidad del deshidratado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de las muestras y diseño experimental

Las manzanas de las variedades *Granny Smith* y *Red Delicious* fueron cortadas en cubos de 1 cm de lado, estos se sumergieron en soluciones acuosas de sacarosa y glucosa de concentraciones 40% p/p y 60% p/p empleando vasos de precipitado de 2000 mL durante 9 h a temperaturas de 25°C, 40°C y 60°C, empleando una relación fruta:jarabe de 1:15, por duplicado. El sistema no se agitó.
A intervalos regulares predefinidos (0, 15, 30, 45, 105, 165, 225, 285, 345, 465 y 540 minutos) las muestras fueron extraídas, escurridas sobre papel absorbente y evaluadas en concentración de sólidos solubles, índice de refracción y contenido de humedad. En total se realizaran 24 ensayos con dos repeticiones**.**

Métodos de análisis

El contenido de humedad (M) se determinó por duplicado (AOAC 22.013 1980) y se expresó en forma porcentual en base húmeda (% b.h.), mientras que el contenido de sólidos solubles (SS, ºBrix) y el índice de refracción se determinaron por duplicado con un refractómetro Abbe (precisión ± 0,05%).

Análisis estadístico

Se empleó el software Systat (Wikinson, 1990) para evaluar mediante Anova (análisis de varianza) el efecto de las condiciones experimentales (tipo de agente osmótico, concentración, temperatura) sobre

la cinética de deshidratación, con un nivel de confianza del 95%. Usando el módulo NonLin de Systat se realizó el ajuste de regresión de mínimos cuadrados de los datos experimentales mediante diversos modelos matemáticos (Newton, Page, Page Modificado, Henderson-Pabis, Logarítmico, Exponencial de dos términos, Wang-Singh, Verma y col., Henderson-Pabis modificado, Midilli y col.) a fin de determinar el que brinda una descripción más exacta de los resultados. La bondad de ajuste fue cuantificada con los criterios estadísticos coeficiente de correlación R^2, error de la estimación Sy, desviación media relativa estándar p y gráficos de residuos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cálculos cinéticos

El estudio de la cinética de deshidratación osmótica se llevó a cabo mediante el análisis de la pérdida de agua (WL), la ganancia de sólidos solubles (SG) y la reducción de peso (WR) en el tiempo, variables que fueron determinadas mediante las siguientes expresiones (Paulo *et al.* 2006):

$$WL= [(1 – TS°/100) - (1 – TS_{DO}/100) (1 – WR_{DO}/100)] \times 100 \quad (1)$$

$$SG= [(1 – WR_{DO}/100) TS_{DO}/100 – TS°/100] \times 100 \quad (2)$$

$$WR=WL-SG \quad (3)$$

donde TS° es el porcentaje de sólidos totales presentes inicialmente en la muestra (determinado a partir del contenido de humedad inicial porcentual Mo como 100-Mo), TS_{DO} es el porcentaje de sólidos que se obtiene en la muestra al tiempo t (determinado por refractometría como °Brix) y WR_{DO} se refiere a la pérdida de peso porcentual durante la deshidratación osmótica (determinada por diferencia de peso entre la muestra inicial y la muestra a tiempo t). La Ec. (3) se utilizó para chequeo de los resultados experimentales.

Además, se evaluaron otras dos variables adimensionales: la humedad adimensional MR=M/Mo y el contenido de sólidos solubles adimensional SR=SS/Sso (donde SSo son los °Brix de la muestra a tiempo cero).

Evolución del contenido de sólidos solubles

Para las dos variedades y todas las condiciones experimentales, el contenido de sólidos solubles (°Brix) aumentó con el tiempo de tratamiento, pasando de un nivel inicial de 13°Brix a valores finales comprendidos entre 35,5 y 58°Brix.

Además, para todas las temperaturas de trabajo, se obtuvo mayor incremento en el contenido de sólidos solubles cuando se emplearon soluciones más concentradas, siendo los °Brix obtenidos al final de la DO en soluciones al 60% p/p entre un 20 y un 30% superiores a los obtenidos a la concentración del 40% p/p.

Respecto del tipo de agente osmótico, las curvas de sacarosa (SAC) y glucosa (GLU) a iguales concentraciones presentaron similar comportamiento en el tiempo apareciendo prácticamente superpuestas para las dos variedades a todas las temperaturas. Esto significaría que ambos agentes producen el mismo cambio en los °Brix del producto.

Por otro lado, se observó que en todos los casos en los primeros minutos de la deshidratación se alcanzó un estado de pseudoequilibrio evidenciándose una tendencia a ganar sólidos solubles rápidamente, en especial más notoriamente a la concentración del 60% p/p, probablemente debido a la rápida acción de los mecanismos hidrodinámicos que provoca una acelerada incorporación inicial de solución osmótica por capilaridad o por los cambios impuestos en la fuerza impulsora; no obstante a partir de los 15 min. Todas las curvas tendieron a ganar sólidos gradualmente a través del tiempo de deshidratación.

A modo de ejemplo, en la **Figura 1** se puede observar la evolución del contenido de sólidos solubles para las muestras de la variedad *Granny Smith* durante la deshidratación osmótica a 40°C empleando soluciones de sacarosa (SAC) y glucosa (GLU) al 40 y al 60% p/p. El resto de las curvas tuvieron comportamientos similares.

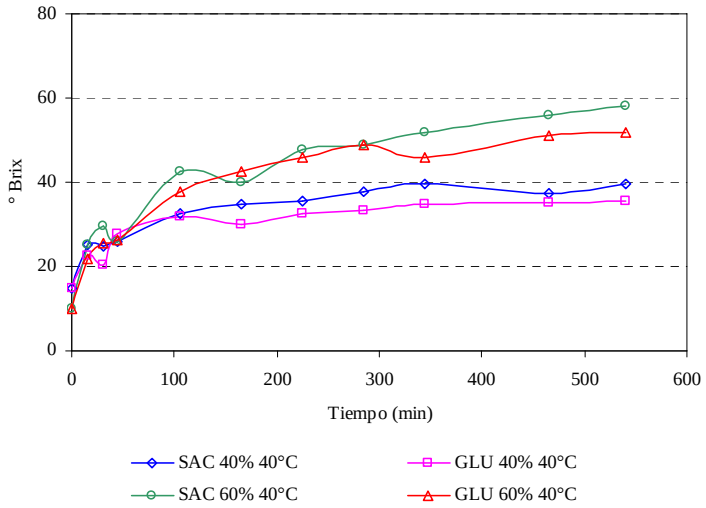


Figura 1. Evolución del contenido de sólidos solubles (°Brix) en los cubos de manzanas de la variedad *Granny Smith* a la temperatura de 40°C durante la deshidratación osmótica en soluciones de sacarosa (SAC) y glucosa (GLU) a las concentraciones del 40 y 60% p/p.

Evolución de la pérdida de agua (WL), ganancia de sólidos solubles (SG) y pérdida de peso (WR)

Para analizar los efectos de las diferentes variables sobre el proceso de osmodeshidratación se construyeron gráficos para evaluar la evolución de WL, SG y WR en el tiempo.

La **Figura 2** muestra que la pérdida de agua y la ganancia de sólidos aumentan en el tiempo, alcanzando la WL de *Granny Smith* al final de la DO entre el 20 y el 40%, SG entre un 12 y un 19%, para ambos agentes osmóticos. Para *Red Delicious* se observaron en general mayores pérdidas de agua y ganancias de sólidos (WL entre 12 y 46% y SG entre 9 y 48%).

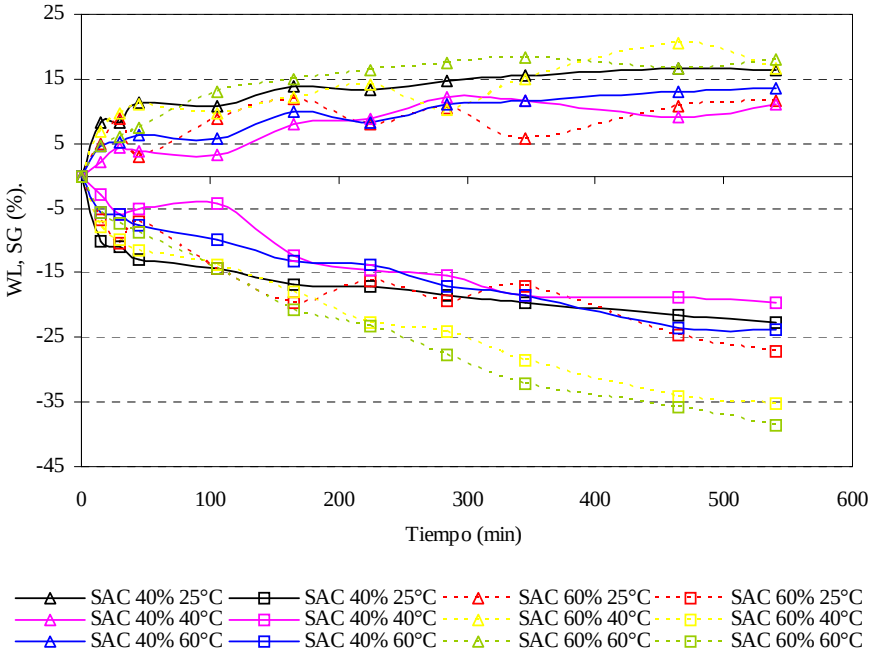


Figura 2. Evolución de la pérdida de agua WL (□) y de la ganancia de sólidos solubles SG (Δ) en manzanas *Granny Smith* a las temperaturas de 25, 40 y 60 °C durante la deshidratación osmótica en soluciones de sacarosa (SAC) a las concentraciones del 40 y 60% p/p.

Es importante destacar que en todos los ensayos resultó mayor la pérdida de agua que la ganancia de sólidos.
Por otro lado, para ambas variedades y agentes osmóticos, la mayor pérdida de agua y ganancia de sólidos al final de la DO se obtuvo a la mayor concentración (60% p/p) y temperatura (60°C). Esto significa que la temperatura y la concentración tienen relación directa con WL y SG.
Respecto de la pérdida de peso, para todas las condiciones se pudo observar un aumento de WR en el tiempo de tratamiento, es decir que durante la deshidratación osmótica la fruta tiene un flujo neto negativo que le hace reducir su peso. A modo de ejemplo, en la **Figura 3** se muestra la pérdida de peso porcentual de los cubos de manzana de la variedad *Granny Smith*, la cual al final de la DO estuvo comprendida entre el 10 y el 70%, correspondiendo el menor valor a las soluciones sacarosa al 40% p/p a las tres temperaturas. Para *Red Delicious*, la variación de WR a tiempo final de proceso estuvo en un rango similar a la *Granny Smith* (entre 15 y 70%).

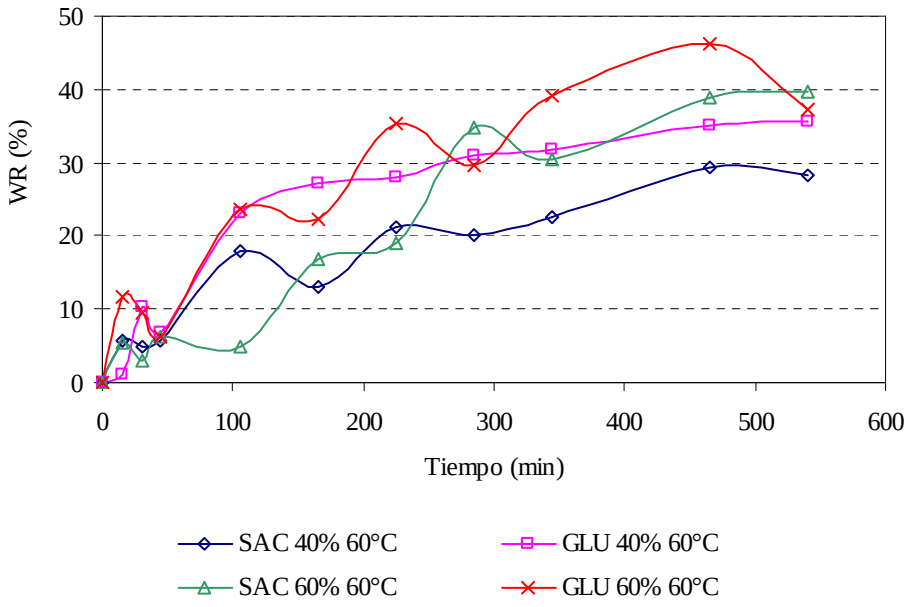


Figura 3. Evolución de la pérdida de peso (WR) en los cubos de manzanas de la variedad *Granny Smith* a la temperatura de 60°C durante la deshidratación osmótica en soluciones de sacarosa (SAC) a las concentraciones del 40 y 60% p/p.

Por otro lado, la temperatura afectó la evolución de la pérdida de peso: a mayor temperatura se obtuvo mayor pérdida de peso. Por ejemplo, para *Granny Smith* en solución de sacarosa al 60% p/p a 25°C se alcanzó una reducción de peso de final de 33,5%, mientras que a 60°C la pérdida de peso fue del 37%; en *Red Delicious* el comportamiento fue similar a la *Granny* hasta los 40°C, pero a mayor temperatura se observó una reducción menos significativa.
En cuanto al comportamiento de los agentes osmóticos bajo las mismas condiciones de temperatura y concentración, en la mayoría de los casos se observó que la sacarosa al 40% p/p produce menor pérdida de peso que la glucosa (aproximadamente entre un 10 y un 20% menos).
Para cuantificar el efecto de las condiciones experimentales (tipo de agente osmótico, concentración y temperatura) sobre las variables WL, SG, WR, MR y SR a lo largo del proceso de deshidratación, se llevó a cabo el análisis de la varianza (Anova) considerando tres tiempos de ósmosis: 283, 485 y 540 minutos. En líneas generales, para las dos variedades se observaron los mismos efectos a lo largo del proceso en cuanto al comportamiento de las variables WL (dependiente de la concentración) y SR (dependiente de la temperatura, de la concentración y de su interacción), presentándose además influencias individuales y/o combinadas que incluyen la temperatura y la concentración sobre las restantes variables SG, WR y MR. Cabe destacar que el tipo de agente osmótico no fue una variable significativa sobre las variables estudiadas a lo largo del proceso.

Modelado matemático

Sobre la base del análisis de la varianza, se procedió a estudiar el modelado matemático de las curvas experimentales sin discriminar por tipo de agente osmótico, para predecir el comportamiento de la variable fundamental de la deshidratación osmótica que es la humedad adimensional MR. Para la variedad *Granny Smith* los mejores ajustes se obtuvieron con los modelos de Page, Wang-Singh, Exponencial de dos Términos y Henderson-Pabis, mientras que para la variedad *Red Delicious* los modelos más apropiados fueron los de Page, Page Modificado y Wang-Singh (**Tabla 1**).

Tabla 1: Ajuste de datos experimentales de deshidratación osmótica de cubos de manzanas mediante modelos matemáticos.

Granny Smith						*Red Delicious*					
% p/p	°C	R^2	Sy	p	residuos	% p/p	°C	R^2	Sy	p	residuos
Newton: $MR = \exp(-k\,t)$											
40	25	0,9924	0,074	0,075	patrón	40	25	0,9874	0,100	0,078	patrón
60	25	0,9950	0,060	0,059	random	60	25	0,6862	1,153	0,804	patrón
40	40	0,9961	0,056	0,054	random	40	40	0,9965	0,052	0,051	random
60	40	0,9952	0,056	0,059	patrón	60	40	0,9733	0,124	0,149	random
40	60	0,9951	0,060	0,059	random	40	60	0,9980	0,040	0,039	random
60	60	0,9966	0,047	0,055	patrón	60	60	0,9842	0,091	0,114	patrón
Page: $MR = \exp(-k\,t^n)$											
40	25	0,9997	0,014	0,015	patrón	40	25	0,9915	0,084	0,063	patrón
60	25	0,9983	0,036	0,036	random	60	25	0,7133	1,129	0,8961	patrón
40	40	0,9975	0,046	0,033	random	40	40	0,9994	0,022	0,022	patrón
60	40	0,9991	0,024	0,027	patrón	60	40	0,9900	0,078	0,096	patrón
40	60	0,9988	0,030	0,031	random	40	60	0,9993	0,024	0,022	patrón
60	60	0,9992	0,024	0,024	patrón	60	60	0,9983	0,030	0,036	patrón
Page Modificado: $MR = \exp(-k\,t)^n$											
40	25	0,9924	0,076	0,075	patrón	40	25	0,9874	0,102	0,079	patrón
60	25	0,9950	0,062	0,059	random	60	25	0,6862	1,181	0,804	patrón
40	40	0,9961	0,057	0,054	random	40	40	0,9965	0,054	0,051	random
60	40	0,9629	0,159	0,197	patrón	60	40	0,9733	0,128	0,149	patrón
40	60	0,9951	0,061	0,059	random	40	60	0,9980	0,041	0,039	random
60	60	0,9966	0,048	0,055	patrón	60	60	0,9842	0,093	0,114	patrón
; Wang y Singh: $MR = 1 + (a\,t) + (b\,t^2)$											
40	25	0,9961	0,055	0,049	patrón	40	25	0,9890	0,096	0,074	patrón
60	25	0,9965	0,051	0,051	random	60	25	0,7140	1,128	0,886	patrón
40	40	0,9971	0,049	0,038	random	40	40	0,9982	0,039	0,037	random
60	40	0,9970	0,045	0,044	patrón	60	40	0,9813	0,107	0,125	patrón
40	60	0,9971	0,047	0,043	random	40	60	0,9988	0,033	0,032	random
60	60	0,9983	0,035	0,033	patrón	60	60	0,9921	0,065	0,069	patrón
Exponencial de dos términos: $MR = a\exp(-k\,t) + b\exp(-k_L\,t)$											
40	25	0,9987	0,033	0,029	patrón	40	25	0,9906	0,093	0,066	patrón
60	25	0,9979	0,041	0,042	random	60	25	0,7053	1,207	0,913	patrón
40	40	0,9975	0,048	0,036	random	40	40	0,9990	0,030	0,027	random
60	40	0,9987	0,032	0,034	patrón	60	40	0,9877	0,091	0,107	patrón
40	60	0,9984	0,037	0,036	random	40	60	0,9991	0,028	0,026	random
60	60	0,9990	0,026	0,026	patrón	60	60	0,9971	0,142	0,041	random
Verma y col..: $MR = a\exp(-k\,t) + (1-a)\exp(-g\,t)$											
40	25	0,9925	0,078	0,075	patrón	40	25	0.1201	0.878	0.909	patrón
60	25	0,9984	0,035	0,035	patrón	60	25	0,0220	2,139	0,909	patrón
40	40	0,9976	0,046	0,034	patrón	40	40	0,1225	0,868	0,909	patrón
60	40	0,9993	0,022	0,025	patrón	60	40	0,1641	0,732	0,909	patrón
40	60	0,9952	0,062	0,058	patrón	40	60	0,1173	0,732	0,909	patrón
60	60	0,9990	0,027	0,029	patrón	60	60	0,1813	0,689	0,909	patrón
Henderson Pabis: $MR = a\exp(-k\,t)$											
40	25	0,9979	0,040	0,032	patrón	40	25	0,9905	0,089	0,065	patrón
60	25	0,9976	0,042	0,043	random	60	25	0,7053	1,145	0,913	patrón

40	40	0,9972	0,048	0,042	random	40	40	0,9985	0,035	0,030	random
60	40	0,9983	0,035	0,034	patrón	60	40	0,9852	0,095	0,110	patrón
40	60	0,9980	0,040	0,038	random	40	60	0,9989	0,030	0,029	random
60	60	0,9984	0,033	0,035	patrón	60	60	0,9936	0,059	0,069	random
Henderson- Pabis Modificado: $MR = a\exp(-k\,t) + b\exp(-g\,t) + c\exp(-h\,t)$											
40	25	0,9997	0,017	0,015	random	40	25	0,9892	0,106	0,073	patrón
60	25	0,9984	0,039	0,035	random	60	25	0,4081	1,274	0,937	patrón
40	40	0,9974	0,052	0,038	random	40	40	0,9993	0,026	0,026	random
60	40	0,9181	0,263	0,167	patrón	60	40	0,9899	0,088	0,096	patrón
40	60	0,9943	0,073	0,049	random	40	60	0,9982	0,043	0,032	random
60	60	0,9990	0,028	0,026	patrón	60	60	0,9716	0,140	0,079	patrón
Midilli et al.: $MR = a\exp(-k\,t^n) + b\,t$											
40	25	0,9923	0,081	0,047	patrón	40	25	0,9830	0,125	0,082	patrón
60	25	0,9984	0,037	0,035	random	60	25	0,7102	1,197	0,900	patrón
40	40	0,9975	0,048	0,035	random	40	40	0,9936	0,076	0,047	patrón
60	40	0,9076	0,264	0,247	patrón	60	40	0,9900	0,082	0,096	patrón
40	60	0,9919	0,083	0,053	random	40	60	0,9993	0,026	0,022	random
60	60	0,9860	0,102	0,069	patrón	60	60	0,9831	0,101	0,092	patrón
Logarítmico: $MR = a\exp(-k\,t) + c$											
40	25	0,9970	0,045	0,034	patrón	40	25	0,9904	0,092	0,065	patrón
60	25	0,9896	0,091	0,048	patrón	60	25	0,7073	1,170	0,911	patrón
40	40	0,9915	0,086	0,076	patrón	40	40	0,9991	0,028	0,027	random
60	40	0,9963	0,051	0,048	patrón	60	40	0,9825	0,106	0,115	patrón
40	60	0,9984	0,036	0,036	random	40	60	0,9991	0,028	0,061	random
60	60	0,9974	0,043	0,045	patrón	60	60	0,9908	0,073	0,082	patrón

A modo de ejemplo, en la **Figura 4** se puede observar el grado de concordancia entre los resultados experimentales y los valores estimados por los modelos para la variedad *Red Delicious*. Para el resto de las condiciones experimentales se obtuvieron gráficas similares.

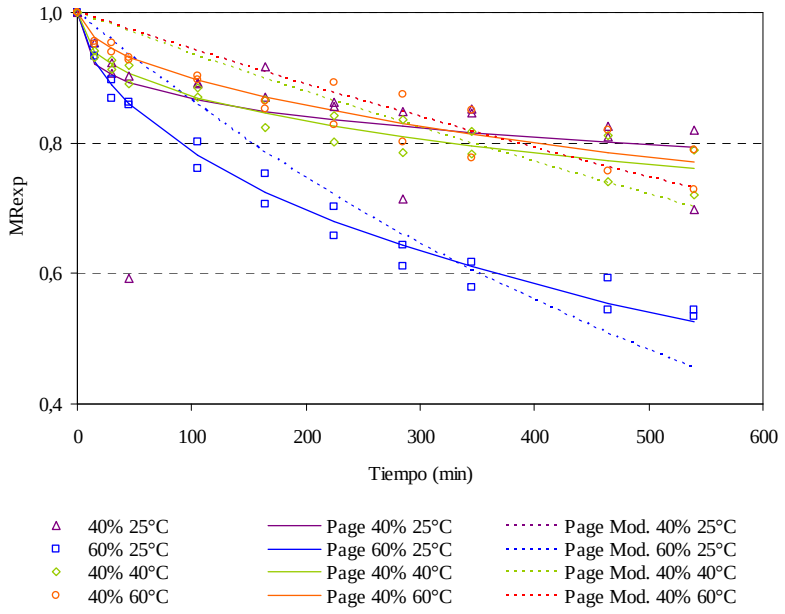


Figura 4. Datos experimentales (puntos) de humedad adimensional (MRexp) y valores predichos por los modelos de Page (líneas continuas) y de Page Modificado (líneas de trazos) para la variedad *Red Delicious* deshidratada en soluciones de azucaradas (glucosa o sacarosa) a distintas concentraciones y distintas temperaturas.

Coeficiente de difusión de agua

Sobre la base del ajuste estadístico del modelo de Newton se estimó el coeficiente de difusión de agua de las muestras deshidratadas bajo distintas condiciones de proceso (suponiendo que los cubos de

manzanas se comportan como una lámina infinita) a partir de la siguiente ecuación (Vega-Gálvez *et al.* 2007):

$$k = \left(\frac{3{,}1416}{2L}\right)^2 D_{ef} \qquad (4)$$

donde k es la constante del modelo de Newton, para las condiciones de proceso, L es la longitud característica de los cubos de manzanas y D_{ef}: es el coeficiente de difusión.
Los coeficientes de difusión de agua obtenidos para las manzanas, tal como se muestra en la **Tabla 2**, estuvieron comprendidos en el rango de 4,29 x 10^{-10} a 9,12 x 10^{-10} m^2/s para la variedad *Granny Smith*, siendo superior el obtenido a la temperatura de 60°C y concentración del 60% p/p. Para la variedad *Red Delicious* los coeficientes de difusión fueron de 3,92 x 10^{-12} a 1,24 x 10^{-11} m^2/s, resultando también superior el de la temperatura de 60°C y concentración del 60% p/p. Resultados similares para la difusividad de agua en manzanas en rangos de temperatura y concentración similares (20-50°C y 40-60 % p/p) han sido informados por otros autores como Ochoa Martínez y Ayala Aponte (2005) (3,32 x 10^{-11} a 2,13 x 10^{-10} m^2/s).

Tabla 2: Coeficientes de difusión de agua para manzanas de las variedades *Granny Smith* y *Red Delicious* durante la deshidratación osmótica a distintas concentraciones y temperaturas.

Parámetros		Constante del modelo de Newton (s^{-1})		Coeficiente de difusión de agua (m^2/s)	
% p/p	°C	*Granny Smith*	*Red Delicious*	*Granny Smith*	*Red Delicious*
40	25	1,25 x 10^{-6}	9,68 x 10^{-6}	5,06 x 10^{-11}	3,92 x 10^{-10}
40	40	1,06 x 10^{-6}	1,08 x 10^{-5}	4,29 x 10^{-11}	4,38 x 10^{-10}
40	60	1,36 x 10^{-6}	9,71 x 10^{-6}	5,51 x 10^{-11}	3,93 x 10^{-10}
60	25	1,48 x 10^{-6}	2,73 x 10^{-5}	5,99 x 10^{-11}	1,11 x 10^{-9}
60	40	2,03 x 10^{-6}	2,34 x 10^{-5}	8,23 x 10^{-11}	9,48 x 10^{-10}
60	60	2,25 x 10^{-6}	3,07 x 10^{-5}	9,12 x 10^{-11}	1,24 x 10^{-9}

En la **Figura 5** se muestra la relación entre los coeficientes de difusión a distintas concentraciones y la temperatura del baño osmótico para las dos variedades de manzanas estudiadas; puede notarse que ambas variedades la difusividad aumenta con la concentración de la solución, mientras que no se presenta una clara dependencia con la temperatura del baño osmótico. Este resultado fue corroborado a través de un análisis de varianza. Coincidentemente, Schwartz *y col.* (1999) informaron que la difusividad efectiva de cubos de manzana (rango 3,36 x 10^{-10} a 7,92 x 10^{-10} m^2/s) aumenta con la temperatura y con la concentración de agente osmótico.

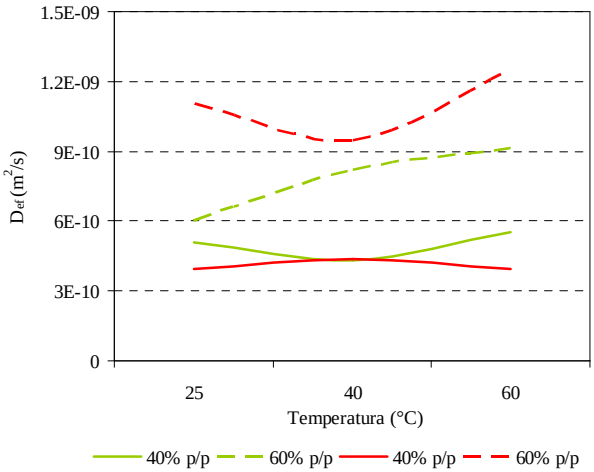


Figura 5. Coeficientes de difusión de agua de manzanas de las variedades *Granny Smith* (líneas verdes) y *Red Delicious* (líneas rojas) para la deshidratación osmótica en soluciones azucaradas de sacarosa o glucosa a distintas concentraciones en función de la temperatura.

CONCLUSIONES

Durante la deshidratación osmótica de las dos variedades de manzanas, la pérdida de agua WL, la ganancia de sólidos SG y la reducción de peso WR aumentan con el tiempo. El mayor grado de deshidratación se consigue trabajando con solución concentrada (60% p/p) independientemente del tipo de agente osmótico a la mayor temperatura (60°C).

Para las dos variedades en todas las condiciones ensayadas se observó que en los primeros 15 minutos de la deshidratación hay una marcada tendencia inicial a perder humedad y ganar sólidos solubles rápidamente, pasando de los niveles iniciales de 13°Brix y 88,5% b.h. a valores en los rangos 35,5-58°Brix y 40-60% b.h. y tendiendo luego todas las curvas a perder agua y ganar sólidos gradualmente a través del tiempo.

En todos casos resultó mayor la pérdida de agua que la ganancia de sólidos, con lo cual la pérdida de peso WR fue positiva durante el tratamiento rondando entre el 10 y el 70%.

Para las dos variedades se observó que la concentración afecta a la variable principal para la deshidratación osmótica WL, y a las variables SR y WR. Adicionalmente estas últimas resultaron directamente dependientes de la temperatura y/o de la interacción temperatura-concentración. El agente osmótico no fue una variable significativa en la cinética del proceso.

Los modelos de Page y Wang-Singh resultaron ser útiles para describir la humedad adimensional MR de ambas variedades de manzanas durante la deshidratación osmótica; siendo el modelo Page el que obtuvo la mejor calidad de ajuste para cada uno de los ensayos realizados.

No se observó efecto significativo de la temperatura sobre los coeficientes de difusión de agua, pero sí una influencia significativa de la concentración sobre este parámetro en ambas variedades.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC. 1980. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists. 13th Ed. Published by the A.O.A.C. Washington D.C., USA.

Mengues HO, Ertekin C. 2006. Mathematical modeling of thin drying of golden apples. Journal of food Engineering, 69: 307-316.

Ochoa Martínez CI, Ayala Aponte A. 2005. Modelos matemáticos de transferencia de masa en deshidratación osmótica. Ciencia y Tecnología Alimentaria, 5(4): 330-342.

Paulo C, Pagano AM, Mascheroni RH. 2006. Estudio del secado convectivo de manzanas *Granny Smith* bajo geometría cúbica. IX Congreso Argentino de Ingeniería Rural y I del MERCOSUR "La ingeniería rural y el cambio climático", 19-22 de septiembre de 2007, Córdoba, Argentina.

Spiazzi EA y Mascheroni RH. 2001. Modelo de deshidratación osmótica de alimentos vegetales. MAT – Serie A, 4: 23-32.

Schwartz M, Del Valle JM, Aguilera JM, Sepúlveda M.1999. Conservación de frutas y hortalizas por métodos combinados. www.uchile.cl/facultades/cs_agronomicas/agroindustria/proyhort6.htm. Acceso: 08/03/08.

UNAL. 2004. Universidad Nacional de Colombia. Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA). Fundamentos de la osmodeshidratación directa. www.unal.edu.co/icta, Acceso: 21/04/08.

Vega-Gálvez A, Palacios M, Boglio F, Pássaro C, Jeréz C, Lemus-Mondaca R. 2007. Deshidratación osmótica de la papaya chilena (*Vasconcellea pubescens*) e influencia de la temperatura y concentración de la solución sobre la cinética de transferencia de materia. Ciencia y Tecnología Alimentaria, 27(3) Campinas July/Sept.

Wilkinson L. 1990. SYSTAT: The System for Statistics. SYSTAT Inc., Evanston IL, USA.

Effect of visible light treatments on postharvest senescence of broccoli (*Brassica oleracea* L.)

Efecto del tratamiento con luz visible sobre la senescencia post-cosecha del brócoli (*Brassica oleracea* L.)

Büchert AM, Gómez Lobato ME, Villarreal NM, Civello PM, Martínez GA.

Instituto de Investigaciones Biotecnológicas-Instituto Tecnológico de Chascomús (IIB-INTECH) UNSAM-CONICET. Camino Circunvalación Laguna Km 6. Chascomús (B7130IWA). Buenos Aires, Argentina. abuchert@intech.gov.ar.

ABSTRACT

Broccoli (*Brassica oleracea* L.) is a vegetable cultivated for its inflorescences, which are harvested and commercialized while still immature, prior to sepal opening. Harvesting causes severe stress conditions, water and nutrient deficiency and changes in hormone content. As a consequence, an early senescence is initiated, accelerating such process in a significant way. This induces a loss of the superficial green color of the vegetable, which diminishes the commercial acceptance of the product. In this work the effect of visible light treatments on broccoli postharvest senescence were evaluated. Different light intensities were assayed, as well as exposition to continuous and periodic light. In all cases the progress of senescence was evaluated by measuring changes in superficial color. A delay in senescence was observed in all assay conditions, being continuous exposure to a light dose of 25 µmol $\cdot$ m^{-2} $\cdot$ s^{-1} the one displaying the greater delay in the loss of green color of the broccoli florets. Comparing Hue (°) values at the end of the treatment with the initial values, florets exposed to continuous light decreased by 19 % while controls stored in darkness decreased by 28%. Consequently, samples treated under these conditions were employed in subsequent assays to determine other senescence-associated parameters. A decrease in chlorophyll content was observed in broccoli florets exposed to continuous light, as well as lower total and soluble protein content, both with higher values at the end of the experiment in broccoli florets exposed to light in comparison to controls. Another parameter assayed was total and reducing sugar content, and we observed a decrease over the course of senescence, showing an evident delay in material subject to light exposure. Results suggest that storage under continuous low intensity light allows to delay senescence and to improve the quality of harvested broccoli.

RESUMEN

El brócoli (*Brassica oleracea* L.) es una hortaliza de la cual se cosechan y comercializan sus inflorescencias inmaduras, anterior a la apertura de los sépalos. La cosecha provoca severas condiciones de estrés y deficiencia de agua y nutrientes, así como cambios en el contenido de hormonas. Como consecuencia, se produce un inicio prematuro de la senescencia, acelerándose significativamente dicho proceso. Esto provoca una pérdida del color verde superficial del vegetal, lo cual disminuye la aceptación comercial del producto. En este trabajo se evaluaron los efectos del tratamiento con exposición a luz visible sobre la senescencia poscosecha de brócoli. Se ensayaron diferentes intensidades, así como la exposición a luz continua y a fotoperíodo. En todos los casos se evaluó el progreso de la senescencia mediante la medida de los cambios en el color superficial. Se observó un retraso en la senescencia con todas las condiciones ensayadas, siendo la exposición continua a una dosis lumínica de 25 µmol $\cdot$ m^{-2} $\cdot$ s^{-1} en la que se observó un mayor retraso en la pérdida del color verde de las cabezas de brócoli. Comparando los valores de Hue (°) al final del tratamiento con respecto al valor inicial, las cabezas sometidas a dicha dosis de luz continua disminuyeron un 19 % mientras que los controles en oscuridad disminuyeron un 28 %. Consecuentemente se utilizó el material tratado con estas condiciones para evaluar otros parámetros asociados a la senescencia. Se observó un descenso en el contenido de clorofilas a través de los días, el cual se vio disminuido en las cabezas de brócoli expuestas a la luz continua. También se determinó una disminución en el contenido de proteínas solubles, con valores mayores al final del tratamiento en los brócolis expuestos a luz continua en comparación con los controles. Otro de los parámetros que se determinó es el contenido de

azúcares totales, observándose una disminución a lo largo de la senescencia, con un retraso evidente en el material sometido al tratamiento con luz. Los resultados indican que el almacenamiento bajo luz continua de baja intensidad permite retrasar la senescencia y mejorar la calidad poscosecha del brócoli.

KEYWORDS: *broccoli, postharvest, senescence, light.*

PALABRAS CLAVE: *brócoli, poscosecha, senescencia, luz.*

INTRODUCTION

Broccoli florets (*Brassica oleracea* L.) have high nutritional importance due to its high vitamin content, as well as abundance of anticarcinogenic and antioxidant compounds. This vegetable shows a short postharvest shelf life since it is harvested while its inflorescences are still immature, previous to sepal opening, which implies water loss and variations in nutrient and hormone content. Harvesting and handling cause severe stress conditions, inducing an early onset of senescence, accelerating such process significantly. As a consequence, a loss of the superficial green color of the product is observed, which decreases the commercial approval of the broccoli florets. Several different techniques have been applied in order to delay the emergence of postharvest senescence symptoms in broccoli, including refrigeration, modified atmospheres, thermal shock treatments and different types of packaging, among others (King and Morris 1994, Page et al 2001). Light is one of the most crucial factors involved in plant growth and development, and the role of light in the regulation of plant pigment accumulation during tomato fruit ripening as well as in degradation processes during senescence have been studied (Giovannoni 2001, Toledo et al 2003, Noichinda et al 2007). Previous studies in Arabidopsis have demonstrated up-regulation of the ethylene biosynthetic genes in darkness (Wang et al., 2001). However, there is scarce information regarding the effect of direct light exposure on green tissue senescence. In our work the effect of different exposures to continuous and periodic visible low intensity light on broccoli postharvest senescence was assayed employing different parameters of postharvest quality.

MATHERIALS AND METHODS

Plant material

Broccoli (*Brassica oleracea* var. Iron) heads were obtained from a local producer in Buenos Aires, Argentina, and processed immediately. Heads were defoliated and placed in plastic cups containing a small amount of distilled water to prevent dehydration. After treatments, broccoli heads were segmented and the inflorescences were frozen using liquid nitrogen and stored at -20 °C.

Continuous and periodic light treatments

Broccoli heads were placed in a well ventilated chamber isolated from external light sources at 22 °C. One half of the chamber was kept in complete dark (<1 µmol m^{-2} s^{-1}) and the other half was exposed to different continuous as well as periodic light intensities. Assayed continuous light intensities were 12, 25 and 50 µmol m^{-2} s^{-1} and the photoperiod employed was 16 h light / 8 h dark using 25 µmol m^{-2} s^{-1} light. Heads were stored during five days. Samples were collected daily and immediately processed to measure superficial color or frozen in liquid nitrogen and stored at −20 ◦C until analysis.

Superficial color measurement

The superficial color of the broccoli heads was determined measuring the parameters *L**, *a** and *b** using a chromameter (CR300, Minolta, Osaka, Japan). The *hue* angle was calculated as $h° = \tan^{-1} (b/a)$, when $a > 0$ and $b > 0$ or as $h° = 180° + \tan^{-1} (b/a)$, when $a < 0$ and $b > 0$. Five positions of each broccoli head were measured.

Chlorophyll content

Frozen broccoli florets were ground in liquid nitrogen and 0.5 g of the resulting powder was mixed with 5 ml 80 % (v/v) acetone and centrifuged at 10 000 *x*g for 10 min at 4 °C. The chlorophyll content was measured in the supernatant according to (Inskeep and Bloom 1985) and results were expressed as mg total chlorophyll per g fresh weight tissue. All measurements were performed by triplicate.

Total and soluble protein content

For soluble protein content measurement, frozen broccoli florets were ground in liquid nitrogen and 0.5 g of the resulting powder was mixed with 5 ml of a buffer solution containing 50 mM Tris-HCl, 0.04 % (v/v) β-mercaptoethanol, 2 mM EDTA (pH 7.5). The mixture was centrifuged at 10 000 *x*g for 10 min at 4 °C and the soluble protein content was determined in the supernatant according to Bradford (1976), using bovine serum albumin (Sigma) as standard. For total protein content measurement, 0.3 g of frozen broccoli powder was homogenized with 10 ml of 0.1 M NaOH, 1 % (w/v) SDS and heated at 100 °C for 10 min. Samples were centrifuged at 10 000 *x* g for 20 min at 4 °C. In order to precipitate proteins, 5 volumes of 100 % (v/v) acetone was added to the supernatant and incubated at -20 °C for 12 h, following centrifugation at 13 000 *x* g for 10 min at 4 °C. The precipitate obtained was resuspended in 0.2 ml 0.1 M NaOH, 1 % (w/v) SDS and protein content was measured according to Lowry et al (1951), using bovine serum albumin (Sigma) as standard. All measurements were performed by triplicate and soluble as well as total protein content was expressed as mg protein per g fresh weight tissue.

Total and reducing sugar content

Frozen broccoli florets were ground in liquid nitrogen and 1 g of the resulting powder was suspended with 6 mL of ethanol. The mixture was centrifuged at 9 000 *x* g for 10 min at 4 °C, and 1 mL of the supernatant was raised to 5 mL using distilled water. The content of reducing sugars was determined spectrophotometrically at 540 nm using a modification of the Somogyi-Nelson method (Southgate 1976). For total sugar determination, 0.1 mL of ethanol extract was mixed with 1 mL of 0.2 % (w/v) anthrone in 72 % (v/v) H_2SO_4. The mixture was incubated at 100 °C for 12 min, cooled in a water bath, and the sugar content was measured spectrophotometrically at 625 nm. Measurements were performed by triplicate and results were expressed as g of glucose per kg of fresh weight tissue.

RESULTS AND DISCUSSION

Effect of periodic and continuous light treatment

Detached broccoli heads were stored under different intensities of continuous light. In order to follow the course of post-harvest senescence, the superficial color of the samples was determined on a daily basis. As seen of **Figure 1**, a decrease of the *hue* (°) value was observed over time, corresponding to the loss of green color, showing a loss of approximately 25 % during the time course observed. The decrease in *hue* (°) was correlated with an increase in *L** values (data not shown), which also indicates the intensive degreening and yellowing which undergoes in postharvest broccoli, as an effect of the degradation of chlorophylls (Yamauchi et al 1997). In all light intensities employed, the continuous light treatment delayed the loss of green color in comparison with controls, which were kept in complete darkness at all times. Treated samples showed *hue* (°) values approximately 15 % higher than controls at the end of the experiment, and slight differences were observed between the different light intensities employed. Light is known to have an important role in the regulation of plant pigment accumulation during fruit ripening (Giovannoni 2001), and previous reports in Arabidopsis have suggested an up-regulation of the ethylene biosynthesis pathway genes in darkness (Wang et al 2001). The effect of periodic light exposure was analyzed in samples stored under a 16 h light / 8 h dark photoperiod, and the difference in superficial color between treated and control broccoli heads was approximately 5 % (**Figure 1D**), showing the existence of a delaying effect of light during induced senescence, but to a lesser extent than the continuous light treatment. Given these results, the samples treated with a light dose of 12 $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$ (**Figure 1A**) were employed for subsequent experiments.

Chlorophyll content

The level of chlorophylls was determined in processed broccoli florets as a senescence parameter, and a constant decrease was found in treated as well as in control samples, indicating an intense degradation during postharvest senescence. In the case of florets exposed to continuous light, a delay in chlorophyll degradation was found, with values approximately 40 % higher compared to controls at the end of the experiment (**Figure 2**).

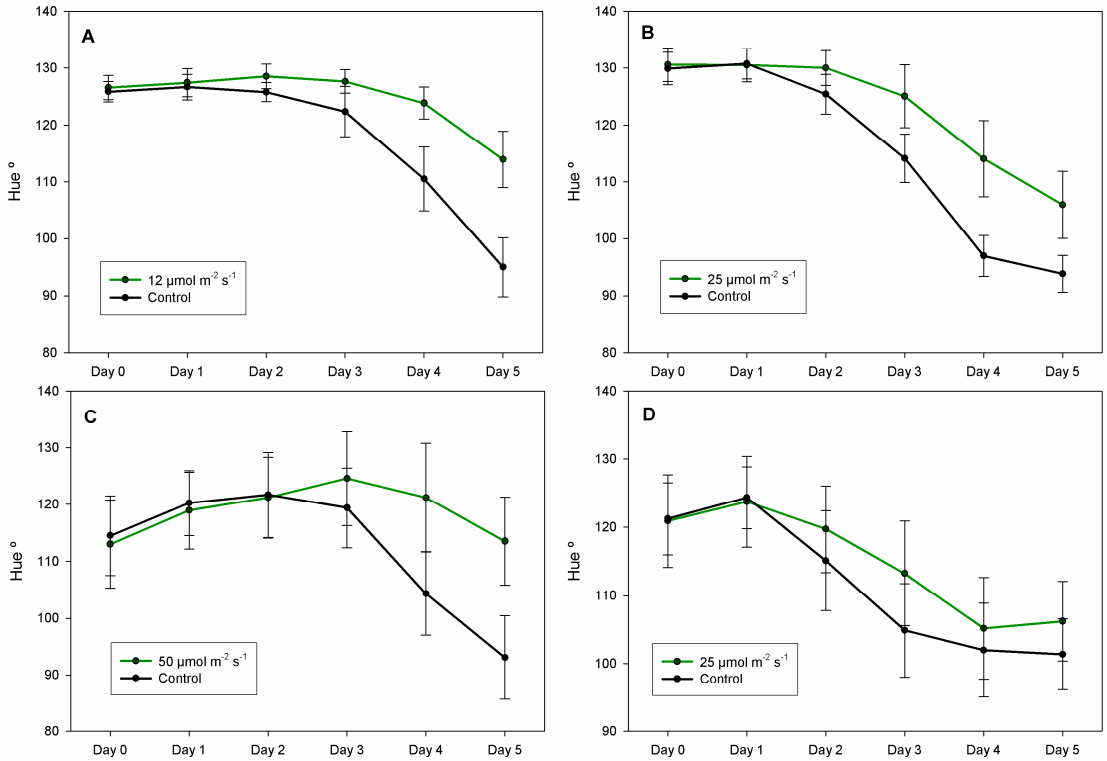


Figure 1. Superficial color measurements (Hue angle) of broccoli heads stored at different light intensities. The light applied was either continuous (A,B,C) or following a 16 h light /8 h dark photoperiod (D), and the employed light intensities were: (A) 12 µmol m^{-2} s^{-1}; (B,D): 25 µmol m^{-2} s^{-1}; (C): 50 µmol m^{-2} s^{-1}.

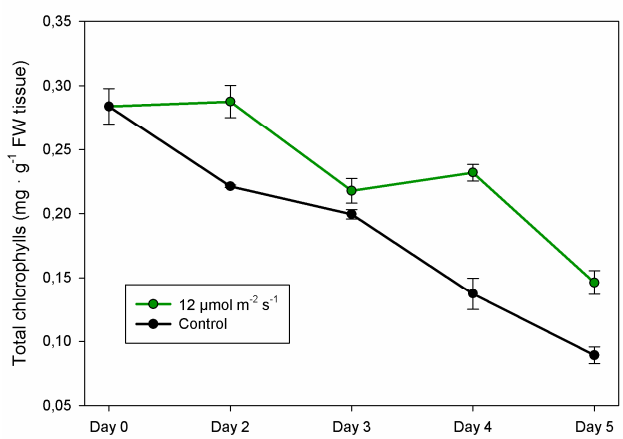


Figure 2. Total chlorophyll content in broccoli florets stored at 22 °C under continuous light or complete darkness as control.

Soluble and total protein content

The degradation of proteins occurs rapidly in postharvest broccoli and the expression pattern of several protease genes have been shown to be enhanced in senescence (Page et al 2001). The total protein content of non-treated control broccoli florets decreased over the course of postharvest senescence, showing values at the end of the experiment corresponding to approximately 50% of the initial values for controls as well as for treated values (**Figure 3B**). No statistical differences were found for total protein content in any time period for treated versus control tissues. However, in the case of soluble protein content, as seen on **Figure 3A**, the value obtained at the end of the time course of the experiment was 56 % of that from the initial time, while for treated tissue the corresponding value was

35 %. These results indicate that exposure to constant light in broccoli florets reduces the degradation of soluble proteins, but this effect is not reflected in total protein content, suggesting a possible selective down-regulation of some metabolic pathways related to protein degradation during postharvest senescence.

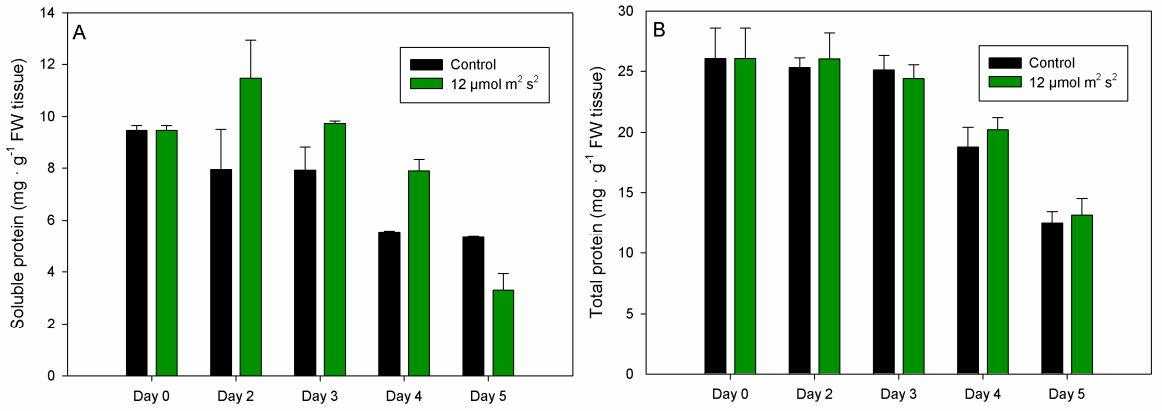


Figure 3. (A) Soluble and (B) total protein content analyzed from extracts of broccoli treated by light exposure.

Reducing and total sugar content

After light treatment the content of reducing as well as total soluble sugar content decreased from day 0 to day 5 of the experience, most probably since harvesting interrupts the supply of sugars, which are necessary to keep a normal respiration rate. As seen on **Figure 4**, the sugar content in control florets was always lower than the content of light-treated broccoli heads. By the final time point analyzed, the sugar content in treated samples was 15 % higher than controls for reducing sugars and 13 % for total soluble sugars. As broccoli heads are green tissues and sepals contains intact chloroplasts, samples maintained under light could have continued photosynthesis and thus maintained a higher sugar level during storage.

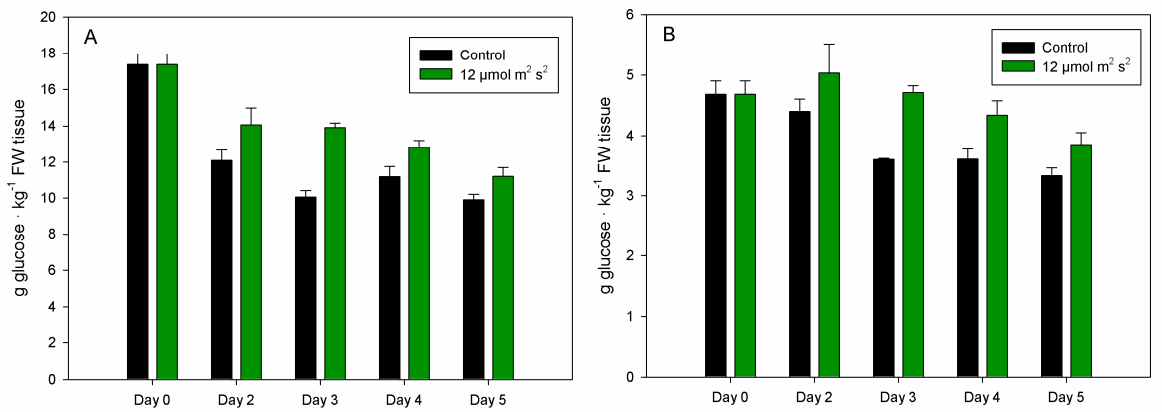


Figure 4. (A) Total and (B) reducing sugar content in samples stored under continuous light and in darkness as control during the 5-day time period assayed.

CONCLUSIONS

An important delay in the loss of green color was observed in broccoli florets exposed to continuous light, suggesting that such treatment decreases postharvest senescence in these tissues. No large differences were observed in terms of superficial color between the different light intensities assayed, since in all cases lower values were recorded in florets exposed to light in comparison to controls. Exposure to a periodic light source did not seem to have a different effect than that of continuous light. A constant decrease in chlorophyll, protein and sugar content was found during postharvest senescence of treated as well as control broccoli florets. However, the decrease was delayed in the material

exposed to continuous light. Uninterrupted exposure to light allowed delaying postharvest broccoli senescence, with a lower loss of proteins and sugars, maintaining the commercial acceptance of the product for a longer period of time. The treatment with light we utilized in this work is very simple; easy to carry out and inexpensive and could be combined with other postharvest treatments such refrigeration and modified atmospheres to improve postharvest life of broccoli.

ACKNOWLEDGEMNTS

This work was supported by grants from ANPCYT (PICT 25283).

REFERENCES

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Analytical Biochemistry, 72:248-254.

Giovannoni J. 2001. Molecular biology of fruit maturation and ripening52:725-749.

Inskeep WP and Bloom PR. 1985. Extinction Coefficients of Chlorophyll a and b in N,N Dimethylformamide and 80% Acetone. Plant Physiol, 77:483-485.

King GA and Morris SC. 1994. Early compositional changes during postharvest senescence of broccoli. Journal of the American Society for Horticultural Science, 119:1000-1005.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, and Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry, 193:265-275.

Noichinda S, Bodhipadma K, Mahamontri C, Narongruk T, and Ketsa S. 2007. Light during storage prevents loss of ascorbic acid, and increases glucose and fructose levels in Chinese kale (Brassica oleracea var. alboglabra). Postharvest Biology and Technology, 44:312-315.

Page T, Griffiths G, and Buchanan-Wollaston V. 2001. Molecular and biochemical characterization of postharvest senescence in broccoli. Plant Physiology, 125:718-727.

Southgate DAT. 1976. Determination of food carbohydrates105-106.

Toledo MEA, Ueda Y, Imahori Y, and Ayaki M. 2003. L-ascorbic acid metabolism in spinach (Spinacia oleracea L.) during postharvest storage in light and dark. Postharvest Biology and Technology, 28:47-57.

Wang H, Ma LG, Li JM, Zhao HY, and Xing WD. 2001. Direct interaction of Arabidopsis cryptochromes with COP1 in light control development. Science, 294:154-158.

Yamauchi N, Harada K, and Watada AE. 1997. In vitro chlorophyll degradation in stored broccoli (Brassica oleracea L. var. italica Plen.) florets. Postharvest Biology and Technology, 12:239-245.

Calidad del aceite de trigo: influencia del almacenamiento del germen y del método de extracción del aceite

Quality of wheat oil: influence of germ storge and oil extraction method

Capitani M, Mateo C, Nolasco S

Facultad de Ingeniería, Dto. de Ing. Química (TECSE), UNCPBA, Avda del Valle 5737 B7400JWI Olavarría, Argentina. marianelacapitani411@hotmail.com

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue analizar el efecto del almacenamiento de germen de trigo y del método de extracción de su aceite sobre el contenido de tocoferoles totales y la composición acídica. El germen de trigo se almacenó en estufa a 27ºC y 45°C por un tiempo total de 35 días, con períodos de análisis cada 7 días. Posteriormente a cada período de almacenamiento se realizó la extracción del aceite, por métodos caliente y frío, respectivamente. La extracción en caliente se realizó mediante un equipo Soxhlet, (*n*-hexano a reflujo, 90ºC, 8 horas), mientras que la extracción en frío se realizó por contacto del germen con solvente (*n*-hexano) durante 3 horas a temperatura ambiente y con agitación magnética, y posterior filtrado de la suspensión. Después de ambas extracciones, se procedió a la evaporación del solvente en un equipo rotavapor. La determinación cuantitativa de tocoferoles se realizó mediante HPLC y la composición acídica mediante CGL. Los resultados obtenidos indican que al almacenar el germen a una temperatura cercana a la ambiente (27ºC), la concentración de tocoferoles totales en el aceite no fue afectada. Al respecto, se observó que al emplear el método de extracción en frío la concentración de tocoferoles totales se mantuvo aproximadamente constante en un rango de 2424 a 2341 µg/g, mientras que al extraer el aceite en caliente, si bien se observó una tendencia de disminución en la concentración de tocoferoles con el tiempo de almacenamiento, la misma no fue estadísticamente significativa. No se detectaron diferencias significativas entre métodos de extracción ni entre días de almacenamiento ($P \geq 0{,}2614$ y $P \geq 0{,}2928$). Para una temperatura de almacenamiento de 45ºC y para ambos métodos de extracción empleados, la concentración de tocoferoles totales fue disminuyendo con el aumento del tiempo de almacenamiento ($P=0{,}0016$), obteniéndose mayores concentraciones con la extracción en caliente ($P=0{,}0003$). Respecto a la composición acídica, se mantuvo constante para los dos tratamientos y ambos métodos de extracción de aceite empleados. A fin de conservar la calidad del aceite de germen de trigo, respecto a su composición acídica y concentración de tocoferoles, los resultados obtenidos sugieren la conveniencia de almacenar el germen de trigo a temperaturas próximas a la ambiente. El método de extracción de aceite no incidió sobre la composición de ácidos grasos del aceite, pero sí afectó la concentración de tocoferoles totales, obteniéndose mayores concentraciones con el método de extracción en caliente.

ABSTRACT

The aim of this study was to analyze the effect of storage of wheat germ and the method of extraction of oil on the total tocopherol content and composition acidic. Wheat germ was stored in an oven at 27ºC and 45°C for a total time of 35 days, with periods of 7 days for each analysis. After each storage period it was performed an oil extraction with hot and cold methods, respectively. The extraction was done using a hot Soxhlet equipment, (n-hexane at reflux, 90ºC 8 hours). The cold extraction was performed by contact of the germ with solvent (n-hexane) for 3 hours with magnetic stirring and subsequent leaking of the suspension. After both extractions the solvent was submited to evaporation in a rotary evaporator. The quantitative determination of tocopherols was done with HPLC and the acidic composition, through CGL. The results indicate that storing the seeds at a temperature close to air temperature (27°C) does not affect the concentration of tocopherols in the oil. The concentration remained approximately constant in a range from 2424 to 2341 µg/g with a cold extraction method. Even though the concentration of tocopherols showed a tendency to decrease in the process hot oil extraction with storage time, it was not statistically significant. There were no significant differences between extraction methods or between days of storage ($P \geq 0.2614$ and $P \geq 0.2928$). For a storage temperature of 45°C and for both extraction methods employed, the concentration of tocopherols

decreased with increased storage time (P=0.0016), resulting in higher concentrations in hot extraction (P=0.0003). The acidic composition remained constant for both treatments and both oil extraction methods. In order to preserve the quality of wheat germ oil, regarding its acidic composition and concentration of tocopherols, the results suggest it is desirable to store wheat germ at air temperature. The oil extraction method did not impact on the fatty acid composition of the oil, but it affected the concentration of total tocopherols having obtained higher concentrations with the method of extraction in hot.

PALABRAS CLAVE: *germen de trigo, aceite, almacenamiento, extracción, calidad.*

KEYWORDS: *wheat germ, oil, storage, extraction, quality.*

INTRODUCCIÓN

La pérdida de calidad de los aceites comestibles y alimentos grasos se ve influenciada por factores externos tal como la temperatura, las radiaciones y el oxígeno. El control de tales variables es de gran interés económico para la industria alimentaría, debido a que se evitan problemas en lo que respecta a la aceptabilidad del alimento por aparición de olores y sabores desagradables, pérdida de calidad nutricional y salubridad del mismo (Fennema 1993). La aceptabilidad de un producto alimenticio depende del deterioro ocurrido y este, a su vez, depende de varios factores como ser la composición del lípido, la presencia de determinadas sustancias que actúan como prooxidantes y de las condiciones de almacenamiento (Malecka 2002).

El aceite de trigo, obtenido a partir del germen (subproducto de la molienda industrial del trigo) constituye aproximadamente el 11% del mismo, siendo este porcentaje suficiente para causar el enranciamiento del grano por acción de la enzima lipoxidasa o por enranciamiento oxidativo no enzimático (Dunford y Zhang 2003). Este aceite es una excelente fuente de ácidos grasos esenciales tales como ácido linoleico (omega 6) (60,23%) y linolénico (omega 3) (6,20%); así como también rico en ácido oleico (15,79%). Además se caracteriza por su aporte de vitamina E (α-tocoferol). Su gran contenido de sustancias biológicamente activas, tales como tocoferoles, provitamina A, vitamina F y estearina, se debe a su origen embrionario. Tales componentes le atribuyen un rol importante en la prevención y control de enfermedades degenerativas, cardiovasculares y cerebrales (Megahad y El Kinawy 2002). Por tal motivo, es importante conocer si las condiciones de almacenamiento del germen y el método empleado para la extracción de su aceite pueden afectar la composición acídica y el contenido de tocoferoles del aceite de trigo, de modo que es importante retener lo máximo posible el contenido de tocoferoles (antioxidantes liposolubles naturales con actividad vitamínica E), para prevenir los procesos de oxidación del aceite, al tratarse de un aceite con alto porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados (Wang y Jonson 2001).

El objetivo del presente trabajo fue analizar el efecto del almacenamiento del germen de trigo y del método de extracción de su aceite sobre el contenido de tocoferoles totales y la composición acídica.

MATERIALES Y MÉTODOS

El germen de trigo fue suministrado por la empresa Molinos Cañuelas SACIFIA (provincia de Buenos Aires, Argentina). Se determinó su contenido de humedad mediante el Método AACC 44-19 (1993) y el rendimiento de aceite (métodos en caliente y en frío). Para los ensayos experimentales, el germen de trigo se situó en bandejas de aluminio (200 gramos por bandeja), las mismas se almacenaron en estufa a dos temperaturas diferentes (27ºC y 45ºC) por un tiempo total de 35 días, con períodos de análisis cada 7 días.

Posteriormente a cada período de almacenamiento, se extrajo el aceite mediante dos métodos: caliente (EC) y frío (EF). Para el método en caliente se utilizó un equipo Soxhlet, empleando como solvente *n*-hexano, grado técnico, siguiendo la norma IUPAC 1.122 (1992). El proceso se llevó a cabo a una temperatura de 90ºC, a presión atmosférica y durante 8 horas. La extracción en frío se realizó por contacto del germen con solvente (*n*-hexano) durante 3 horas a temperatura ambiente y con agitación magnética. Posteriormente se filtró la suspensión obteniendo miscela y harina residual. Después de ambas extracciones, se procedió a la evaporación del solvente en un equipo rotavapor. El contenido de tocoferoles en los aceites se determinó mediante una técnica cromatográfica basada en las normas IUPAC 2.432 (1992) y AOCS Ce8-89 (1998). La muestra de aceite se disolvió en hexano grado

HPLC para su posterior separación por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) con detector de fluorescencia (λ exitación: 290 nm, λ de emisión: 330 nm). La concentración de tocoferoles se determinó por el método de estándar externo, utilizando el α-tocoferol como referencia y se expresó en μg de tocoferol /g aceite. La composición acídica se determinó mediante Cromatografía gas-líquido con detector de ionización de llama (Izquierdo 2007).
Los datos obtenidos se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA), utilizando el Software Infostat 6.0 (2003). Cuando se observaron diferencias significativas entre medias de variables estudiadas, las mismas se analizaron según la prueba de Tukey ($P<0,05$).
Las relaciones entre variables de almacenamiento y propiedades se determinaron utilizando el Software SigmaPlot for Windows, versión 11.0 (Systat Software, inc., 2008).

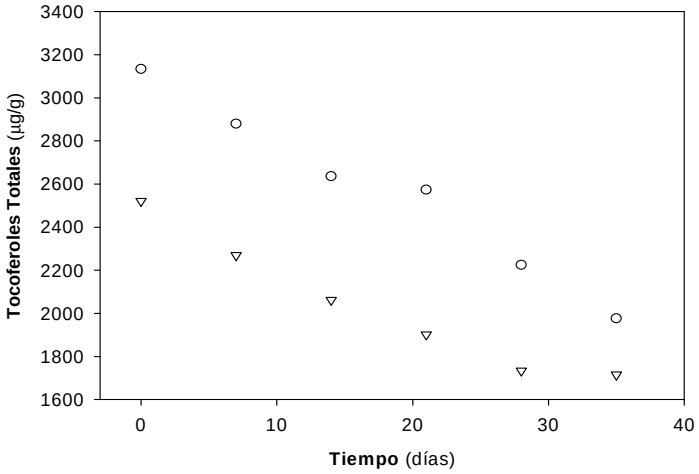
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La muestra de germen de trigo presentó un contenido de humedad del 13,7% y rendimientos de aceite de 8,8% con el método de extracción en caliente y 7,4% con el método de extracción en frío. Dichos valores se encuentran dentro del intervalo de porcentaje de aceite (8-14%) reportados en la bibliografía (Gunstone *et al*. 1994, Wang y Jonson 2001).
El contenido de tocoferoles totales fue de 3134 μg/g y de 2521 μg/g según el método de extracción en caliente y frío, respectivamente. Se detectó la presencia de α-, β- y γ-tocoferol, siendo el α-tocoferol el componente mayoritario. El α-tocoferol representó entre un 67 y 68% (método de extracción en caliente y frío, respectivamente) de los tocoferoles totales, valores coincidetes con los referidos en la bibliografía (Zacchi *et al.* 2006). Los componentes mayoritarios de su composición acídica fueron los ácidos linoleico (59,5%), palmítico (18,6%) y oleico (14,4%) y en menor proporción los ácidos linolénico (7%) y esteárico (0,5%).
En la **Tabla 1**, se puede observar que, almacenando el germen a una temperatura cercana ó levemente superior a la ambiente (27ºC), la concentración de tocoferoles totales se mantuvo aproximadamente constante en el aceite obtenido por EF, mientras que para el aceite obtenido por EC se manifestó una tendencia de disminución en la concentración de tocoferoles a medida que avanzó el almacenamiento. Sin embargo, el análisis estadístico de la varianza no permitió detectar diferencias significativas entre días de almacenamiento ($P\geq0,2928$) ni entre métodos de extracción ($P\geq0,2614$).

Tabla 1. Concentración de tocoferoles totales en muestras de aceite correspondientes a germen de trigo almacenado a 27ºC durante distintos períodos de tiempo. Valores seguidos por letras iguales indican que no existe diferencia significativa

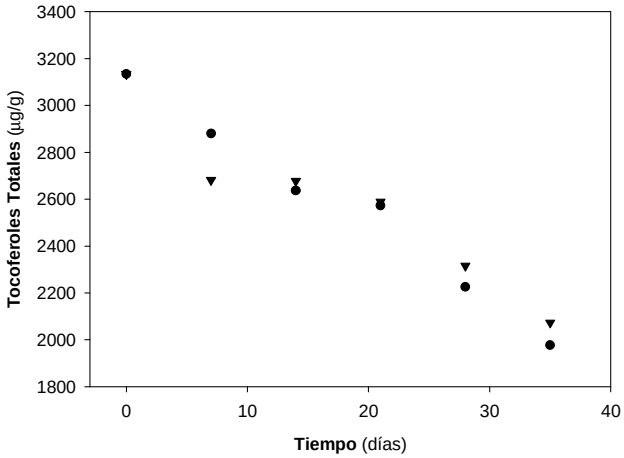
Días	**Concentración de tocoferoles totales** (μg/g)	
	Extracción en caliente	**Extracción en frío**
0	3134 a	2521 a
7	2682 a	2424 a
14	2677 a	2436 a
21	2589 a	2442 a
28	2315 a	2419 a
35	2073 a	2341 a

Para una temperatura de almacenamiento mayor (45ºC) y para ambos métodos de extracción de aceite empleado (**Figura 1**), la concentración de tocoferoles totales fue disminuyendo a medida que el tiempo de almacenamiento del germen fue aumentando ($P=0,0016$), obteniéndose mayores concentraciones con la extracción en caliente ($P=0,0003$).
El comportamiento de la concentración de tocoferoles totales en el aceite extraído por EC fue similar para ambas temperaturas de almacenamiento (45ºC y 27ºC) (**Figura 2**). Mientras que, para EF (**Figura 3**) se observó una menor concentración de tocoferoles totales en las muestras almacenadas a 45ºC respecto de las almacenadas a 27ºC. Este comportamiento podría deberse a que un pretratamiento (almacenamiento) a mayor temperatura, facilita fenómenos tales como rotura de la emulsión celular, disminución de la viscosidad del aceite, lo que mejora su fluidez y desplazamiento y disminución de la tensión superficial del aceite, favoreciendo la extracción del aceite y por consiguiente una dilución de los tocoferoles (Pérez 2002).



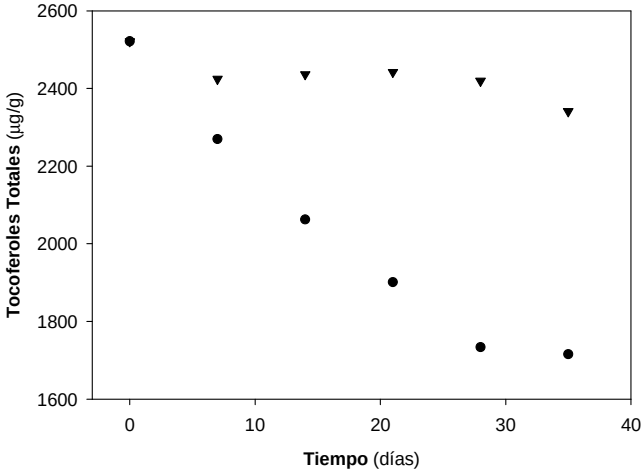
○: Extracción en caliente,∇: Extracción en frío

Figura 1: Efecto del método de extracción de aceite aplicado sobre la concentración de tocoferoles totales, para muestras de germen almacenadas a 45ºC durante distintos períodos de tiempo.



▼: Tocoferoles a 27ºC, ●: Tocoferoles a 45ºC

Figura 2: Efecto de las temperaturas de almacenamiento del germen sobre la concentración de tocoferoles totales, para el método de extracción de aceite en caliente.



▼: Tocoferoles a 27ºC, ●: Tocoferoles a 45ºC

Figura 3: Efecto de las temperaturas de almacenamiento del germen en estufa sobre la concentración de tocoferoles totales, para el método de extracción de aceite en frío.

El análisis de la composición acídica del aceite de germen de trigo correspondiente a ambos tratamientos de almacenamiento y diferentes métodos de extracción de aceite, indicó la presencia de los ácidos grasos palmítico (16:0), esteárico (18:0), oleico (18:1), linoleico (18:2) y linolénico (18:3); siendo el ácido graso insaturado linoleico el componente mayoritario.
La composición acídica se mantuvo constante para los dos tratamientos (27º y 45ºC y el total de días de almacenamiento) y ambos métodos de extracción de aceite empleados (**Tabla 2**).

Tabla 2: Porcentajes promedios de los diferentes ácidos grasos para cada tratamiento y método de extracción. EC: extracción en caliente, EF: extracción en frío

Ácidos Grasos	**Tratamiento**			
	Temperatura (27ºC)		**Temperatura (45ºC)**	
	EC	EF	EC	EF
Palmítico	18,99 ± 0,23	18,72 ± 0,13	19,07 ± 0,34	18,86 ± 0,10
Esteárico	0,44 ± 0,03	0,48 ± 0,02	0,49 ± 0,02	0,44 ± 0,01
Oleico	13,94 ± 0,13	14,22 ± 0,06	14,34 ± 0,17	14,21 ± 0,11
Linoleico	59,62 ± 0,24	59,46 ± 0,14	59,35 ± 0,17	59,57 ± 0,09
Linolénico	7,02 ± 0,07	7,13 ± 0,08	6,76 ± 0,25	6,92 ± 0,05

CONCLUSIONES

La calidad del aceite determina en gran medida la aceptabilidad del mismo por parte del consumidor. Dicha calidad puede ser afectada por las condiciones de tratamiento y/o manipulación del mismo, entre los que se puede mencionar el almacenamiento de la materia prima y la metodología empleada para extraer su aceite. Si bien para el germen de trigo almacenado a temperatura de 27ºC no se detectaron diferencias significativas entre los métodos de extracción de aceite empleados (en caliente y en frío) para la concentración de tocoferoles totales, a mayor temperatura de almacenamiento (45ºC) la concentración de tocoferoles fue superior en el aceite extraído en caliente. Almacenando el germen de trigo a temperaturas próximas a la ambiente, la concentración de tocoferoles totales se mantuvo aproximadamente constante, mientras que, al someter el germen a mayores temperaturas (45ºC) se detectó una disminución en la misma a medida que transcurrió el tiempo. Desde el punto de vista de preservar la concentración de antioxidantes en el aceite (tocoferoles), los resultados obtenidos sugieren la conveniencia de almacenar el germen de trigo a temperaturas inferiores a 45ºC y emplear el método de extracción de aceite en caliente respecto al de extracción en frío.
Con respecto a la composición acídica, no se observó un efecto de las temperaturas de almacenamiento del germen de trigo (27ºC y 45ºC) a lo largo de todo el período analizado. A su vez, el método de extracción de aceite no incidió sobre los porcentajes relativos de ácidos grasos.
En función de los resultados obtenidos, se sugiere realizar futuros estudios a temperaturas de almacenamiento entre 27ºC y 45ºC y con mayores períodos de tiempo, a fin de optimizar el proceso tendiente a mantener la calidad del aceite.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo con el apoyo económico de la Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (Programa Institucional Alimentos). Se agradece a la empresa Molinos Cañuelas SACIFIA por el suministro del germen de trigo utilizado en el presente estudio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AACC. 1984. Official methods of análisis (12th ed.). St. Paul, MN, USA: American Association of Cereal Chemists.

AOCS.1998. Official and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society, 5th edn., edited by D. Firestone, AOCS Press, Champaign Illinois.

Dunford TN, Zhang M. 2003. Pressurized solvent extraction of wheat germ oil. Journal of Food Research International, 36: 905-909.

Gunstone FD, Harwood JL, Padley FB. 1994. The Lipid Handbook. Second Edition. London: Chapman & Hall.106-107.

IUPAC. 1992. International Union of Pure and Aplplied Chemistry – Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivates. 7th edn. Paquot, C. and Hautffene, A., Blackwell Scientfic Publications, Inc., Oxford.

Izquierdo NG. 2007. Factores determinantes de la calidad de aceites en diversas especies. Tesis grado de doctor en Ciencias Agrarias, Unidad Integrada Balcarce, Estación Experimental Agropecuaria Balcarce, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata, Balcarce, Argentina.

Malecka M. 2002. Antioxidant properties of the unsaponificable matter isolated from tomato seeds, oat grains and wheat germ oil. Journal of Food Chemistry, 79: 327-330.

Megahad OA, El Kinawy OS. 2002. Studies on the extraction of wheat germ oil by commercial hexane. Journal of Fats and oils, 53: 414-418.

Pérez EE. 2002. Obtención y Caracterización de Aceites y Harinas de Girasol Silvestre (*Helianthus petiolaris*). Tesis de Doctorado en Ingeniería Química, Universidad Nacional del Sur.

Wang T, Jonson LA. 2001. Refining High-Free Fatty Acid Wheat Germ Oil. Journal of AOCS, 78:71-76.

Wassef WN.1993. Lípidos. En: Fennema, OR. Química de los Alimentos. 466. Zaragoza: ACRIBIA. pag 157-274.

Zacchi P, Daghero J, Jaeger P, Eggers R 2006. Extraction/Fractionation and deacification of wheat germ oil using supercritical carbon dioxide. Journal of Chemical Engineering, 23: 105-110.

Uso del medio BRUCELLABUAP en el aislamiento de *Brucella* spp a partir de leche, sangre y órganos del ganado caprino.

BRUCELLABUAP culture media for *Brucella spp* isolation from milk, blood and solid tissues of goat.

Castañeda-R E I[(1)], Avelino FF[(1)], Chávez B. E[(1)], Fajardo-M I[(2)], Morales-T E[(2)] y Faillaci SM[(3)]

(1) Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP). México.
(2) Ingeniería de Alimentos. FIQ. BUAP. México.
(3) ICTA- Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Universidad Nacional de Córdoba-Argentina.
iracena@yahoo.com

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue utilizar el medio BRUCELLABUAP para el aislamiento de cepas de *Brucella* a partir de muestras de leche, sangre y órganos del ganado caprino y comparar su eficiencia contra el medio TSA, medio de cultivo comercial. Se procesaron veinte muestras de leche de cabra, sangre y tejidos (hígado, riñón y bazo) de animales con brucelosis de Tepeyhualco, Puebla. Se realizó la prueba de anillo en leche. En sangre se utilizaron los métodos serológicos de aglutinación en suero (SAT) y la prueba de aglutinación con 2-Mercaptoetanol (2-ME) y el cultivos de sangre. Las muestras de órganos se obtuvieron asépticamente de biopsias, se cultivaron tanto en agar como en caldo BRUCELLABUAP y TSA con antibióticos, usando un inoculo grueso. Todos los cultivos se incubaron aeróbicamente por 2 hasta 7 días a 37ºC con 5% de CO_2. Las cepas aisladas recuperadas se aglutinaron con antisuero anti-*Brucella*. Se aislaron cinco cepas de *Brucella melitensis* a partir de tejidos y leche y una cepa de sangre de cabra con serología positiva. El medio de cultivo BRUCELLABUAP fue una herramienta muy útil en el aislamiento y tipificación de las cepas de *B. melitensis*, mientras que en el medio TSA usado de rutina en los laboratorios no se logró la recuperación del mismo número de cepas de *Brucella*.

ABSTRACT

The aim of this work was to utilize the BRUCELLABUAP culture medium for the isolation of *Brucella* strains from samples of milk, blood and organs of the goats and to compare its efficiency against TSA, commercial culture media. Twenty goat milk samples, blood and solid tissues (liver, kidney, spleen) of goats confirmed with brucellosis from Tepeyahualco, Puebla were processed. The test of ring in milk was carried out. In blood, were utilized standard agglutination tests (SAT), 2 mercaptoethanol test (2-ME) and blood culture. Tissue samples were obtained aseptically of biopsies, they were cultivated as agar as in broth BRUCELLABUAP and TSA with antibiotics, using a thick inoculums. All the cultivations were incubated aerobically for 2 to 7 days to 37ºC with 5% of CO_2.
Isolated strains recovered on solid medium then were tested for agglutination with antiserum against *Brucella*. Five *Brucella melitensis* strains were isolated from tissues and milk, and one from blood of goat with serology *Brucella* positive. The BRUCELLABUAP culture media was very useful tool for the isolation and typification of the *B. melitensis* strains, while on the contrary the soybean trypticase agar used of routine in the laboratories did not manage to recover the same quantity of *Brucella* strains.

PALABRAS CLAVE: *Medio de cultivo BRUCELLABUAP, Brucella en leche, Brucella en tejidos.*

KEYWORDS: *Brucella in milk, Brucella in tissues, BRUCELLABUAP culture means.*

INTRODUCCIÓN

Tepeyahualco de Hidalgo es un municipio que constituye un ecosistema natural para el ganado caprino productor de carne y leche, además de ser una cuenca lechera y productora de queso fresco de importancia para la región en donde no se ha erradicado a la brucelosis a pesar de los programas establecidos (NOM-041-ZOO 1995, S.S.E.P. 2009). El cultivo de leche, sangre y órganos para la búsqueda de *Brucella*, es difícil y poco exitoso, sin embargo, el medio de cultivo denominado BRUCELLABUAP que fue diseñado en el Laboratorio de Patogenicidad Microbiana del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas de la BUAP para un cultivo rápido y específico de bacterias del género *Brucella* y que se validó en 1998, ha demostrado mayor índice de aislamiento que con el medio de cultivo tradicional de soya tripticaseína, que se utiliza en los laboratorios microbiológicos para el análisis de alimentos. El objetivo de este estudio fue aislar e identificar cepas de *Brucella* a partir de leche, sangre y órganos del ganado caprino utilizando el medio de cultivo BRUCELLABUAP para un aislamiento rápido y específico y utilizar al medio soya tripticasa (TSA) como medio de cultivo control, pues es el de mayor uso comercial en los laboratorios dedicados al diagnóstico microbiológico de brucelosis.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se procesaron 20 muestras de leche, 20 de sangre y 20 de órganos (hígado, riñón, bazo) de animales confirmados con brucelosis. Las muestras de leche se titularon mediante la prueba de anillo en leche (NOM-041 ZOO 1995). Esta prueba pone en evidencia, las aglutininas contenidas en la leche al agregarse una suspensión de *Brucella* coloreada; en caso de reacción positiva, se aglutinan en el primer momento y después se enlazan a los corpúsculos de grasa para formar en la superficie un anillo de crema coloreado. Las muestras de sangre se analizaron mediante las pruebas de SAT y 2-ME. La prueba de SAT se ha mantenido como prueba básica en los programas de control y erradicación de brucelosis en México por sus resultados uniformes, economía y estandarización (Smits 1999). La prueba utiliza antígenos elaborados en fase lisa con características aglutinógenas estables debiéndose contener un 0,045% de células suspendidas en solución salina fenolada al 0,5%. La prueba del 2-ME basa en el hecho de que los anticuerpos IgM se degradan debido a la acción de ciertos compuestos que contienen el radical tiol, tales como el 2- Mercaptoetanol, sin producir efectos sobre los anticuerpos IgG (Mikolon 1998). Los exámenes microbiológicos brindan un diagnóstico irrefutable válido para la confirmación de la brucelosis. Como materiales más convenientes para el análisis microbiológico se señalan leche, hígado, bazo (NOM-041. 1995). El medio base para el cultivo, subcultivo y tipificación fue el medio BRUCELLABUAP (Castañeda-R. 1998), diseñado en el laboratorio de Patogenicidad Microbiana del CICM-BUAP Se procesaron veinte muestras de leche de cabra, sangre y tejidos (hígado, riñón y bazo) de animales con brucelosis de Tepeyhualco se realizaron subcultivos cada 24 horas en agar BRUCELLABUAP y medio TSA, las colonias sospechosas se aglutinaron con sueros específicos, pruebas bioquímicas (TSI, LIA, CITRATO, UREASA) y tipificación con colorantes (TIONINA, SAFRANINA Y FUCSHINA) utilizando para ello las cepas de referencia de *B. melitensis, B. suis* y *B. abortus (*Alton 1988).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Uno de los problemas del diagnóstico microbiológico de brucelosis animal y humana es la recuperación poco exitosa de cepas de *Brucella* en los medios de cultivo comerciales como el TSA, por lo que se requiere de medios de cultivo alternativos para asegurar el aislamiento de estos patógenos a partir de sangre, leches y órganos. En este trabajo comparamos la eficiencia del medio BRUCELLABUAP con el medio TSA en muestras que se analizaron con pruebas serológicas en leche (Prueba de anillo) y en sangre (Aglutinación Estándar (SAT) y 2-Mercaptoetanol (2-ME). Los resultados demostraron una positividad del 25% en la leche de cabra de la comunidad de Tepeyahualco de Hidalgo, lo que representa una incidencia elevada de brucelosis en el ganado caprino. Se aislaron e identificaron 5 cepas de *B. melitensis* en leche como en bazo, hígado y riñón, así como una cepa de sangre de animales infectados, cuando en el aislamiento se utilizó el medio de cultivo BRUCELLABUAP, mientras que cuando se empleó el medio soya tripticasa (TSA) solo se recuperó una cepa de *Brucell*a en una muestra de leche. Estos resultados se resumen en la **Tabla 1**. Este hallazgo demuestra por un lado, que el ganado caprino de leche y carne de esa comunidad no se encuentra libre de brucelosis y que existen factores ambientales que le permiten a *B. melitensis*

mantenerse e infectar a otros animales. Por otro lado se demuestra que hay un medio de cultivo que es una alternativa en el diagnóstico microbiológico, pues en el aislamiento de *Brucella* no se tiene mucho éxito, probablemente porque el microorganismo es nutricionalmente exigente y en el medio BRUCELLABUAP el patógeno encuentra las condiciones óptimas para su desarrollo (**Figura 1**). Al aislar e identificar cepas de *Brucella* en leche y órganos de animales de Tepeyahualco con mayor eficiencia en el medio BRUCELLABUAP, podemos contar con una herramienta para estudios epidemiológicos con resultados más rápidos y específicos para este microorganismo. Aunque se han desarrollado diversos sistemas de cultivo comerciales en frascos, el medio base utilizados ellos sigue siendo muy importante, por lo que el medio desarrollado en el Laboratorio de Patogenicidad Microbiana del la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla es una alternativa en el cultivo del género *Brucella*.

Tabla 1. Resultados del uso del medio BRUCELLABUAP en la recuperación de cepas de campo en leche, sangre y órganos del ganado caprino de Tepeyahualco, Puebla. México.

Muestra	Prueba serológica Título de anticuerpos anti*Brucella*	Cultivo en medio BRUCELLABUAP	Cultivo en medio TSA
Leche[a]	(1:16)	5 cepas de *B. melitensis*	1 cepa de *B. melitensis*
Sangre[b]	(1:160)	1 cepa de *B. melitensis*	Sin aislamiento
Hígado	ND	5 cepas de *B. melitensis*	Sin aislamiento
Riñon	ND	5 cepas de *B. melitensis*	Sin aislamiento
Bazo	ND	5 cepas de *B. melitensis*	Sin aislamiento

a= Anillo en leche
b= SAT y 2-ME

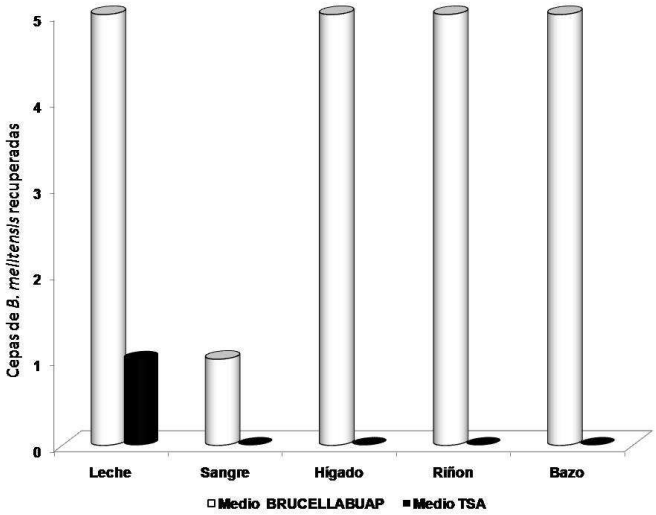


Figura 1. Resultados del uso del medio de cultivo BRUCELLABUAP y TSA (medio comercial) en el aislamiento de cepas de *Brucella* a partir de leche, sangre, hígado, riñón y bazo de animales con brucelosis provenientes de Tepeyahualco, Puebla. México.

CONCLUSIÓN

El presente estudio demuestra que el análisis microbiológico utilizando el Medio BRUCELLABUAP es una alternativa para el diagnóstico microbiológico de brucelosis, pues fue un medio excelente en el aislamiento e identificación de *Brucella* spp en leche, sangre y órganos de animales infectados lográndose la recuperación de cinco cepas de *B.melitensis* en comparación con un medio de cultivo comercial.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alton G. G., L.M. Jones, R. D. Angus. J. M. Verger. 1988. Techniques for the brucellosis laboratory. INRA, Paris.

NOM-041ZOO. 1995. Campaña Nacional contra la brucelosis en los animales. México.

Castañeda-Roldán E.I. 1998. Validación del medio BRUCELLABUAP para el aislamiento rápido de *Brucella spp* a partir de leche y sangre de animales y sangre de humanos con brucelosis aguda y crónica. Proyecto SIZA 1998-2000. México.

S.S.E.P. 2009. Secretaría de Saludo del Estado de Puebla. Boletín Epidemiológico. Coordinación Estatal de Zoonosis. Puebla, Puebla. México.

Smits H. L., M. A. Basahi, R. Díaz, T. Marrodan, J.T. Douglas, A. Rocha, J. Veerman, M. M. Zheludkov, O. W. M. Witte, J. de Jong, G.C. Gussenhoven, M. G. A. Goris, and M. A. W. G. Van der Hoorn. 1999. Development and Evaluation of a Rapid Dipstick Assay for Serodiagnosis of Acute Human Brucellosis. Journal of Clinical Microbioloy. 37(12): 4179-4182.

Mikolon A. B., I.A. Gardner, S.K. Hietala, J. Hernandez de Anda, E. C. Pestaña, S. G. Hennager, and A. J. Edmondson. 1998. Evaluation of North American Antibody Detection Tests for Diagnosis of Brucellosis in Goats. Journal of Clinical Microbiology. 36(6):1716-1722.

Efecto del pH, materia orgánica y composición de siete suelos de cultivo en la sobrevivencia de *Brucella melitensis*

pH, organic matter and composition of seven agricultural soils in *Brucella melitensis* supervivence

Castañeda-R EI[(1)], Morales-T E.[(2)], Avelino F F[(1)], Chávez B E[(1)], Rosas A J D [(2)], Luna VDA[(2)], y Faillaci S M[(3)]

[(1)]Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP). México.
[(2)]Carrera de Ingeniería de Alimentos. FIQ. BUAP. México.
[(3)] ICTA- Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Universidad Nacional de Córdoba-Argentina.
iracena@yahoo.com

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue determinar los efectos que tienen el pH, la materia orgánica, la flora nativa y la composición de siete suelos de cultivo, en la sobrevivencia de *Brucella melitensis*, para ello se analizaron siete muestras de suelo agrícola, proveniente de los cuatro puntos cardinales de la población de Emilio Portes Gil, conforme a la norma NMX-AA-132-SCFI-2006. Las muestras de suelo se transportaron en bolsas plásticas hasta el laboratorio donde fueron procesadas. Se les cuantificó por espectrometría de rayos X el porcentaje de Al_2O_3, Fe_2O_3, CaO, MgO, SO_3, Na_2O, K_2O; la humedad, pH y materia orgánica se analizó de acuerdo a la NOM-021-RECNAT-2000. Se determinó la sobrevivencia de *Brucella melitensis* en las 7 muestras de suelo (estéril y no estéril). Para la cuantificación de bacterias mesofílicas, actinomicetos y hongos se utilizó el método de dilución en placa usando agar para cuenta estándar (pH=6.8), agar Czapek Dox (pH=7.6) para actinomicetos y agar Papa dextrosa (pH=5.5) para hongos.

Los resultados encontrados en este estudio indican que los suelos de Emilio Portes Gil tienen valores de pH alcalinos entre 7.9 y 8.9. *B. melitensis* sobrevivió 48 horas en suelo no estéril, probablemente debido a las condiciones de competitividad con otros microorganismos presentes. En cambio en los suelos estériles *B. melitensis* sobrevivió hasta por 20 días. El SiO_3 fue el que se encontró en mayor porcentaje seguido por el Al_2O_3 y CaO, mientras que el SO_3 fue el de menor porcentaje; el MgO, Fe_2O_3, K_2O y el Na_2O se encontraron en cantidades muy pequeñas. El porcentaje de materia orgánica presente en las 7 muestras (6.47-9.86) permite decir que estos suelos se pueden considerar como suelos volcánicos con un porcentaje medio de materia orgánica de acuerdo a la NOM-021-RECNAT-2000. Los microorganismos presentes en los suelos fueron, en orden descendente, actinomicetos, bacterias y hongos.

ABSTRACT

The objective of this research was to determinate the effect of pH, organic matter, native flora and composition of seven agricultural soils on *Brucella melitensis* supervivence, for which seven samples were taken from agricultural soil of the North, South, East and West of Emilio Portes Gil, according to standard NMX-AA-132-SCFI-2006. Soil samples were transported in plastic bags to be processed in the laboratory. There was quantified the percentages of Al_2O_3, Fe_2O_3, CaO, MgO, SO_3, Na_2O, K_2O by X-ray Spectrometer in seven soil, the count of the native bacteria of the soil and the survival of *Brucella melitensis* in sterile and nonsterile soils was realized also. Moisture, pH and organic matter were determined as described by NOM-021-RECNAT-2000. To quantify mesophilic bacteria, actinomycetes and present fungi in soils, dilution in plate method was performed, employed Standard Account agar (pH=6.8), Czapek-Dox agar (pH=7.6) and Potato-dextrose agar (pH=5.5) respectively.

Results in this study indicated that the soils of Emilio Portes Gil showed alkaline pH values among 7.9 to 8.9. *B. melitensis* inoculated on the no sterile soils survival 48 hours in each one, probably due to the competency conditions. *B melitensis* inoculated in sterile soil was able to grow and adapted until twenty days after added. SiO3 was founded as highest percentage followed by Al2O3 and CaO, while SO3 was the minor one; MgO, Fe2O3, K2O and Na2O were the smallest in soils. Organic matter

present in the seven samples ranged into middle volcanic soil according NOM-021-RECNAT-2000 (values 6.47-9.86). Microbial soil community compositions were present, in descent order, actinonomicetae, bacteria and fungi.

PALABRAS CLAVE: *Sobrevivencia, Brucella melitensis, suelos agrícolas*.

KEYWORDS: *Brucella melitensis, supervivence, agricultural soil*.

INTRODUCCIÓN

Emilio Portes Gil es una comunidad endémica de brucelosis que tiene como principal actividad económica a la agricultura y la crianza extensiva del ganado caprino. El suelo es fertilizado con abono de los animales, por lo que se genera una contaminación con *B. melitensis* causante de una zoonosis de gran impacto en salud pública. Actualmente, se ignora la capacidad de sobrevivencia en el suelo de algunos microorganismos patógenos como el género *Brucella*, los que al permanecer en él, pueden representar un riesgo para la salud animal y humana permitiendo la permanencia por largos periodos y la diseminación del microbio a través de aerosoles con capacidad infectante (S.S.E.P. 2009). El suelo constituye un ambiente extracelular para *B. melitensis*, en donde el microorganismo puede sobrevivir poco tiempo hasta que encuentre a un nuevo hospedero, por lo que es de interés estudiar la relación entre la composición del suelo, la flora microbiana nativa, los minerales presentes con la sobrevivencia de *B. melitensis* en ese hábitat temporal (Uroz 2009).

MATERIALES Y MÉTODOS

Suelos de cultivo

Se estudiaron siete suelos de cultivo recolectados de la zona norte, sur, oriente y poniente de la localidad de Emilio Portes Gil. Los suelos fueron superficiales y se obtuvieron mediante el método de cuarteo y siguiendo lo establecido en la norma NMX-AA-132-SCFI-2006. Las muestras se transportaron en bolsas plásticas para procesarse en el laboratorio. Para el análisis químico de los suelos de cultivo, los suelos se secaron, tamizaron y entabletaron y se cuantificaron los porcentajes de Al_2O_3, Fe_2O_3, CaO, MgO, SO_3, Na_2O, K_2O por espectrometría de rayos X usando un Espectrómetro Philips X-PW 1660 (Beveridge 1981).

Microorganismos nativos

Se realizó el conteo de las bacterias nativas del suelo, para ello se utilizó el método de dilución en placa, en agar cuenta estándar (pH=6.8) para bacterias mesofílicas, agar Czapek-Dox (pH=7.6) para actinomicetos y agar Papa-dextrosa (pH=5.5) para la recuperación de hongos (Hackl 2004).

Sobreviviencia de *B. melitensis* en suelo

Se realizó en suelos estériles y no estériles para ello se pesaron 25 g de suelo y se disolvieron en 100 ml de agua destilada estéril. La muestra de suelo se agitó y esterilizó (según el experimento), se tomaron 99 ml de ésta y se inocularon con 1 ml de la suspensión de *B. melitensis* ajustada a una D. O_{600} = 1. Se determinaron las UFC/ml mediante diluciones seriadas base diez por extensión en placa sobre agar BRUCELLABUAP, las placas se incubaron durante 24 horas hasta siete días a 37ºC con 5% ce CO_2.

Determinación de pH y Materia Orgánica del suelo

Para la determinación de la materia orgánica y la determinación de pH se usó la metodología propuesta en la NOM-021-RECNAT-2000.

Para el pH. Se pesan 10 g de suelo y se agregan 20 mL de agua destilada, con una varilla de vidrio se agita manualmente la mezcla a intervalos de 5 minutos, durante 30 minutos. Se deja reposar durante 15 minutos. Se calibra el potenciómetro con las soluciones reguladoras de pH 4, 7 y 10 según el suelo antes de iniciar las lecturas de las muestras. Se agita nuevamente la suspensión y se introduce el electrodo en la suspensión, se registra la lectura.

Materia Orgánica. Se realizó a través del método AS-07 de Walkley y Black brevemente: Se pesan 0.5 g de suelo seco y tamizado que se coloca en un matraz Erlenmeyer de 500 ml. Se procesa un blanco y la prueba se hace por triplicado. Se adicionan 10 mL de dicromato de potasio 1N para que entre en contacto con el suelo, se adicionan 20 mL de ácido sulfúrico concentrado y se agita cuidadosamente durante 1 minuto, se deja reposar 30 minutos y se añaden 200 mL de agua destilada y

5 mL de ácido fosfórico concentrado, se adicionan 5 a 10 gotas de difenilamina como indicador y se titula la disolución de sulfato ferroso gota a gota hasta un punto final verde claro.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al estudiar como afectan los componentes del suelo sobre la sobrevivencia de *Brucella melitensis*, encontramos que este microorganismo, agente causal de brucelosis animal y humana, es capaz de sobrevivir extracelularmente por varios días en suelos agrícolas de una zona endémica. Se pudo observar que el pH, los minerales del suelo y la materia orgánica proporcionaron la condición nutricional adecuada para que *B. melitensis* se mantuviera viable por algunos días. Los resultados demostraron que los suelos de la región de Emilio Portes Gil, tuvieron valores de pH alcalino que osciló entre el 7.9 y 8.9 (**Tabla 1**). *B. melitensis* inoculada en los suelos no estériles sobrevivió por 48 horas, probablemente por las condiciones de competencia con la flora nativa (**Figura 1B**), mientras que *B. melitensis* en suelos estériles presentó una mayor adaptación y sobrevivió hasta por 20 días (**Figura 1A**). En cuanto a la composición mineral de los suelos analizados (**Figura 2**) se puede observar que el SiO_3 fue el componente mayoritario, seguido por Al_2O_3 y CaO; mientras que en menor proporción se encontraron al SO_3, MgO, Fe_2O_3, K_2O y Na_2O (**Figura 1**). El contenido de materia orgánica de los siete suelos que pertenecen al eje neovolcánico estuvo comprendido en los valores de 6.1 y 10.9 que corresponden según la NMX-AA-132-SCFI-2006 a una cantidad media de materia orgánica (**Tabla 2**). Uroz 2009, reporta que la materia orgánica del suelo proporcionan algunos minerales primarios para la nutrición microbiana, este hallazgo explica la sobrevivencia de *B melitensis* que se adaptó a niveles intermedios de materia orgánica en suelos relativamente bajos en nutrientes. Por otro lado, *B. melitensis* al encontrarse en un ambiente extracelular en el suelo y lograr sobrevivir en éste debe de competir con la flora nativa que estuvo comprendida de Actinomicetos en su mayoría, bacterias y hongos. Los últimos se encontraron en UFC/mL muy inferiores con respecto a las otras poblaciones (**Figura 3**). La presencia de compuestos de calcio, sodio y potasio en 5 de los suelos analizados produjo pH alcalino, estas condiciones de pH permitió el desarrollo mayoritario de los actinomicetos, este hallazgo es concordante con los resultados de Stenstrom en 1989. Los cationes Ca, K, Mg y Na favorecen la adherencia bacteriana a los suelos mediante uniones con la pared celular microbiana y posteriormente, los minerales se incorporan a la fisiología de crecimiento del microorganismo. Se conoce muy poco acerca de la unión de silicatos, calcitas y otros componentes del suelo con los microorganismos, sin embargo, hay reportes de que *B. subtilis* posee sitios electropositivos dentro de sus paredes celulares para interaccionar con aniones ambientales, además de que tienen algunos aminoácidos en sus envolturas con carga positiva que pueden asociarse a aniones silicato (SiO^{3-}), explicando de esa manera su sobrevivencia en algunos suelos de cultivo (Urrutia-Mera 1993, Krumbein 1983). Los suelos analizados en este estudio presentaron una proporción del 65% de SiO2, lo que permitió la asociación de *B. melitensis* a las parículas del suelo. Otros reportes mencionan que la presencia de arcillas y kaolinitas en los suelos permite también la supervivencia de bacterias, actinomicetos y hongos filamentosos (Weinberg 1966). Los resultados de este trabajo sugieren fuertemente que *B. melitensis* es un microorganismo capaz de sobrevivir en el suelo a pesar de las condiciones ambientales estresantes, de pH, microorganismos nativos del suelo, composición mineral y la presencia de materia orgánica en cantidad intermedia. Sin embargo, se requieren más estudios que permitan conocer los mecanismos genéticos que desarrolla *Brucella* en ambientales o hábitats extracelulares.

Tabla 1. Valores de pH de los siete suelos de cultivo de Emilio Portes Gil.

Suelo	1	2	3	4	5	6	7
pH	7.9	7.9	7.9	8.8	8.9	8.3	8.6

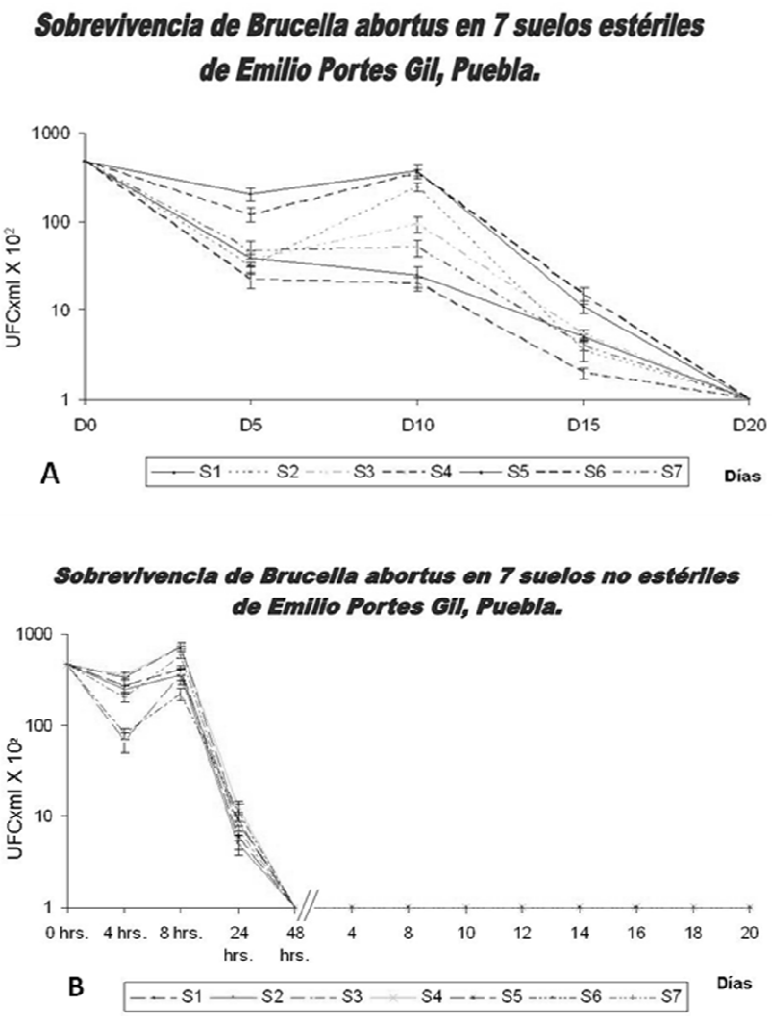


Figura 1. A) Sobrevivencia de *B. melitensis* en suelos estériles y B) no estériles de EPG. Se puede observar que la sobrevivencia de este patógeno fue mayor en los suelos estériles, mientras que en los no estériles el microorganismo sobrevivió solamente 48 horas. A pesar de que *B. melitensis* en un ecosistema natural solo sobrevivió dos días en interacción con los otros microorganismos nativos, a un pH alcalino y con un porcentaje de materia orgánica entre 6.1-10.9, éste fue capaz de resistir ambientes extremos, lo que debe estudiarse más adelante a nivel de genes y su regulación.

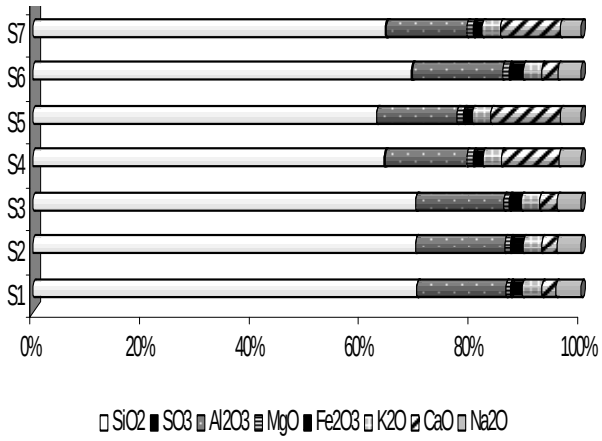


Figura 2. Composición química de siete suelos de EPG determinada por espectrometría de rayos X, reportada en porcentaje de Al_2O_3, Fe_2O_3, CaO, MgO, SO_3, Na_2O, K_2O. Se puede ver una composición similar en los suelos S1-3 y S6 y S7, variando en los suelos 4 y 5 los que tuvieron mayor porcentaje de Al_2O_3.

Tabla 2. Porcentaje de Materia Orgánica determinada en siete suelos de cultivo de EPG comparados con los valores de referencia de la NOM-021-RECNAT-2000.

Suelo	% de M.O. g/Kg
1	6.47
2	7.38
3	8.51
4	9.86
5	7.15
6	8.36
7	9.03

Valores de referencia NOM-021-RECNAT-2000		
Clase	Materia orgánica	
	suelos volcánicos	Suelos no volcánicos
Muy bajo	<4.0	<0.5
Bajo	4.1-6.0	0.6-1.5
Medio	6.1-10.9	1.6-3.5
Alto	11.0-16.0	3.6-6.0
Muy Alto	>16.1	>6.0

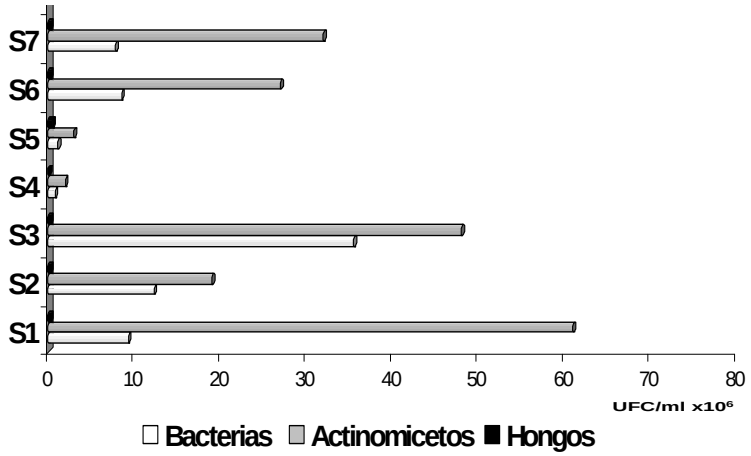


Figura 3. Microbiota nativa determinada en siete suelos de cultivo de EPG, expresada en UFC/g x 10^6**.** Se realizó la determinación de bacterias mesofílicas, actinomicetos y hongos presentes en los suelos utilizando el método de dilución en placa, en agar para cuenta estándar (pH=6.8), agar Czapek-Dox (pH=7.6) y agar Papa-dextrosa (pH=5.5), respectivamente.

CONCLUSIÓN

El suelo de Emilio Portes Gil sirvió de reservorio para *Brucella melitensis*, puesto que la cantidad de materia orgánica y los minerales le permitieron la sobrevivencia de veinte días en suelos estériles, mientras que en los suelos no estériles con una carga nativa elevada de actinomicetos, otras bacterias y hongos y un pH alcalino no fue del todo favorable para *B. melitensis*, sin embargo, logró sobrevivir por 48 horas, en estas condiciones puede constituir una fuente de infección para nuevos hospederos animales que están en contacto con el suelo a través de los forrajes que son esenciales para su alimentación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Beveridge. T. J. and S. F. Koval. 1981. Binding of metals to cell envelopes of *Escherichia coli* K-12. Appl. Environ. Microbiol. 42(2): 325-335.

Hackl E., S. Zechmeister-Boltenstern, L. Bodrossy, and A. Sessitsch. 2004. Comparison of Diversities and Compositions of Bacterial Populations Inhabiting Natural Forest Soils. Appl. Environ. Microbiol. 70 (9): 5057–5065.

Krumbein, W. E., and D. Werner. 1983. The microbial silica cycle, p. 125-157. In W. E. Krumbein (ed.), Microbial geochemistry. Blackwell Scientific Publications, New York.

NMX-AA-132-SCFI-2006. Muestreo de suelos para la identificación y la cuantificación de metales y metaloides, y manejo de la muestra. México.

NOM-021-RECNAT-2000. Espeificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis. Secretaría de medio ambiente y recursos naturales. Diario Oficial. Segunda Sección. Dic 2002. México.

S.S.E.P. 2009. Secretaría de Salud del Estado de Puebla. Boletín Epidemiológico. Coordinación Estatal de Zoonosis. Puebla, Puebla. México.

Stenstrom Thor Axel. 1989. Bacterial hydrophobicity, an overall parameter for the measurement of adhesion potential to soil particles. Appl. Environ. Microbiol. 55 (1): 142-147.

Uroz S, Calvaruso C., Turpaul M.P., Fre-Klett P. 2009. Mineral weathering by bacteria: ecology, actors and mechanisms. Trends Microbiol. Aug 4.In print.

Urrutia-Mera M. and T. J. Beveridge. 1993. Mechanism of Silicate Binding to the Bacterial Cell Wall in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 175(7):1936-1945.

Weinberg E.D. 1966. Roles of Metallic Ions in Host-Parasite Interactions. Bacteriological Reviews. 30 (1): 136-151.

Influencia del estrés térmico en la fuerza de la masa en variedades comerciales de trigo pan cultivadas en el semiárido cordobés

Influence of thermal stress on dough strength of bread wheat varieties from semi-arid area of Córdoba

Dubois ME (1), Gaido ZA (1), Manera GA (1)

(1) Cátedra de Industrias Agrícolas, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. CC 509 – 5000 Córdoba
medubois@agro.uncor.edu

RESUMEN

La ciudad de Córdoba y sus alrededores pertenecen a la subregión triguera V Norte, ubicada en la zona semiárida central del país, donde es frecuente la ocurrencia de días con temperaturas superiores a 30ºC en los meses de primavera. Picos de altas temperaturas durante el llenado del grano de trigo están relacionados con modificaciones de la calidad panadera especialmente con disminuciones en la fuerza de la masa. Se evaluó la influencia del estrés térmico en la fuerza de la masa en variedades comerciales de trigo pan cultivadas en el semiárido cordobés, clasificándolas en grupos según su sensibilidad al mismo. En el año 2007 se sembraron en el Campo Escuela de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, ubicado en la región semiárida de Córdoba (31º 29' LS y 64º 00' LW), en tres épocas de siembra, 36 variedades comerciales de trigo pertenecientes a 8 criaderos: ACA, Baguette, BioINTA, Buck, Don Mario, INTA, Klein y Sursem. Se tomaron fechas de siembra, espigazón, cosecha y temperaturas máximas diarias. Se determinó, para cada muestra, la variable estrés térmico total (ETT), definida como la sumatoria de grados de los episodios de estrés térmico (al menos 2 días consecutivos con temperaturas ≥ 30 ºC) durante el periodo del llenado del grano. Se midió el tiempo de desarrollo mixográfico (TD_{mix}) como indicador de la fuerza de la masa. Dicha variable está relacionada con el W alveográfico y el volumen del pan y ha sido utilizada por diversos autores al analizar los efectos del estrés térmico sobre la calidad de las harinas de trigo. Se realizaron análisis de la varianza y comparación entre medias por Duncan. Los valores de ETT fueron significativamente diferentes en las tres épocas consideradas (1^0 época: 31ºC ≤ ETT ≤ 36ºC, 2^0 época: 53ºC ≤ ETT ≤ 60ºC, 3^0 época: 79ºC ≤ ETT ≤ 91ºC). Los TDmix de la 1^0 y 2^0 época fueron significativamente mayores a los de la 3^0 época. Para cada una de las variedades se compararon entre sí los valores de TD_{mix} de las tres épocas, observándose si diferían por un valor ≥ a la DMS. El TDmix disminuyó en el 71% de las muestras (sensibles al estrés térmico), mientras que el 29% restante demostraron tolerancia al estrés térmico total, ya que no tuvieron variaciones en la fuerza de la masa en ninguno de los niveles considerados. En este sentido, se identificaron 8 variedades no sensibles al estrés térmico, con una mayor estabilidad en la fuerza de la masa: ACA 304, BioINTA 1000, 1002, 2002 y 3004 y Klein Carpincho, Castor y Tauro.

ABSTRACT

The city of Córdoba and its surroundings belong to the V North Argentine wheat subregion, located in the semi-arid area of the country, where the occurrence of days with temperatures superior to 30 ºC in the months of spring is frequent. Periods of heat stress during wheat grain filling are especially related with modifications of the baking quality with a decline in dough strength. The influence of heat stress was evaluated in dough strength in commercial varieties of wheat bread cultivated in the semi-arid region of Cordoba, classifying them in groups according to its sensibility. In 2007 were sowed, 36 commercial varieties of wheat belonging to 8 companies: ACA, Baguette, BioINTA, Buck, Don Mario, INTA, Klein and Sursem, in the College of Agriculture Field, located in the semi-arid region of Cordoba (31º 29 ' LS and 64º 00 ' LW), in three sowing dates. The dates of sowing, heading, harvests and daily maximum temperatures were taken. For each sample, the variable total heat stress (THS), defined as the cumulative of degrees of the episodes of heat stress (at least two consecutive days with temperatures = 30 ºC) during the grain filling period, was determined. The mixograph dough development time (MDDT) as indicator of the dough strength was measured. This variable is related

with the W alveograph and the volume of the bread. MDDT has been used by diverse authors when analyzing the effects of the heat stress on the quality of the wheat flours. Analysis of variance and comparison for Duncan were performed. The values of THS were significantly different in the three considered times (10 time: 31ºC = THS = 36ºC, 20 time: 53ºC = THS = 60ºC, 30 time: 79ºC = THS = 91ºC). The MDDT of the first one and second time were significantly bigger than those of the third time. For each varieties the values of MDDT of the three times were compared to each other, to observe if they differed for a value = DMS. The MDDT diminished in 71% of the samples (sensitive to the heat stress), while the remaining 29 % demonstrated tolerance to the total heat stress, since it didn't have variations in dough strength in none of the considered levels. In this sense, 8 varieties were identified as non sensitive to the thermal stress, with a bigger stability in dough strength: ACA 304, BioINTA 1000, 1002, 2002 and 3004 and Klein Carpincho, Castor and Tauro.

PALABRAS CLAVE: *trigo pan, estrés térmico, fuerza de la masa, tiempo de desarrollo mixográfico*.

KEYWORDS: *bread wheat, heat stress, dough strength, mixograph dough development time.*

INTRODUCCIÓN

El trigo es una de las diez cadenas agroalimentarias más significativas de la Argentina. Para lograr su competitividad es necesario asegurar su calidad, generando productos diferenciados de alto valor agregado, garantizando su homogeneidad y estabilidad en el tiempo. La Argentina posee gran disponibilidad de variedades para satisfacer los distintos mercados, variabilidad agroecológica para cultivar adecuadamente cada variedad y capacidad en recursos tecnológicos y humanos para abastecer la demanda creciente de trigos diferenciados de alta calidad (Gaido 2006).

La ciudad de Córdoba y sus alrededores pertenecen a la subregión triguera V Norte, ubicada en la zona semiárida central del país, donde es frecuente la ocurrencia de días con temperaturas superiores a 30 ºC en los meses de primavera.

Como no existe una única variable que defina adecuadamente la calidad panadera, se seleccionan algunas y se las usan como estimadores. Al evaluar generaciones tempranas se deben usar métodos rápidos y que requieran poca cantidad de material. Las curvas mixográficas brindan parámetros relacionadas directamente con el desarrollo y resistencia mecánica de la masa, entre ellos, el tiempo de desarrollo como indicados de la fuerza de la masa relacionado con el W alveográfico y usado para predecir el volumen del pan (Finney y Shogren 1972, Tombetta y Cuniberti 1994), siendo utilizada por diversos autores al analizar los efectos del estrés térmico sobre la calidad de las harinas de trigo.

Varios autores coinciden en que la temperatura durante el llenado del grano es posiblemente el factor ambiental más importante en la modificación de la calidad del trigo, y que picos de altas temperaturas durante ese periodo, pueden conducir a que el grano maduro produzca masas más débiles que las esperadas. Randall y Moss (1990) informaron que incrementos en la temperatura diaria hasta 30 ºC durante el llenado del grano generalmente aumentan la fuerza de la masa, mientras que temperaturas por encima de 30 ºC, aún por pocos días, producen trigos con masas más débiles. Wrigley *et al.* (1994), en estudios realizados durante 11 años, coincidieron con otros autores que cuando se producen picos de altas temperaturas ocasionales (superiores a 35 ºC) en momentos de sensibilidad del cultivo, en general hubo un debilitamiento de la fuerza de la masa.

La magnitud de los cambios en la calidad de la masa pareció variar con el momento del periodo de llenado del grano en que se produce el estrés y con el genotipo involucrado, considerando la existencia de genotipos diferentes en su sensibilidad o tolerancia al calor (Wrigley *et al*. 1994).

En función de los antecedentes se planteó el siguiente objetivo: evaluar la influencia del estrés térmico en la fuerza de la masa en variedades comerciales de trigo pan cultivadas en el semiárido cordobés, clasificándolas en grupos según su sensibilidad al mismo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material

Los ensayos se realizaron en el Campo Experimental de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Córdoba (31º 29' LS y 64º 00' LO), ubicado en la zona semiárida central del país, correspondiéndole la subregión triguera V Norte, donde es frecuente la ocurrencia de días con temperaturas superiores a 30 ºC en los meses de primavera.

En el año 2007 se sembraron, en tres épocas de siembra, 36 variedades comerciales de trigo pertenecientes a 8 criaderos: ACA, Baguette, BioINTA, Buck, Don Mario, INTA, Klein y Sursem.

Se utilizaron parcelas de un surco de 5 m de longitud distanciadas por 20 cm y a una densidad de 250 semillas/m2.

Durante el periodo del cultivo se registraron los siguientes datos:

-Fechas de siembra

-Fechas de espigazón: espiga totalmente emergida

-Fechas de cosecha: humedad del grano menor o igual al 20%

-Temperaturas máximas diarias.

El material cosechado fue estibado en gavillas en condiciones naturales para completar su secado. Luego se realizó la trilla y los granos fueron limpiados, acondicionados y conservados en ambiente fresco y seco, para realizar las mediciones correspondientes.

Obtención de la variable estrés térmico total (ETT) y niveles de ETT

Para cada época de siembra y para cada una de las variedades analizadas se realizó la sumatoria de los días entre la fecha de espigazón y la fecha de cosecha correspondiente, obteniendo la variable días de espigazón a cosecha (DDEC). Para obtener el periodo de llenado efectivo del grano a cada valor de DDEC obtenido se le restó el valor correspondiente al primer tercio (que en todos los casos estuvo comprendido entre 10 y 20 días) periodo considerado por la bibliografía analizada como la duración de la etapa inicial del llenado del grano, de lento crecimiento sin sustancial ganancia de materia seca. Durante el periodo de llenado efectivo del grano se determinaron, para cada variedad y en las tres épocas consideradas, los episodios de estrés térmico definidos como los periodos de al menos dos días consecutivos con temperaturas superiores a 30 ºC. Se sumaron los grados por encima de 30 ºC de dichos episodios obteniendo la variable estrés térmico total (ETT) para cada muestra.

En función de las frecuencias absolutas de ETT, para cada una de las épocas estudiados se establecieron tres niveles: bajo (ETT < 40 ºC); medio (40ºC ≤ ETT ≤ 65ºC) y alto (ETT > 65 ºC).

Obtención de la variable de calidad

Los materiales se molieron en forma individual utilizando un molino Brabender Quadrumat Junior, apto para muestras pequeñas. Con la harina obtenida se realizaron las mediciones para la obtención del tiempo de desarrollo mixográfico como indicador de la fuerza de la masa.

Los mixogramas se realizaron usando el Mixógrafo de Swanson. La metodología utilizada corresponde a las normas AACC Nº 54-40. Las curvas mixográficas fueron analizadas obteniéndose las variables tiempo de desarrollo (TD_{mix})

Se utilizaron las instalaciones y la metodología de análisis del Laboratorio de Calidad de Cereales y Oleaginosas del INTA Marcos Juárez.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos se trataron estadísticamente mediante un análisis de la varianza (ANOVA) y las medias fueron comparadas por Duncan a un nivel de significación del 0,05

Se usó el Software Estadístico InfoStat/P (2005).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al analizar el comportamiento de las variables en estudio, utilizando a las épocas de siembra como variable de clasificación, se observó que si bien los valores de ETT fueron significativamente diferente en las 3 épocas consideradas, las medias de TD_{mix} de las 2 primeras épocas fueron significativamente mayores a la de la tercera época, pero no difirieron entre sí (**Tabla 1**).

Tabla 1. Valores medios para las variables tiempo de desarrollo mixográfico (TD_{mix}) y estrés térmico total (ETT) observados en las 3 épocas de siembra

	VARIABLES	
ÉPOCAS	ETT ºC	TD_{mix} min
1ª	31,99 a	5,29 b
2ª	53,47 b	5,25 b
3ª	87,83 c	4,80 a

* En cada columna, letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

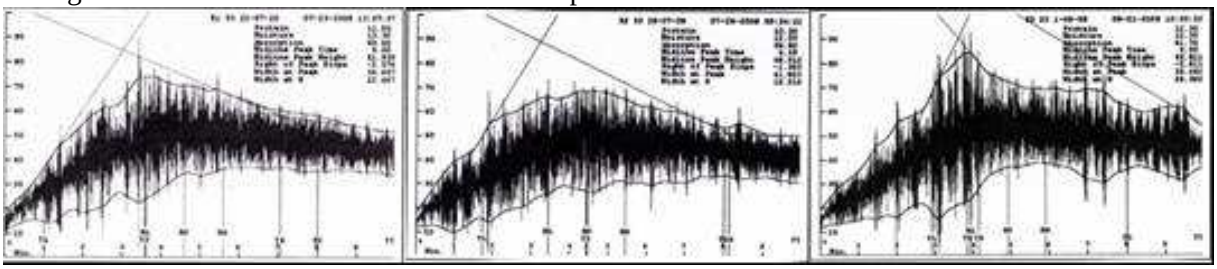
En función de los resultados obtenidos, se compararon entre sí los valores de TD_{mix} para cada variedad estudiada observándose si diferían por un valor ≥ 0,60, y se clasificaron las variedades en dos grupos:

- Grupo 1: todas aquellas variedades cuyos TD_{mix} de la 1º y 2º época no difirieron del correspondiente al de la 3º época.
- Grupo 2: todas aquellas variedades cuyos TD_{mix} de la 1º y 2º época difirieron del correspondiente al de la 3º época.

El TD_{mix} varió en el 71% de las muestras (Grupo 2), mientras que el 29 % restante, pertenecientes al Grupo 1, demostraron tolerancia al estrés térmico total, ya que no tuvieron variaciones en la fuerza de la masa en ninguno de los niveles considerados.

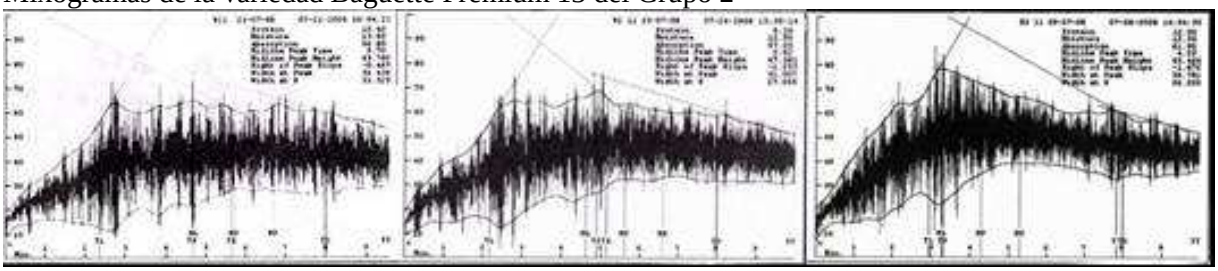
En la **Figura 1** se muestran ejemplos de mixogramas de los Grupos 1 y 2. Los mixogramas grafican la resistencia que opone la masa al movimiento del brazo del mixógrafo. El pico máximo se corresponde al punto de mínima movilidad o máxima resistencia de la masa y representa al requerimiento del tiempo de amasado en minutos (TD_{mix}). En los mixogramas del Grupo 1, variedades no sensibles al ETT, se observa la similitud en los TD_{mix} del trío. En los del Grupo 2, variedades sensibles al ETT, se advierten las diferencias entre los TD_{mix} correspondientes a la 1ª y 2ª época respecto al la 3º.

Mixogramas de la variedad Klein Tauro del Grupo 1



1° época (TD_{mix} 4,6) 2° época (TD_{mix} 4,45) 3° época (TD_{mix} 4,92)

Mixogramas de la variedad Baguette Premium 13 del Grupo 2



1° época (TD_{mix} 5,7) 2° época (TD_{mix} 5,62) 3° época (TD_{mix} 4,29)

Figura 1. Ejemplos de mixogramas del grupo 1 y 2, en las 3 épocas de siembra

Los análisis realizados muestran que solamente en las variedades del Grupo 2, el tiempo de desarrollo mixográfico varió significativamente en el nivel alto de estrés térmico. De acuerdo al diferente comportamiento que en ambos grupos presentó la variable TD_{mix} frente a los ETT, se puede considerar a las variedades del Grupo 1 como no sensibles al ETT y a las del Grupo 2 como sensibles al ETT.

Los resultados obtenidos son coincidentes con algunas investigaciones que mostraron que periodos de altas temperaturas ocurridos durante el llenado efectivo del grano, alteran la calidad final del trigo, dependiendo de la intensidad y duración del estrés (Savin 2001). Diversos autores (Finney y Shogren 1972, Randall y Moss 1990, Blumenthal *et al.* 1991a y 1991b, Wrigley *et al.* 1994, Cuniberti 2000) comprobaron que la fuerza de la masa disminuye con picos de estrés térmico ocasionales, situación que en el presente estudio, se manifiesta en mayoría de las variedades sensibles a ETT (Grupo 2). Se comprobó que el TD_{mix} disminuyó significativamente cuando los grados acumulados por encima de 30 ºC fueron superiores a 65. Se usó el TD_{mix} por ser un reconocido índice de la fuerza de la masa relacionado con el W alveográfico y el volumen del pan (Finney y Shogren 1972; Tombetta y Cuniberti 1994), y es utilizado por diversos autores al analizar los efectos del estrés térmico sobre la calidad de las harinas de trigo (Wrigley *et al.* 1994, Cuniberti 2000, Gaido 2006, Gaido y Dubois, 2008).

Estudios realizados por Randall y Moss (1990) y Wrigley *et al.* (1994) demostraron que temperaturas superiores a 30 °C, incluso por periodos de sólo 3 días, tienden a disminuir la fuerza de la masa y que este efecto ocurre aparentemente de manera independiente de los efectos de la temperatura sobre la concentración proteica. Este comportamiento se puede explicar con la hipótesis de que los episodios ocasionales de altas temperaturas durante el llenado del grano, activan elementos asociados con los genes que codifican para gliadinas, aumentando su contenido en el grano maduro. Como consecuencia el grano maduro tiene una alta relación Gli/Glu y produce masas más débiles y con menores tiempos de desarrollo (Blumenthal *et al.* 1991a 1991b y 1993, Savin 2001). En el caso del material analizados en este trabajo, los episodios de estrés térmico ocurrieron durante el llenado efectivo del grano, época en la que se están formando activamente las proteínas del gluten, por lo que, probablemente, las disrupciones en el llenado de los granos, provocadas por los picos de estrés térmico, pudieron haber alterado la composición de las fracciones proteicas, o sea su relación Gli/Glu (Slafer *et al.* 2004).

En síntesis la línea de investigación experimental demostró que el estrés térmico total, provocó importantes cambios en la calidad panadera de la mayoría de las variedades en estudio. El 29% de las variedades estudiadas (Grupo 1) demostraron tolerancia al estrés térmico total, ya que no tuvieron variaciones en la fuerza de la masa medida por el tiempo de desarrollo mixográfico, en ninguno de los niveles considerados.

CONCLUSIONES

El TD_{mix} varió en el 71% de las muestras (sensibles al estrés térmico), mientras que el 29% restante demostraron tolerancia al estrés térmico total, ya que no tuvieron variaciones en la fuerza de la masa en ninguno de los niveles considerados. En este sentido, se identificaron 8 variedades no sensibles al estrés térmico, con una mayor estabilidad en la fuerza de la masa: ACA 304, BioINTA 1000, 1002, 2002 y 3004 y Klein Carpincho, Castor y Tauro.

Estos resultados son interesantes para el fitomejoramiento ya que permitirían identificar variedades no sensibles al estrés térmico para ser usados como progenitores a fin de lograr generaciones con tolerancia al calor y en consecuencia con mayor estabilidad en la calidad de la masa.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Blumenthal C, Bekes F, Batey IL, Wrigley CW, Moss HJ, Mares DJ, Barlow EWR. 1991a. Interpretation of grain quality results from wheat variety trials with reference to high temperature stress. Australian Journal of Agricultural Research, 42: 325-334.

Blumenthal C, Batey IL, Bekes F, Wrigley CW, Barlow EWR. 1991b. Seasonal changes in wheat-grain quality associated with high temperatures during grain filling. Austalian Journal of Agricultural Research, 42: 21-30.

Blumenthal C, Barlow EWR, Wrigley CW. 1993. Growth environment and wheat quality: the effect of heat stress on dough properties and gluten proteins. Journal of Cereal Science, 18: 3-21.

Cuniberti MB. 2000. Caloric stress and their effect in the argentine wheat quality. 11th Cereal and Bread Congress. Queensland, Australia, p. 144.

Finney K, Shogren MD. 1972. A ten-gram mixograph for determining and predicting functional properties of wheat flours. Baker Digest, 46: 32-77.

Gaido ZA, Dubois ME. 2008. Influencia del estrés térmico en la calidad panadera del trigo: progenies con diferentes niveles de sensibilidad. Agriscientia, XXV(2):7-14.

Gaido ZA. 2006. Influencia del estrés térmico en la calidad panadera de líneas de trigo (*Triticum aestivum* L.) cultivadas en la región semiárida de la provincia de Córdoba. Tesis de Maestría en Tecnología de los Alimentos. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Católica de Córdoba, 89 pp.

InfoStat/P, InfoStat Profesional, versión. 2005. Grupo InfoStat, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba.

Randall PJ, Moss HJ. 1990. Some effects of temperature regime during grain filling on wheat quality. Australian Journal of Agricultural Research, 41:603-617.

Savin R. 2001. La calidad del grano de trigo. Determinantes fisiológicos. Trigo Cuaderno de Actualización Técnica Nº 63, AACREA, pp.104-110.

Slafer GA, Miralles D, Savin JR, Whitechurch EM, González FG. 2004. Ciclo ontogénico, dinámica del desarrollo y generación del rendimiento y la calidad en trigo. En: Producción de granos. Bases funcionales para su manejo. Editorial Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Buenos Aires, Argentina, pp. 99-132.

Tombetta EE, Cuniberti MB. 1994. Utilización del mixógrafo de Swanson para la evaluación de la calidad en los programas de mejoramiento de trigo pan. Informe Técnico No 105, EEA INTA Marcos Juárez. 17 pp.

Wrigley CW, Blumenthal C, Gras PW, Barlow EWR. 1994. Temperature variation during grain filling and changes in wheat grain quality. Australian Journal Plant Physiology, 21: 875-885.

Desarrollo de un programa de buenas prácticas agrícolas globales en la producción de miel en el valle de Conlara, Argentina

Development of agricultural practice programme in honey production in Conlara valley, Argentina

Faillaci S M[1], Barrionuevo V R[2], Miropolsky A G [1], González, M P[1], Zygaglo J[1]

[1]Centro de Vinculación BioGestión. [1]ICTA- Fac.Cs. Exactas, Físicas y Naturales – UNC - Argentina
[2]Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba - Argentina
Av. Vélez Sarsfield 1611 - CPA X5016GCA.Edificio de Investigaciones Biológicas y Tecnológicas
Ciudad Universitaria - Córdoba – Argentina.
silvinafaillaci@gmail.com

RESUMEN

Las Buenas Prácticas Agrícolas Globales (Global-GAP) fueron diseñadas para brindar confianza al consumidor acerca del proceso de producción primaria de alimentos. Sus principios son la sostenibilidad de los recursos y el cuidado del ambiente, la salud y seguridad de los trabajadores y el bienestar de los animales.

Las colonias de abejas desarrollan un conjunto de actividades productivas, higiénicas y de conservación de alimentos, como parte de su etología. La resultante de este natural comportamiento es la calidad e inocuidad de miel y polen que consumen.

Se destacan las actividades de transformación físico-química del néctar en miel; el revestimiento interior con propóleos del "envase original de sus alimentos"; la regulación de temperatura y humedad interior; la distancia entre sí de las colonias silvestres, entre otras.

La actividad del hombre, al reunir en una pequeña área a varias decenas de colmenas para facilitar su manejo productivo y en general, al intervenir sobre las variables del proceso, incrementan los riesgos de alteración y contaminación cruzada del producto.

El objetivo de este trabajo fue diseñar un programa de gestión bajo el referencial *Global-GAP* en producción primaria de miel en el Valle de Conlara, provincia de San Luis, República Argentina.

La metodología consistió en: 1. análisis del contexto geográfico y ambiental de la región; 2.caracterización de factores principales y determinación de las zonas o sub-etapas del proceso de producción primaria; 3.identificación de las variables clave que pueden afectar la inocuidad en cada zona; 4.identificación de los peligros potenciales y evaluación del riesgo; 5.diseño de un programa basado en Global-GAP bajo el concepto de gestión sistémica con soporte documental; y 6.definición de acciones para mejorar la calidad y asegurar la inocuidad del producto.

Como resultado fueron identificadas como zonas relevantes para la gestión de la calidad e inocuidad: Zona A) Apiario: materiales de colmenas; productos de protección de materiales; productos de combustión (ahumador); cera estampada y obrada; medicamentos veterinarios; alimentos para abejas; humedad de miel; humedad ambiente en cosecha; herramientas para manejo de colmenas; vehículos e implementos de cosecha y traslado. Zona B) Establecimiento de extracción y acopio: condiciones edilicias; personal; maquinarias y herramientas; productos de limpieza y desinfección; humedad y temperatura ambiente; desoperculado de panal; separación de miel y cera; envases.

Las conclusiones fueron:

- El contexto ambiental de producción (con epicentro en la colonia misma), es el factor medular en la gestión de calidad e inocuidad del producto.
- La definición de las variables clave en el desarrollo de Global-GAP, otorgó un marco de trabajo simple y eficaz para el productor.
- El carácter genérico del modelo de gestión lo hace transferible a zonas de características fitogeográficas diferentes.

ABSTRACT
The Global Good Agricultural Practices (Global-GAP) were designed to make the consumer confidente about the food primary production process. Its principles are the sustainability of resources and the environmental care, health and safety of workmen and welfare of animals.
The colonies of bees develop a set of productive and hygienic activities, and activities of food conservation, as a part of their ethology. The quality and safety of the honey and pollen they produce is a result of this natural behavior.
The activities of physicochemical transformation of nectar into honey, the internal coating of its own food containers with propolis, the internal regulation of temperature and moisture, the distance between wild colonies, among others, are highlighted.
Human activities, when gathering into a small area several dozens of hives to make the productive handling easier and intervening over the variables process variables, increase the risks of alteration and cross-contamination of the product.
The objective of this labor was to design a Management program under referential Global-GAP in primary production of honey in Valle de Conlara, San Luis province, Argentina.
The methodology consisted in: 1. Analysis of geographical and environmental context of the region: 2. characterization of the main agents and determination of zones or sub-stages of the process of primary production; 3.Identification of key variables that might affect the safety in each zone; 4.Identification of potential hazards and risk assessment; 5.Design of a program based on Global-Gap under the concept of systemic management with documentary support; and 6. Definition of actions to improve quality and to assure the product safety.
As a result, relevant zones were identified for quality and safety management: Zone A)Apiary: materials of hives; material protection products; combustion products (smokehouse); worked and stamped wax; veterinary drugs; bee food; honey moisture; environment moisture in harvest; hive handling tools; harvesting and transportation vehicles and implements. Zone B) Extraction and gathering establishment; building conditions; crew; machinery and tools, cleaning and disinfection products; environment moisture and temperature; removing cap honeycomb; separation of honey and wax, packages.
Conclusions were:
- The environmental context for production (with an epicenter in the colony itself), is the factor in the product quality and safety management.
- The definition of key variables in the development of Global-Gap, granted a simple and effective framework for the producer.
- The generic nature of the management model itself makes it transferable to zones with different phytogeographical characteristic.

PALABRAS CLAVE: *Buenas Prácticas, global, miel, producción primaria.*

KEYWORDS: *Good Practices, Global, honey, primary production.*

INTRODUCCIÓN Y FUNDAMENTACIÓN
La apicultura argentina continúa siendo uno de los principales protagonistas del mercado mundial, ya que cuenta con diversas ventajas comparativas y competitivas.
Figuran entre ellas una oferta floral importante, amplitud de climas para la producción, vastas extensiones no contaminadas donde prospera flora autóctona, buena calidad de la miel y de otros productos de la colmena.
Se suma a eso un sistema de trazabilidad considerado modelo en su tipo y reconocido por los principales compradores.
En los años 2007 y 2008 se exportaron alrededor de 70.000 Tn. representado una merma del 30 % respecto del año 2006.
Aún así, Argentina es el tercer productor mundial, después de China y Estados Unidos y representa el 70% de la miel de América del Sur el 6% del total mundial.
Nuestro país exporta algo más del 95% de su producción y de este total, el 98% del producto comercializado es a granel y alrededor del 2% se exporta como miel diferenciada.

Nuestros principales destinos son Alemania, seguido por Estados Unidos, Italia, Reino Unido y España. Algunos mercados que aparecen como potenciales son Sudáfrica, Finlandia, Países Árabes, Indonesia, Ecuador, Australia y Noruega.
En los últimos años se observa un incremento importante en la cantidad de destinos de exportación y en la participación de algunos de ellos. Por ejemplo, Arabia que ya se encuentra dentro de los primeros 10 países compradores al igual que Australia y Canadá.
Los principales países importadores de miel además de ser importantes consumidores de productos apícolas, también son exigentes en materia de calidad y resaltan la importancia de resguardar la salud del consumidor.
Por este motivo (Nimo 2007), exigen que las mieles ingresen libres de residuos y de contaminantes o con certificados sanitarios que avalen, no solamente al producto, sino a los establecimientos de los cuales provienen los productos.
Argentina aún continúa siendo reconocida como proveedora de miel sin ningún tipo de diferenciación, productos que actualmente en el mercado internacional son altamente cotizados y que pueden significar en el mediano plazo un incremento significativo en las ventas y en la concepción del negocio apícola.
Los resultados alcanzados a la fecha se basan exclusivamente en la venta de un commodity -producto a granel no diferenciado- y teniendo en cuenta la tendencia actual de los mercados hacia productos diferenciados por su calidad, origen botánico, geográfico, denominación de origen (DO), etc. que son requeridos por sus propiedades particulares entre los consumidores de los países compradores, Argentina cuenta con un extraordinario potencial para desarrollar estos productos.
Por otro lado, la sustentabilidad de la empresa apícola radicada en la región pampeana -núcleo de desarrollo inicial de la apicultura argentina-, resulta fuertemente amenazada dado los bajos rendimientos obtenidos en los últimos años. Ello obedece principalmente al notable avance de la frontera agrícola y a la merma del área de bosque natural, que afectan a ésta y otras producciones.
Por ello, la apicultura argentina debe necesariamente reconvertirse en función de la expansión de la frontera agrícola (Zorzin 2007), ya que el rédito económico de monocultivos como la soja, el maíz o girasol desplazan la apicultura y restan competitividad a otras producciones como la de frutas y hortalizas y la producción de carne en el tradicional sistema de pastoreo
En el caso de la miel, las exigencias sobre su calidad e inocuidad se centran en la garantía de que el producto esté libre de contaminantes químicos provenientes de residuos de medicamentos usados en el control de enfermedades de las abejas y/o de agroquímicos utilizados en la agricultura. A los anteriores se agrega la importancia de la autenticidad del producto y la ausencia de contaminación de origen microbiológico (Oyarzun *et al* 2005).
Como contrapartida, las colonias de abejas desarrollan un conjunto de actividades productivas, higiénicas y de conservación de alimentos, como parte de su etología. La resultante de este natural comportamiento es la calidad e inocuidad de miel y polen que ellas producen y consumen.
Se destacan las actividades de transformación físico-química del néctar en miel; el revestimiento interior con propóleos del “envase” original de sus alimentos; la regulación de temperatura y humedad interior; la distancia entre sí de las colonias silvestres, entre otras.
Sin embargo, la actividad del hombre al reunir en una pequeña área a varias decenas de colmenas para facilitar su manejo productivo y en general, al intervenir sobre las variables del proceso, incrementan los riesgos de alteración y contaminación cruzada del producto.
Resulta necesario entonces, proveer al productor apícola, conocimientos sobre nuevas estrategias de producción y herramientas de gestión de calidad e inocuidad, exigencias que día a día se incrementan, para ser aplicadas en ambientes naturales y no agrícolas, áreas donde se prevé continuará el desarrollo de la actividad apícola Argentina.
Precisamente, en la producción primaria de alimentos, una de las principales herramientas de gestión de calidad e inocuidad son las Buenas Prácticas Agrícolas Globales (Global-GAP).
Este referencial técnico fue diseñado principalmente para brindar confianza al consumidor acerca de la manera que se lleva a cabo la producción agropecuaria, minimizando el impacto perjudicial de la explotación en el medio ambiente, reduciendo el uso de insumos químicos y asegurando un proceder responsable en la salud y seguridad de los trabajadores, como también en el bienestar de los animales.

GLOBALGAP oficia de manual práctico y se ha establecido en el mercado global como referente clave en cuanto a las Buenas Prácticas Agrícolas, logrando que los requisitos del consumidor se vean reflejados en la producción de cada vez más países.

OBJETIVOS

Diseñar un programa de gestión bajo el referencial Global-GAP en producción primaria de miel en el Valle de Conlara, provincia de San Luis, República Argentina.

ALCANCES

El presente trabajo comprende la etapa de producción primaria de miel de abejas, que incluye la producción a campo, cosecha, extracción y envasado a granel.
En el mercado internacional, el producto obtenido hasta aquí, se conoce también como miel cruda (no industrializada).

METODOLOGÍA

La Metodología propuesta para el diseño del programa de gestión comprende los siguientes pasos:

1. Análisis del contexto geográfico y ambiental de la región.
2. Caracterización de factores principales y determinación de las zonas o sub-etapas del proceso de producción primaria.
3. Identificación de las variables clave que pueden afectar la inocuidad en cada zona.
4. Identificación de los peligros potenciales y evaluación del riesgo.
5. Diseño de un programa basado en Global-GAP bajo el concepto de gestión sistémica con soporte documental.
6. Definición de acciones para mejorar la calidad y asegurar la inocuidad del producto.

INFRAESTRUCTURA Y RECURSOS MATERIALES

Centro de Vinculación BioGestión. Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales. UNC
Facultad de Ciencias Agropecuarias. UNC

DESARROLLO

Análisis del contexto geográfico y ambiental de la región

El Valle de Conlara es un valle fértil ubicado en el Noreste de la provincia de San Luis, comprende las terrazas y faldeos -abanicos aluviales del Río Conlara- que se encuentran entre las sierras Comechingones y las sierras de San Luis (**Figura 1**).

Figura 1. Ubicación del Valle de Conlara.

Se destacan dos subzonas; la principal, el Valle de Conlara propiamente dicho, asociado al curso medio y bajo del río homónimo y a modo de cuña en la provincia de Córdoba (Capitanelli 2007), la subzona del Valle de Traslasierra, abierta al Sudeste hacia la planicie de San Luis.
El clima es templado subhúmedo serrano, en razón de la disposición norte-sur de los cordones montañosos que interrumpen la circulación de las masas de aire. Las temperaturas son modificadas por las alturas y cambian las precipitaciones, alcanzando en las cumbres mayor cantidad de lluvias y nieve en invierno, dando como resultado la presencia de un microclima.
El valle comprende numerosas localidades de interés turístico como Merlo, Santa Rosa de Conlara, Carpintería, Los Molles, Concarán, Tilisarao, Naschel, entre otras (**Figura 2**).

Figura 2. Localidades del Valle de Conlara. San Luis.

La humedad relativa es baja y la temperatura media anual es de 16.6 ºC, con máximas de 32.2ºC y mínimas de 3.2ºC, las precipitaciones alcanzan los 600 mm anuales con máximos registros en la parte alta de las sierras.
La vegetación pertenece a la Provincia Fitogeográfica Chaqueña (Cabrera 1976), gran parte de la región -porción Oeste- corresponde al Distrito Occidental y el sector oriental al Distrito Serrano, por lo cual la región presenta características ecotonales propias de la interrelación entre ambas.
La vegetación es un mosaico de comunidades boscosas y sus estados sucesionales de estructura similar a la del Bolsón Chaqueño. En el estrato arbóreo predominan el quebracho blanco *(Aspidosperma quebracho blanco)*, algarrobo blanco *(Prosopis blanco)* y algarrobo negro *(Prosopis nigra)*, retamo *(Bulnesia retama)*, brea *(Cercidium praecox)*, y mistol *(Ziziphus mistol)*. El estrato arbustivo está representado por especies como jarilla *(Larrea divaricata)*, lata *(Mimozyganthus carinatus)*, piquillín

(Condalia microphylla), moradillo *(Schinus fasciculata)*, espinillo *(Acacia caven)*, tusca *(Acacia aroma)*, garabatos *(Acacia spp.)*, palo amarillo *(Aloysia gratissima)* y chañar *(Geoffroea decorticans)* (Oliva *et al* 2006).

En esta región de la provincia de San Luis (Chebez 2006), se encuentran dos áreas naturales protegidas -Nacientes del río Conlara y Sierra de Comechingones- en el marco del Sistema de Areas Naturales Protegidas de San Luis (SANP) que integra a 38 áreas naturales protegidas mencionadas en la Ley Provincial N° 5421 del año 2003.

La diversidad de especies de interés apícola presentes en el valle les permite a las colonias de abejas recolectar néctar y polen -energía y proteína- para llevar adelante con éxito sus procesos biológicos. Estas materias primas dan origen a los alimentos cuyos excedentes son cosechados por el apicultor.

La región tiene un alto potencial de producción de miel orgánica, en su mayoría monofloral, cualidades muy apreciadas por el consumidor.

Caracterización de factores principales y determinación de las zonas o sub-etapas del proceso de producción primaria.

En la cadena alimentaria de la miel intervienen numerosos actores organizados bajo una estructura típica (Figura N° 3). En ella, la etapa de producción primaria comprende a su vez dos procesos centrales: la producción y cosecha y la extracción de la miel.

Dicha etapa es ejecutada por un gran número de productores independientes o asociados bajo distintas figuras, siendo la más común, las cooperativas de productores.

En cuanto al proceso de producción y cosecha, debemos considerar que no se limita al acopio y transformación de néctar en miel en el período primavero-estival, sino que se inicia con la preparación y acondicionamiento de las colmenas en el otoño anterior, es decir, el productor apícola tiene en este proceso una variada y prolongada intervención.

El segundo proceso, que puede realizarse en pocas horas, consiste básicamente en extraer por centrifugación la miel de los panales, filtrarla y luego decantarla para finalmente envasarla. Se trata entonces de una acción mecánica y física sin transformación del producto original.

Para el diseño del programa de gestión en la producción primaria, se identifican factores principales, vinculados a la calidad e inocuidad del producto, y se organizan y clasifican como sigue:

Sub-etapa o Zona A: Apiario

a. Ubicación de apiarios
b. Productos de protección de materiales
c. Productos de combustión (ahumador)
d. Cera estampada y obrada
e. Medicamentos veterinarios
f. Alimentos para abejas
g. Humedad de miel
h. Humedad ambiente en cosecha
i. Herramientas para manejo de colmenas
j. Vehículos e implementos de cosecha y traslado

Sub-etapa o Zona B: Establecimiento de extracción de miel

a. Condiciones edilicias
b. Personal
c. Maquinarias y herramientas
d. Productos de limpieza y desinfección
e. Humedad y temperatura ambiente
f. Desoperculado de panal
g. Separación de miel y cera
h. Envases

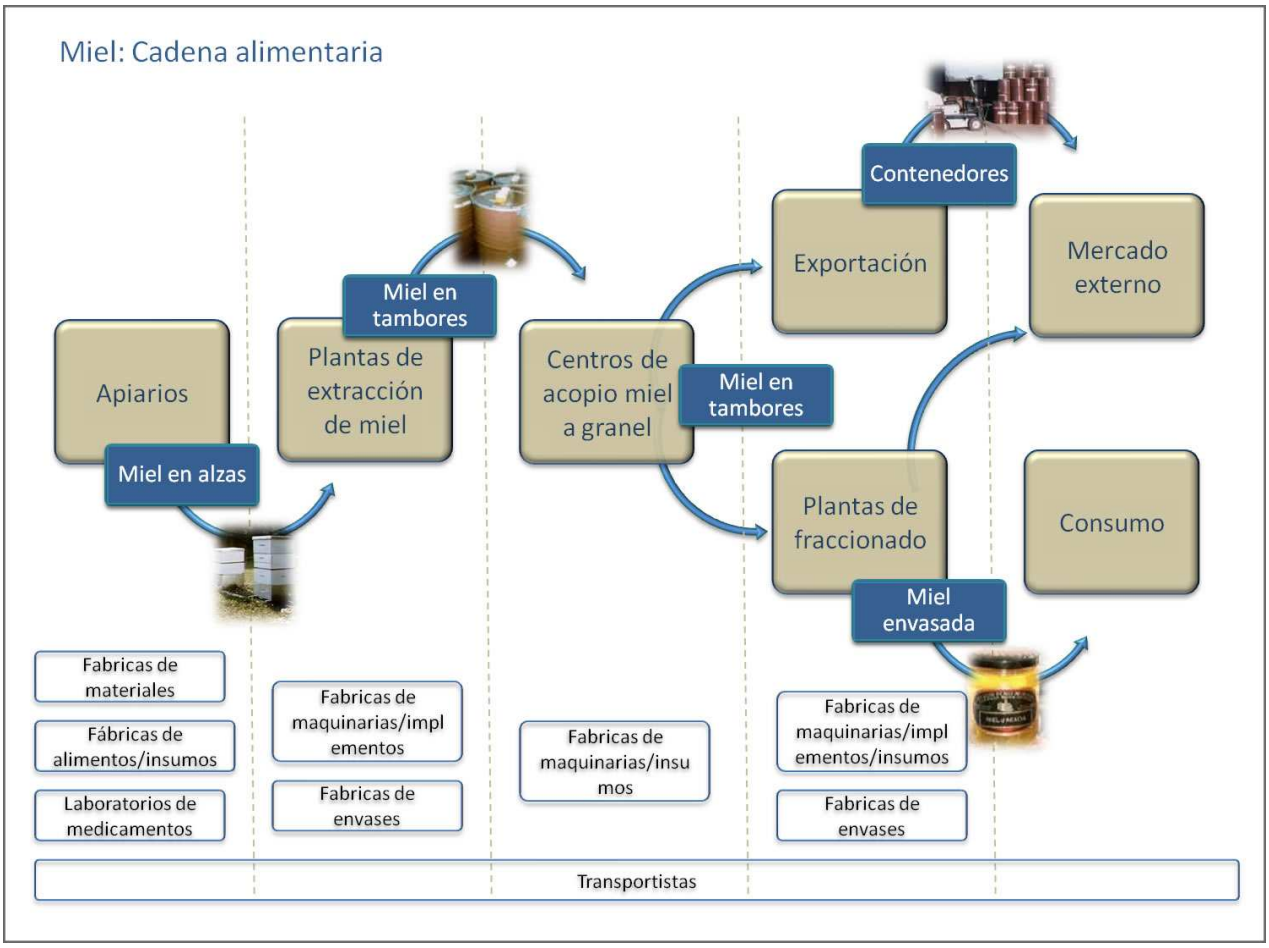


Figura 3. Cadena alimentaria de miel

Identificación de las variables clave que pueden afectar la inocuidad en cada zona

Las variables a considerar, que pueden afectar la inocuidad, se distribuyen de la siguiente manera:

Zona A: Apiario

- Distancia a áreas urbanas o zonas con riesgo de contaminación
- Tipos y modo de empleo de productos de protección y mantenimiento de materiales apícolas
- Tipos y fechas de aplicación de productos veterinarios
- Clases de sustitutos energéticos utilizados y época de suministro
- Grado de madurez de la miel
- Porcentaje de humedad relativa
- Método de desabejado de alzas melarias
- Medio de transporte y acondicionamiento de alzas melarias

Zona B: Establecimiento de extracción de miel

- Diferenciación y división de áreas específicas
- Diseño de áreas específicas
- Materiales de pisos, paredes y techos
- Ventilación e iluminación
- Método de desoperculado
- Características de los equipos en contacto con la miel
- Tipos de tamizado y tiempo de decantado
- Entrenamiento y conducta del personal
- Procedimientos de limpieza y desinfección y eliminación de desechos
- Procedimientos de control de plagas

Identificación de los peligros potenciales y evaluación del riesgo

Para la evaluación del riesgo en el proceso de producción primaria de miel, se identificaron los siguientes peligros potenciales:

Peligros químicos

- Contaminación por agroquímicos
- Contaminación por emisiones industriales
- Presencia de residuos de medicamentos
- Adulteración con sustitutos energéticos
- Presencia de metales pesados
- Alta concentración de Hidroxi Metil Furfural (HMF)

Peligros biológicos

- Contaminación por efluentes cloacales
- Excretas de roedores
- Humedad de miel excesiva
- Presencia de mohos y levaduras

Peligros físicos

- Presencia de tierra y polvo ambiental
- Restos de abejas y/o cera

Diseño de un programa basado en Global-GAP bajo el concepto de gestión sistémica con soporte documental

Se debe contar con un soporte documental donde se registren todas las operaciones realizadas, tanto en el campo como en las plantas de extracción de miel.

El sistema debe contener un registro de producción por apiario, donde se registren todas las actividades vinculadas a las Buenas Prácticas referidas a rendimientos, tratamientos sanitarios, suplementación energética y proteica, cosecha, etc.

Deben registrarse además, todos los movimientos de colmenas y de materiales que se realicen, así como las tareas de mantenimiento de estos.

Al cosechar un apiario, se requiere asentar en una ficha de cosecha y transporte de alzas melarias los datos de identificación del apiario y el número de alzas cosechadas.

En la sala de extracción, cada lote recepcionado se acompañará de su correspondiente ficha de cosecha y transporte de alzas melarias, donde asentará su peso bruto e identificará individualmente.

El sector de recepción y descarga deberá llevar un registro por cada lote recepcionado y deberá existir un registro anual de tambores, en el que se registrará toda entrada y salida de tambores, con su numeración y origen y cualquier otra observación que involucre a los tambores.

Se designa como lote a la cantidad identificable de productos recepcionados, depositados o entregados que poseen características comunes en cuanto al origen, proceso de extracción y fecha de elaboración.

Definición de acciones para mejorar la calidad y asegurar la inocuidad del producto

Con el fin de mejorar la calidad y asegurar la inocuidad del producto, se distinguen medidas a implementar para cada zona.

Zona A: Apiario

Buenas prácticas de manejo

La actividad apícola se debe desarrollar aquellas áreas que la legislación vigente lo permita, teniendo en cuanta que si existen parques industriales cercanos, los apiarios deberán ubicarse a más de 1,5 Km., por el riesgo de contaminación ambiental debido a los efluentes y emisiones gaseosas que puedan generarse.

También se evitará la instalación de apiarios próximos a establecimientos de producción porcina y animales de granja debido al riesgo de contaminación con desechos de estas producciones.

Se deben llevar registros de las prácticas de manejo que se realicen en cada apiario como tratamientos sanitarios, alimentación artificial, movimiento de colmenas, multiplicación de material vivo, agregado de alzas melarias, etc.

Se recomienda utilizar material de madera de medidas estandarizadas, empleándose de referencia la Norma IRAM 114001:2000.

Los materiales de colmenas deben ser de madera o de cualquier otro elemento inerte y neutro que no contamine y/o afecte la calidad de la miel.

El material de combustión de los ahumadores debe ser de tipo vegetal, tratando de que la utilización de humo en las colonias sea el menor posible. No deben aplicarse residuos de maderas tratadas ni productos combustibles derivados de hidrocarburos, cartón o papel de diario.
Los ahumadores no deben apoyarse sobre los cabezales de los marcos de las alzas melarias para evitar el derrame de líquidos de la combustión y deben limpiarse periódicamente.
Para el mantenimiento y/o desinfección del material de madera deben utilizarse únicamente los tratamientos aprobados para tal fin como la inmersión en cera microcristalina o parafina de de uso alimentario, pinturas sintéticas y/o base de aceites, aceites vegetales, autoclavado e irradiación gama.
En el caso de pinturas se prohíbe su uso en el interior de cámaras de cría y alzas melarias y en bordes de apoyo de las alzas.
Se recomienda que los panales obrados de las cámaras de cría sean renovados de acuerdo a la pigmentación y al tiempo de uso, dada la implicancia que tiene el tiempo de uso de los cuadros en la contaminación química y microbiana.
No se deberán rotar cuadros de las cámaras de cría a las alzas melarias.

Buenas prácticas de manejo sanitario

Las revisiones sanitarias deben realizarse al menos dos veces por año en cada apiario, siendo las más oportunas las correspondientes a otoño y primavera.
Resulta indispensable que el productor esté capacitado el diagnóstico sanitario para una correcta toma de decisiones.
Se recomienda utilizar sólo los productos veterinarios aprobados, siguiendo las recomendaciones del fabricante y respetando los períodos de carencia con el fin de asegurar que la miel no contendrá trazas del medicamento o sus metabolitos por encima del Límite Máximo de Residuos (LMR).
Los tratamientos sanitarios con medicamentos solamente serán de carácter curativo ya que está prohibido realizar tratamientos de tipo preventivo. No se podrá aplicar un tratamiento sanitario con alzas melarias presentes en las colmenas.
Se deben registrar todas las observaciones y/o actividades de manejo sanitario

Buenas prácticas de manejo en la alimentación artificial

No se debe utilizar miel para alimentar las colmenas, a fin de prevenir la alimentación con esporas de enfermedades de la cría. Puede utilizarse sacarosa o jarabe de maíz de alta fructosa exclusivamente cuando las colmenas se encuentren en cámara de cría y en época alejada del acopio de miel dado el riesgo de adulteración de la misma.
Debe llevarse un registro del producto utilizado, la cantidad administrada y su fecha.

Buenas prácticas de manejo en la cosecha de miel

Únicamente se podrán cosechar alzas melarias y/o cuadros de miel de alzas melarias, nunca de cámaras de cría. Se sugiere observar el porcentaje de operculado para estimar la humedad de la miel. No se deben cosechar cuadros con celdas de cría ya sean abiertas o selladas.
Para la cosecha, se recomienda organizar lotes de colmenas por apiario. Para esto se puede identificar cada alza melaria con un número.
Para el desabejado del material melario se recomienda utilizar métodos físicos como los sopladores de aire. Se prohíbe utilizar cualquier tipo de repelentes químicos.
Las alzas melarias y los cuadros no deben tomar contacto directo con el suelo.

Buenas prácticas de manejo en la carga y transporte de alzas melarias

Para el transporte de alzas melarias deben utilizarse vehículos sanitariamente adecuados, según lo establecido, de acuerdo a las reglamentaciones generales de transportes de productos alimenticios.
El material melario no debe estar en contacto directo con el piso del vehículo, para ello se deben utilizar bandejas. Deben apilarse formando una estructura sólida, atadas firmemente para evitar que se desplacen y cubrirse en forma hermética con una lona la totalidad de la carga.

Zona B: Establecimiento de extracción de miel

Condiciones generales

Las alzas melarias y cuadros tienen que ser procesados en un establecimiento de extracción de miel que cumpla con las reglamentaciones vigentes para tal fin, previstas por la Resolución GMC Nº 80/96. La limpieza, desinfección se debe realizar según los procedimientos Procedimientos Operativos Estandarizados de Saneamiento (POES)

Características del procesamiento

Toda no conformidad detectada durante el procesamiento debe ser registrada y el material involucrado se debe retirar e identificar.

Las causas de no conformidad durante el proceso pueden ser: alzas y/o cuadros que no sean de alzas melarias, cuadros con cría de abejas y mal desabejados, alzas y/o cuadros con tierra, cuadros de miel con más del 18% de humedad, cuadros desclavados o desarmados, tambores sucios, golpeados y/o sin barniz sanitario sano.

Recepción y descarga de alzas melarias

Cada lote recepcionado debe registrarse con un número de lote de extracción, Se deben tomar los pesos brutos y netos de cada lote de extracción. La miel deberá tener menos del 18 % de humedad.

Deposito de alzas melarias

Durante el almacenamiento, deberán controlarse las condiciones de humedad y temperatura debido a que los excesos pueden provocar alteraciones en las características de la miel.

Procesamiento de la miel

El método de separación que se utilice no debe elevar el contenido del hidroximetilfurfural (HMF). Las separadoras centrífugas de cera-miel que trabajan en frío son de uso recomendable.

Todos los materiales que estén en contacto con la miel deben ser los aprobados para tal fin.

Envasado de miel

Se recomienda que cada tambor sea identificado y precintado, debiendo registrar los números correspondientes. En caso de que por alguna circunstancia se justifique la ruptura del precinto, el encargado de la sala será el único responsable de esta acción y deberá registrar la causa del mismo.

RESULTADOS OBTENIDOS

Identificación de los principales factores para el diseño del programa de gestión, vinculados a la calidad e inocuidad del producto. (**Tabla 1**)

Determinación de las variables clave que afectan la inocuidad. (**Tabla 2**)

Identificación de los peligros. (**Tabla 3**)

Definición de factores a controlar y criterios de cumplimiento para asegurar la inocuidad del producto. (**Tabla 4**)

Tabla 1. Principales factores identificados, vinculados a la calidad e inocuidad del producto.

Sub-etapa o Zona A **Apiario**	Ubicación de apiarios Productos de protección de materiales Productos de combustión Cera estampada y obrada Medicamentos veterinarios Alimentos para abejas Humedad de miel Humedad ambiente en cosecha Herramientas para manejo de colmenas Vehículos e implementos de cosecha y traslado
Sub-etapa o Zona B **Establecimiento de extracción de miel**	Condiciones edilicias Personal Maquinarias y herramientas Productos de limpieza y desinfección Humedad y temperatura ambiente Desoperculado de panal Separación de miel y cera Envases

Tabla 2. Variables definidas en cada zona, consideradas claves para alcanzar la inocuidad del producto.

ZONA O SUB-ETAPA	VARIABLE
Zona A **Apiario**	Distancia a áreas urbanas o zonas con riesgo de contaminación
	Tipos y modo de empleo de productos de protección y mantenimiento de materiales apícolas
	Tipos y fechas de aplicación de productos veterinarios
	Clases de sustitutos energéticos utilizados y época de suministro
	Grado de madurez de la miel
	Porcentaje de humedad relativa
	Método de desabejado de alzas melarias
	Medio de transporte y acondicionamiento de alzas melarias
Zona B **Establecimiento de extracción de miel**	Diferenciación y división de áreas específicas
	Diseño de áreas específicas
	Materiales de pisos, paredes y techos
	Ventilación e iluminación
	Método de desoperculado
	Características de los equipos en contacto con la miel
	Tipos de tamizado y tiempo de decantado
	Entrenamiento y conducta del personal
	Procedimientos de limpieza y desinfección y eliminación de desechos
	Procedimientos de control de plagas

Tabla 3. Peligros potenciales sobre la inocuidad de miel, vinculados a las variables definidas.

Peligros químicos	Peligros biológicos	Peligros físicos
Contaminación por agroquímicos Contaminación por emisiones industriales Presencia de residuos de medicamentos Adulteración con sustitutos energéticos Presencia de metales pesados Alta concentración de Hidroxi Metil Furfural (HMF)	Contaminación por efluentes cloacales Excretas de roedores Humedad de miel excesiva Presencia de mohos y levaduras	Presencia de tierra y polvo ambiental Restos de abejas y/o cera

Tabla 4. Resumen de Factores a controlar y Criterios de cumplimiento para asegurar la inocuidad del producto.

Zona A: Apiario	
Buenas prácticas de manejo	
Factores a controlar	**Criterios de Cumplimiento**
Ubicación de apiarios	Distancia a centros urbanos y/o parques industriales mayor a 1,5 Km
Materiales de colmenas	Madera de medidas estandarizadas, según Norma IRAM 114001:2000
Productos de protección de materiales	Parafina de uso alimentario, pinturas sintéticas y/o base de aceites, aceites vegetales
Mantenimiento y/o desinfección de materiales	Inmersión en cera microcristalina o parafina de uso alimentario y autoclavado
Material de combustión ahumadores	Materiales de origen vegetal
Renovación de panales de cámara de cría	Renovación por pigmentación del 30% anual
Registros	Alimentación artificial. Tratamientos sanitarios. Movimiento de colmena. Multiplicación de material vivo. Agregado de alzas melarias
Buenas prácticas de manejo sanitario	
Revisiones sanitarias	Al menos dos veces por año en cada apiario
Tratamientos sanitarios	Productos veterinarios autorizados por SENASA
	Prohibidos en forma preventiva
	Prohibido su uso con alzas melarias presentes
Registros	Producto utilizado, dosis administrada y fecha
Buenas prácticas de manejo en la alimentación artificial	
Tipo de alimento	No utilizar miel
	Sacarosa o JMAF sobre cámaras de cría
Registros	Producto utilizado, cantidad administrada y fecha
Buenas prácticas de manejo en la cosecha de miel	
Madurez de miel	Ärea operculada no menor a 75%
Procedencia de panales	Sólo alzas melarias
Desabejado	Método físico (sopladores)
	Prohibido el uso de repelentes
Registros	Lotes por apiario, cantidad y fecha
Zona B: Establecimiento de extracción de miel	
Condiciones generales	
Factores a considerar	**Medidas a implementar**
Establecimiento de extracción	Establecimiento de extracción de miel habilitado por SENASA
Limpieza y desinfección	Procedimientos Operativos Estandarizados de Saneamiento (POES)
Características del procesamiento	
Materiales no conformes	Retirar e identificar o cuadros con tierra, cuadros de miel con más del 18% de humedad, cuadros desclavados o desarmados, tambores sucios, golpeados y/o sin barniz sanitario sano
Recepción y descarga de alzas melarias	
Registros	Lote de extracción, peso bruto y neto
Deposito de alzas melarias	
Durante el almacenamiento	Controlar condiciones de humedad y temperatura

Procesamiento de la miel	
Método de separación de miel y cera	Separación de miel y cera en frío
Envasado de miel	
Condiciones de tambores	Tambores identificados y precintados
Registros	N° de sala y RENAPA

CONCLUSIONES

Trabajar en base a un programa de Buenas Prácticas significa un cambio de mentalidad de trabajo, un cambio cultural en el proceso de producción de miel.

Es una estrategia preventiva que integra aspectos de producción y ambientales a la gestión de la empresa. Su objetivo es la utilización eficiente de los recursos disponibles y asegurar la sustentabilidad de la producción.

El contexto ambiental de producción (con epicentro en la colonia misma), es el factor medular en la gestión de calidad e inocuidad del producto.

La definición de las variables clave en el desarrollo de Global-GAP, otorgó un marco de trabajo simple y eficaz para el productor.

El carácter genérico del modelo de gestión lo hace transferible a zonas de características fitogeográficas diferentes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

SAGPyA. Dirección Nacional de Alimentos. *El Sector Apícola Argentino.* 2007.

Nimo, Mercedes. Dirección Nacional de Alimentos. SAGPyA. Disponible en: http://www.noticiasapicolas.com/mercedesnimo.htm [Consulta: 31/07/2008].

Zorzin, H., Crespo P. y Tricco, H. *Análisis de la situación actual y futuro de la actividad apícola en la región pampeana.* Jornada de actualización apícola. INTA Pergamino, noviembre de 2007.

Oyarzun, M., Figueroa E., Tartanac F. *Oportunidades de mejoramiento en la calidad e inocuidad de la cadena productiva de la miel en Chile*. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la

Alimentación (FAO) Santiago de Chile. 2005.

Referencial Técnico GLOBALGAP. Versión 3.0:2007.

Gobierno de la Provincia de Córdoba. Agencia Córdoba D.A.C.yT. Dirección de *Ambiente. Regiones naturales de la provincia de Córdoba. 2003.*

Capitanelli, Ricardo. Geografía de San Luis, el hombre y la tierra. Ed. Ceyne SRL S.R.L. Atlas Geográfico digital de San Luis.

Cabrera, Angel L. 1976. *Regiones fitogeográficas argentinas. 2° ed.*, Editorial Acme. Buenos Aires

Oliva L.; C. Costa.; R. Nobile; J. Spadoni; E. Sosa; V. Barrionuevo; P. Cisternas y E. Pistone. 2006. *Aptitudes de la producción apícola en el departamento San Javier. Córdoba.* Revista Espacio Apícola N° 75 páginas 22-31. ISSN 1850 – 0757.

Chebez, Juan C. 2006. *Guía de las Reservas Naturales de la Argentina. Tomo 5, Zona Centro.* Editorial Albatros. Buenos Aires.

Combinación de tratamiento térmico y atmósfera modificada para la conservación postcosecha de brócoli (Brassica oleracea var italica) a 20ºC

Thermal and modified atmosphere treatment for post-harvest conservation of brocoli (*Brassica oleracea var italica*) at 20°C

Hasperué JH[1], Lemoine ML[1], Martínez GA[2], Chaves AR[1].

[1] CIDCA, Facultad de Ciencias Exactas UNLP, CONICET La Plata. Calle 47 y 116, (1900) La Plata, Pcia Buenos Aires, Argentina. Tel/Fax 54-2214249287. E-mail: gmartinez@intech.gov.ar
[2] IIB-INTECH, Camino de circunvalación Laguna Km 6, Chascomús, Pcia Buenos Aires, Argentina.

RESUMEN

Los tratamientos térmicos de alta temperatura y las atmósferas modificadas por si solas han sido utilizados como métodos físicos de postcosecha para extender el tiempo de almacenamiento en diferentes productos, convirtiéndose en una posible estrategia al control químico. El objetivo de este trabajo fue estudiar la respuesta de brócoli a la atmósfera modificada combinada con un tratamiento térmico de alta temperatura. Para ello se utilizaron cabezas de brócoli que fueron colocadas en bandejas a las que se le los siguientes tratamientos: **a.** Tratamiento térmico combinado con atmósfera modificada (TT+AM): las bandejas se embolsaron con polietileno de baja densidad, se sellaron y luego se sometieron a un tratamiento térmico con aire caliente 48 ºC, 3 horas. **b.** Tratamiento térmico (TT+PVC): las bandejas se recubrieron con PVC perforado y se llevaron a estufa con aire caliente a 48 ºC, 3 horas. **c.** Control con atmósfera modificada (C+AM): las bandejas se embolsaron con polietileno de baja densidad y sellaron. **d.** Control sin atmósfera modificada (C+PVC): las bandejas se recubrieron con PVC perforado. Todas las bandejas se almacenaron a 20 ºC durante 8 días. Se tomaron muestras a los 0, 2, 4, 6 y 8 días de almacenamiento. Se midió la composición de la atmósfera modificada, pérdida de peso, color superficial, clorofilas, fenoles y azúcares totales. La composición de la atmósfera inmediatamente después del tratamiento (TT+AM) fue de 6 % CO_2 y 13 % O_2, posteriormente en el día 8 de almacenamiento la concentración de CO_2 fue de 0.6 % y la de O_2 de 19 %, mientras que las muestras (C+AM) al día 8 tuvieron 6 % de O_2 y 2.5 % de CO_2. La pérdida de peso fue significativamente superior en las muestras recubiertas con PVC (C+PVC) y (TT+PVC) con respecto a las muestras que tenían la atmósfera modificada (TT+AM) y (C+AM) no observándose diferencias entre estas dos últimas. En cuanto al color superficial, en el día 4 y 8 de almacenamiento se observó el menor valor de Hue en las muestras (C+PVC), evidenciando un amarillamiento de las cabezas, en tanto que las muestras (TT+AM) presentaron el valor más alto de Hue, demostrando una buena retención del color verde. El contenido de clorofila en las muestras tratadas (TT+AM) presentó la menor tasa de disminución respecto a los demás tratamientos. Por otra parte, en el día 8 el contenido de fenoles en las muestras (TT+AM) disminuyó significativamente respecto a las muestras (TT+PVC) y (C+AM) observándose valores similares a las (C+PVC). El contenido de azúcares totales disminuyó durante el almacenamiento en todas las muestras. Estos resultados permiten concluir la combinación de tratamiento térmico con atmósfera modificada extiende la vida postcosecha de brócoli almacenado a 20 ºC.

ABSTRACT

Heat treatments and modified atmospheres are physical methods that can be employed to extend postharvest life during storage of several fruit or horticultural products, being a possible alternative to chemical treatments. In this work, the objective was to analyze the response of broccoli to a combination of heat treatment with modified atmosphere. To do that, broccoli heads were placed in trays and subjected to different treatments. **a.** Heat treatment and modified atmosphere (HT+MA): trays were wrapped with, sealed and heat treated at 48 ºC during 3 hours. **b.** Heat treatment (HT+PVC): trays were covered with perforated PVC and heat treated at 48 ºC during 3 hours. **c.** Control with modified atmosphere (C+MA): trays were wrapped with low density polyethylene and sealed. **d.** Control without modified atmosphere (C+PVC): trays were covered with perforated PVC. All trays were stored at 20 ºC during 8 days. Samples were taken after 0, 2, 4, 6 and 8 days of storage

and composition of the atmosphere, weight loss, superficial color and chlorophyll, phenolics and sugar contents were evaluated. Atmosphere composition was 6 % CO_2 and 13 % O_2 in HT+AM samples immediatelly after heat treatment. After 8 days of storage, concentration of CO_2 and O_2 was 0.6 % and 19 % respectively, while, samples C+AM had 6 % O_2 and 2.5 % CO_2 after 8 days. Weight loss was significantly higher in samples covered with PVC (C+PVC and TT+PVC) regard to samples stored with modified atmosphere (HT+MA and C+MA). No weight loss differences were detected between HT+MA and C+MA samples. In relation to superficial colour, after 4 and 8 days of storage, lower Hue values were measured C+PVC samples, which is related with yellowing of heads. On the contrary, samples TT+MA showed the higher values of Hue, indicating a good retention of green colour. Similarly, samples treated with the combination (TT+MA) had the lower chlorophyll degradation in relation to the other treatments. Phenolic content decreased significantly after 8 days in samples TT+MA in relation to TT+PVC and C+MA, but values were similar to C+PVC. Content of sugars decreased during storage in all samples regardless the treatment applied. These results indicate that the combination of heat treatment with modified atmosphere allow extending postahrvest life of broccoli during storage at 20 °C.

PALABRAS CLAVE*: brócoli, tratamiento térmico, atmósfera modificada, senescencia.*

KEYWORDS: *broccoli, heat treatment, modified atmosphere, senescence.*

INTRODUCCIÓN

El brócoli es un vegetal con alto valor nutricional, que contiene altos niveles de vitaminas, antioxidantes y glucosinolatos (Nestle 1998). Las inflorescencias se cosechan y consumen en estado inmaduro. La cosecha produce un fuerte estrés al vegetal debido a la supresión del suministro de energía, conduciendo al desencadenamiento de la senescencia, la cual se acelera aún más por tratarse de órganos en estado de desarrollo (Page *et al* 2001).

Diferentes tecnologías han sido utilizadas para extender la vida poscosecha de cabezas enteras de brócoli, entre las que se pueden citar la refrigeración (Gillies y Toivonen 1995), tratamiento térmico de alta temperatura (Costa *et al* 2005), radiación UV-C (Costa *et al* 2006) y atmósferas modificadas (Rai *et al* 2008).

Los tratamientos térmicos por calor han sido utilizados en diversos productos vegetales, tales como tomate, manzana y frutilla (Paull 1990, Klein y Lurie 1991, Vicente *et al* 2002). Estos tratamientos provocan un estrés momentáneo en el tejido vegetal que permite retardar procesos tales como maduración y senescencia durante la postcosecha.

En brócoli, estudios realizados con inflorescencias enteras que fueron tratadas con aire caliente a 48ºC durante 3 h, y luego almacenadas a 20ºC, mostraron un notorio retardo de la senescencia, observándose una menor pérdida del contenido de clorofilas y de antioxidantes y una mejor calidad nutricional del producto (Costa *et al* 2005).

Por otra parte, la conservación en atmósfera modificada también retarda el amarilleamiento y el la senescencia de brócoli, manteniendo su calidad durante el almacenamiento (Barth *et al* 1993).

La combinación de tratamiento térmico y atmósfera modificada ha sido aplicada con éxito para extender la vida de almacenamiento de kaki “Fuyu” (Burmeister *et al* 1997) y de frutillas “Selva” (Vicente *et al* 2003); observándose en ambos casos una mejora respecto a cada tratamiento individual. En el tratamiento combinado se logra el beneficio del tratamiento térmico a la vez que se acelera la producción de la atmósfera modificada por el mismo tratamiento con calor, lográndose una acumulación de CO_2 más rápida (Vicente *et al* 2003).

El objetivo de este trabajo fue estudiar la respuesta de brócoli a la atmósfera modificada combinada con un tratamiento térmico de alta temperatura.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y tratamientos

Se utilizaron cabezas de brócoli (*Brassica oleracea* var. Italica), cosechadas en un establecimiento hortícola del partido de la ciudad de La Plata. Inmediatamente luego de la cosecha se llevaron al laboratorio para la limpieza y selección del material. Las cabezas enteras fueron colocadas en bandejas

plásticas, conteniendo una cabeza cada una. A las bandejas se les realizaron los siguientes tratamientos: 1) Tratamiento térmico combinado con atmósfera modificada (TT+AM): quince bandejas se embolsaron con polietileno de baja densidad, se sellaron y luego se sometieron a un tratamiento térmico con aire caliente a 48 ºC durante 3 horas; 2) Tratamiento térmico sin atmósfera modificada (TT+PVC): quince bandejas se recubrieron con PVC perforado y se llevaron a estufa con aire caliente a 48ºC durante 3 horas. 3) Control con atmósfera modificad (C+AM): quince bandejas se embolsaron con polietileno de baja densidad y se sellaron; y 4) Control sin atmósfera modificada (C+PVC): quince bandejas se recubrieron con PVC perforado. Todas las bandejas se almacenaron a 20 ºC durante 8 días. Se tomaron muestras a los 0, 4 y 8 días de almacenamiento. Las muestras fueron analizadas inmediatamente o congeladas a -20ºC hasta su análisis. El ensayo completo se realizó al menos dos veces.

Determinaciones

Composición de la atmósfera dentro de las bandejas. La atmósfera dentro de las bandejas se muestreó con una jeringa para gases de 1 ml y los contenidos de O_2 y CO_2 se determinaron por cromatografía gaseosa empleando un cromatógrafo Shimadzu 6A. Se usó una columna Altech CTR1 y un detector por conductividad térmica. Se utilizó He como gas transportador.

Pérdida de peson Las bandejas se pesaron al inicio de la experiencia y a cada tiempo de muestreo con una balanza granataria. Se realizó la diferencia y los resultados se expresaron como pérdida de peso porcentual respecto al valor inicial.

Color superficial. Se evaluó con un colorímetro Minolta CR-400 midiendo las variables Hue y L en al menos cinco zonas de cada cabeza de brócoli. Se analizaron al menos cuatro cabezas para cada tratamiento y tiempo de muestreo.

Contenido de clorofilas. El contenido de clorofilas se determinó triturando 0,3 g de tejido en acetona: agua (80:20). Luego de centrifugar se determinó el nivel de clorofilas en el sobrenadante empleando el método espectrofotométrico de Lichtenthaler (1987). Los resultados se expresaron como µg de clorofila . g de tejido^{-1}.

Contenido de fenoles totales. El contenido de fenoles se evaluó homogeneizando 2,0 g de tejido congelado con N_2 líquido con 12 ml de etanol. Luego de centrifugar los fenoles se analizaron sobre el extracto etanólico con el reactivo de Folin-Ciocalteau (Lemoine *et al* 2009). Los resultados fueron expresados en µg de fenol . g de tejido^{-1}.

Contenido de azúcares totales. El contenido de azúcares totales fue determinado de acuerdo a Lemoine *et al* (2007), utilizando antrona como reactivo. Los resultados fueron expresados en mg de glucosa . g de tejido^{-1}.

Análisis estadístico. La experiencia se diseñó de acuerdo a un diseño factorial, siendo los factores los tratamientos y el tiempo de almacenamiento. Los resultados se analizaron mediante un ANOVA y las medias se compararon usando el test LSD y 0,05 de nivel de significación (α)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Composición de la atmósfera modificada. Inmediatamente después del tratamiento térmico la composición de la atmósfera se modificó respecto de la del aire en las muestras TT+AM, conteniendo 6% CO_2 y 13% O_2 debido probablemente a un aumento de la actividad respiratoria de los brócolis durante el calentamiento. Hacia el final del almacenamiento la composición de la atmósfera modificada alcanzada dentro de los envases fue significativamente diferente. En las muestras tratadas térmicamente se halló un 0,6% CO_2 y 19% O_2, mientras que en las bandejas C+AM al día 8 se encontró aproximadamente 6,0% O_2 y 2,5% CO_2 (**Figuras 1** y **2**). El tratamiento térmico provoca un aumento momentáneo de la actividad respiratoria en el momento del calentamiento (Vicente *et al* 2003). Sin embargo el estrés provocado por el calor puede causar un retraso en la aparición de los síntomas de senescencia en brócoli (Costa *et al* 2005), entre ellos el aumento de la tasa respiratoria durante el almacenamiento a 20 °C. La menor concentración de CO_2 en las muestras TT+AM indicaría una menor actividad respiratoria en los brócolis tratados con calor.

Pérdida de peso. La pérdida de peso al final de la experiencia fue de aproximadamente 10% en ambas muestras control, C+PVC y TT+PVC, valor significativamente superior (aproximadamente 3 veces mayor) al de las muestras con atmósfera modificada TT+AM y C+AM, no observándose diferencias entre estas dos últimas (**Tabla 1**).

Tabla 1. Cambios en la pérdida de peso en muestras de brócoli almacenadas a 20 °C durante 8 días.

		Día 0	Día 8
Pérdida de peso (%)	C+PVC	4,5	10,0
	C+AM	2,5	3,6
	TT+PVC	7,7	13,0
	TT+AM	6,1	4,5

C+PVC (controles sin atmósfera modificada)
C+AM (control con atmósfera modificada)
TT+PVC (tratamiento térmico sin atmósfera modificada)
TT+AM (tratamiento térmico en presencia de atmósfera modificada)

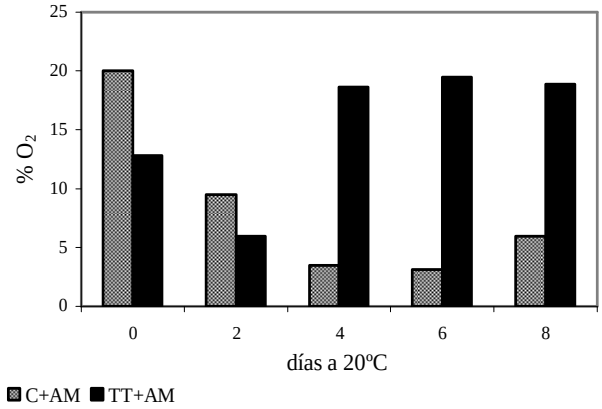


Figura 1. Cambios en el contenido de O_2 de la atmósfera que rodea las muestras de brócoli durante al almacenamiento a 20 °C. C+AM (control con atmósfera modificada); (tratamiento térmico sin atmósfera modificada); TT+AM (tratamiento térmico en presencia de atmósfera modificada).

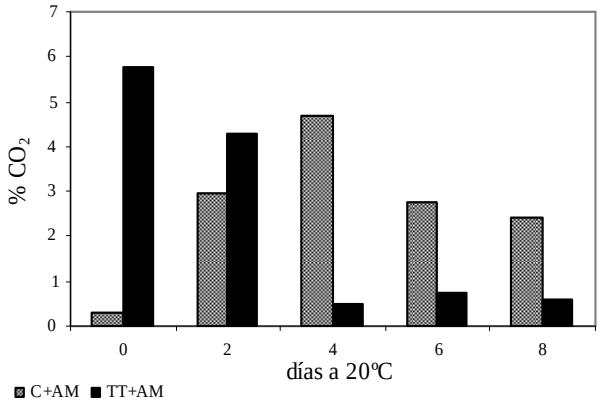


Figura 2. Cambios en el contenido de CO_2 de la atmósfera que rodea las muestras de brócoli durante al almacenamiento a 20 °C. C+AM (control con atmósfera modificada); TT+AM (tratamiento térmico en presencia de atmósfera modificada).

Color. El valor inicial del ángulo del color, Hue, fue aproximadamente 160. Durante el almacenamiento las muestras control con y sin AM (C+PVC y C+AM) exhibieron valores de hue hacia el día 8 de 65 y 110 respectivamente, indicando una importante pérdida del color verde (**Figura 3).** En cambio, en las muestras tratadas térmicamente se observó en las empaquetadas con PVC una disminución del ángulo hue de aproximadamente 40% respecto al valor inicial. Para el tratamiento TT+AM, los valores de Hue fueron de 159 y 157 hacia los días 4 y 8 de almacenamiento, demostrando una buena retención del color verde.

Tendencias similares se observaron en cuanto a los resultados que se obtuvieron con los valores de L, siendo al día 4 y 8 de almacenamiento, los valores significativamente superiores en todos los tratamientos respecto del TT+AM, indicando ello un amarilleamiento más avanzado en las muestras C+AM, C+PVC y TT+PVC (**Figura 4**). Las diferencias más marcadas en color entre los tratamientos

con atmósfera modificada (TT+AM y C+AM) se evidenciaron recién hacia el día 8 de almacenamiento.

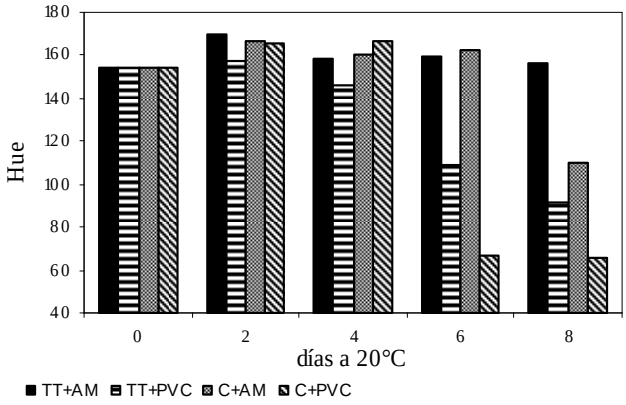


Figura 3. Cambios en el ángulo Hue de muestras de brócoli durante al almacenamiento a 20 °C. C+PVC (controles sin atmósfera modificada); C+AM (control con atmósfera modificada); TT+PVC (tratamiento térmico sin atmósfera modificada); TT+AM (tratamiento térmico en presencia de atmósfera modificada).

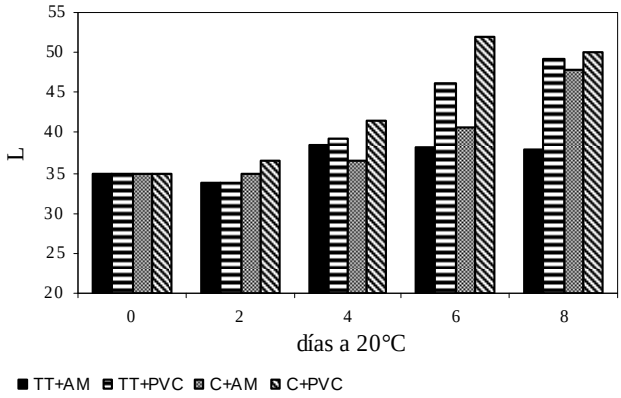


Figura 4. Cambios en los valores de L de muestras de brócoli durante al almacenamiento a 20 °C. C+PVC (controles sin atmósfera modificada); C+AM (control con atmósfera modificada); TT+PVC (tratamiento térmico sin atmósfera modificada); TT+AM (tratamiento térmico en presencia de atmósfera modificada).

Contenido de clorofila. Los contenidos de clorofila sufrieron una caída a lo largo del almacenamiento en todos los tratamientos. Sin embargo, las muestras TT+AM mostraron una menor caída durante al almacenamiento. Hacia el día 8 los contenidos de clorofila de los brócolis C+PVC, C+AM y TT+PVC fueron 35, 60 y 47 µg . g tejido^{-1} respectivamente (**Figura 5**), mientras que en el tratamiento combinado solamente se perdió un 30 % del valor inicial, llegándose a valores cercanos a 150 µg . g tejido^{-1}, indicando que estas cabezas de brócoli mantuvieron más alto el contenido de clorofilas totales durante al almacenamiento. Un comportamiento similar se observó también en los contenidos de clorofila a y b (datos no mostrados).

Contenido de azúcares totales. Durante la senescencia de brócoli se observa una disminución del contenido de azúcares (Costa *et al* 2005). En nuestro caso, el contenido inicial de azúcares totales fue de aproximadamente 30,7 mg.g de tejido^{-1} (**Figura 6**). Sin embargo, las muestras tratadas térmicamente Luego del tratamiento térmico hubo un descenso en el nivel de azúcares del 15%. Esta disminución pudo deberse a que los azúcares fueron consumidos en mayor medida dado el incremento en la respiración durante el tratamiento térmico. Posteriormente, se detectó un descenso en el contenido de azúcares totales a lo largo de todo el período de almacenamiento la cual fue similar en todos los tratamientos, llegando al día 8 con valores aproximados a 20 mg.g^{-1}.

Contenido de fenoles. Los fenoles representan un grupo de compuestos de importancia en los vegetales dado que los mismos contribuyen al poder antioxidante. El contenido de fenoles en el día de la cosecha fue de 621,4 µg . g^{-1}. En los brócolis C+PVC dicho nivel descendió prácticamente a la

mitad hacia el final del almacenamiento (**Figura 7**) al igual que en las muestras TT+AM. Por su parte, en las muestras C+AM y TT+PVC se observó un descenso del contenido de fenoles de sólo 13 y 5% respectivamente.

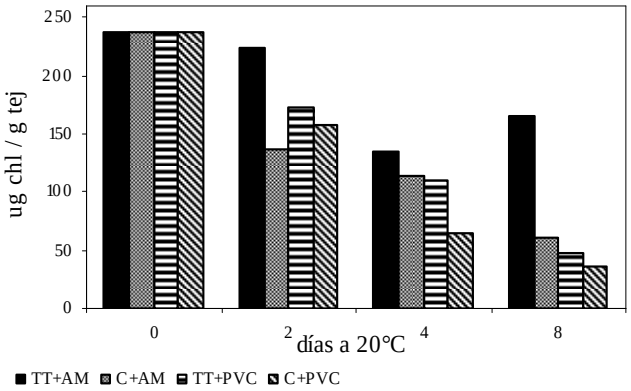


Figura 5. Cambios en el contenido de clorofila de muestras de brócoli durante al almacenamiento a 20 °C. C+PVC (controles sin atmósfera modificada); C+AM (control con atmósfera modificada); TT+PVC (tratamiento térmico sin atmósfera modificada); TT+AM (tratamiento térmico en presencia de atmósfera modificada).

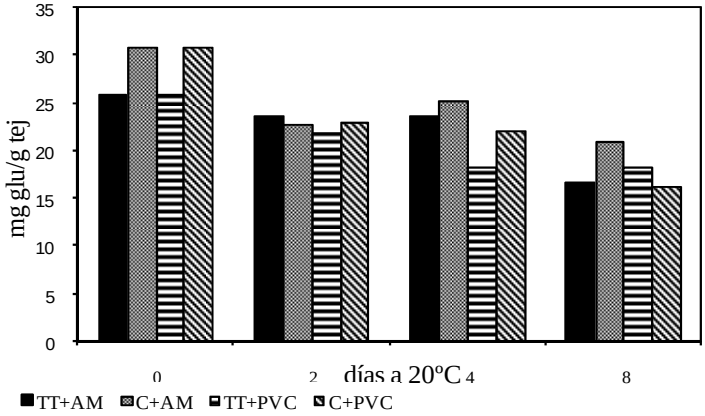


Figura 6. Cambios en el contenido de azúcares totales de muestras de brócoli durante al almacenamiento a 20 °C. C+PVC (controles sin atmósfera modificada); C+AM (control con atmósfera modificada); TT+PVC (tratamiento térmico sin atmósfera modificada); TT+AM (tratamiento térmico en presencia de atmósfera modificada).

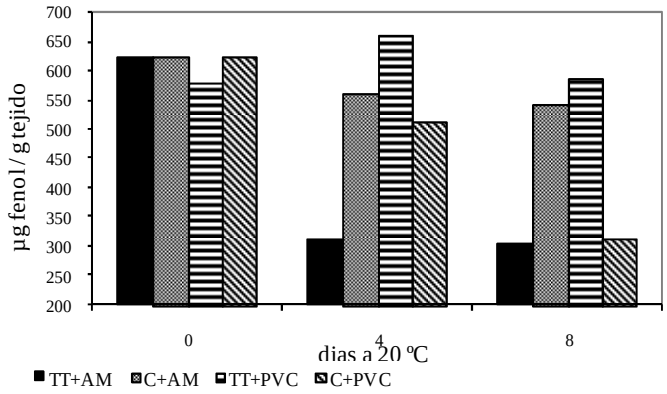


Figura 7. Cambios en el contenido de fenoles totales de muestras de brócoli durante al almacenamiento a 20 °C. C+PVC (controles sin atmósfera modificada); C+AM (control con atmósfera modificada); TT+PVC (tratamiento térmico sin atmósfera modificada); TT+AM (tratamiento térmico en presencia de atmósfera modificada).

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos permiten concluir que la combinación de tratamiento térmico y atmósfera modificada permite extender la vida postcosecha de brócoli en mejores condiciones que cada tratamiento individual. Los tratamientos térmicos sub-letales causan un aumento momentáneo de la actividad respiratoria. En nuestro caso, se observó una acumulación prematura de CO_2 en aquellas muestras almacenadas en películas. Probablemente esto haya causado que el efecto de las atmósferas modificadas se produzca prematuramente en estas muestras (TT+AM), el cual se muestra más tardío en las muestras que no sufrieron tratamiento térmico (C+AM). La aditividad del efecto de los tratamientos fue muy notoria en el caso de la pérdida de color superficial y degradación de clorofilas, pero no fue así en el caso del consumo de azúcares.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue financiado con fondos aportados por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica ANPCYT (PICT 25283).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Barth MM, Kerbel FL, Perry AK and Schmidt SJ. 1993. Modified atmosphere packaging affects ascorbic acid, enzyme activity and market quality of broccoli. Journal of Food Science 58(1): 140–143.

Burmeister DM, Ball S, Green S, Woolf AB. 1997. Interaction of hot water treatments and controlled atmosphere storage on quality of 'Fuyu' persimmons. Postharvest Biol. Technol. 12: 71-81.

Costa ML, Civello PM, Chaves AR, & Martínez GA. 2005. Effect of hot air treatments on senescence and quality parameters of harvested broccoli (Brassica oleracea L. var talic) heads. Journal of the Science of Food and Agriculture, 85: 1154–1160.

Costa ML, Vicente AR, Civello PM, Chaves AR, & Martínez GA. 2006. UV-C treatment delays postharvest senescence in broccoli florets. Postharvest Biology and Technology, 39(2): 204–210.

Gillies SL, & Toivonen PMA. 1995. Cooling method influences the postharvest quality of broccoli. HortScience, 30: 313–315.

Klein JD, Lurie S. 1991. Postharvest heat treatment and fruit quality. Postharv. News Info. 2: 15-19.

Lemoine ML, Civello PM, Martínez GA, & Chaves AR. 2007. Influence of postharvest UV-C treatment on refrigerated storage of minimally processed broccoli (*Brassica oleracea* var. Italica). Journal of the Science of Food and Agriculture, 87: 1132–1139.

Lemoine ML, Civello PM, Chaves AR, & Martínez GA. 2009. Hot air treatment delays senescence and maintains quality of fresh-cut broccoli florets during refrigerated storage. LWT – Food Science and Technology 42: 1076–1081.

Lichtenthaler HK. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. Methods in Enzymology, 148: 350–382.

Nestle M. 1998. Broccoli sprouts in cancer prevention. Nutrition Reviews, 56: 127–130.

Page T, Griffiths G., & Buchanan-Wollaston V 2001. Molecular and biochemical characterization of postharvest senescence in broccoli. Plant Physiology, 125: 718–727.

Paull RE. 1990. Postharvest heat treatments and fruit ripening. Postharv. News Info. 1: 355-363.

Rai DR, Tyagi SK, Jha SN, & Mohan S. 2008. Qualitative changes in the broccoli (*Brassica oleracea* talic) under modified atmosphere packaging in perforated polymeric film. Journal of Food Science and Technology, 45(3): 247–250.

Vicente AR, Civello PM, Martinez GA, Chaves AR. 2002. Quality of heat-treated strawberries during refrigerated storage. Postharvest Biol. Technol. 25: 59-71.

Vicente AR, Martinez GA, Chaves AR, Civello PM. 2003. Influence of self-produced CO2 on postharvest life of heat treated strawberries. Postharvest Biology and Technology 27: 265-275.

Bacterias ácido lácticas con potencial uso para la biopreservación de productos cárnicos

Potential use of lactic acid bacteria for the bipreservation of meat products

Herman C (1), Cayré ME , Vignolo GM, Garro OA

(1) CONICET - Facultad de Agroindustrias. Universidad Nacional del Nordeste.
Cdte. Fernández 755. (3700) Pcia. R. S. Peña, Chaco, Argentina.
cristian@fai.unne.edu.ar

RESUMEN

La bioconservación ha captado la atención de tecnólogos alimentarios como una forma de controlar naturalmente la seguridad de los productos cárnicos cocidos. Muchas bacterias ácido lácticas (BAL), normalmente asociadas a productos cárnicos, mostraron propiedades antagónicas frente a organismos patógenos. El antagonismo puede deberse a la competencia por nutrientes y/o la producción de uno o más metabolitos antimicrobianos activos tales como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, enzimas antimicrobianas y bacteriocinas. Debido a estas propiedades, las bacterias lácticas y/o sus metabolitos podrían usarse para aumentar la calidad microbiológica de productos alimenticios como los cárnicos. En función de los antecedentes citados, el objetivo del presente trabajo fue aislar bacterias ácido lácticas de productos cárnicos cocidos elaborados en la provincia del Chaco, evaluar la actividad antimicrobiana de dichas bacterias ácido lácticas sobre microorganismos patógenos comúnmente asociados a productos cárnicos cocidos, caracterizar la naturaleza de las sustancias y determinar la influencia de algunos parámetros de interés tecnológico sobre la actividad inhibitoria. Los productos analizados para la actividad antibacterial de bacterias ácido lácticas comprendieron salchichas cocidas tipo Viena, mortadela, cracovia y chorizo ahumado cocido. Todas las muestras fueron adquiridas de mercados de diferentes lugares de la provincia del Chaco.

Para la detección de la actividad antagónica se utilizó el ensayo de difusión en agar (AWDA). Los indicadores usados fueron *Listeria innocua* (*L. innocua*) (como modelo de *Listeria monocytogenes*) y *Staphylococus aureus (S. aureus).*La actividad se relacionó con el diámetro del halo de inhibición expresada en mm. Los sobrenadantes libres de células (SLC) fueron tratados con enzimas proteolíticas, catalasa e hidróxido de sodio (NaOH) para determinar la naturaleza del agente inhibidor. El efecto de la temperatura se determinó tratando los SLC a 70 ºC (15 min), 85 ºC (15 y 30 min) y 100 ºC (15 min). De los 234 aislamientos seleccionados sobre agar MRS, e identificados como Gram positivos y catalasa negativos, 7 mostraron actividad frente a los dos microorganismos indicadores utilizados. Las pruebas realizadas indicarían que las sustancias inhibitorias serían del tipo bacteriocinas. Las temperaturas ensayadas no produjeron cambios significativos en la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes libres de células, sólo uno de los aislamientos mostró una reducción significativa (p_v=0,0007) de la actividad antimicrobiana a 100 ºC frente a ambos indicadores. Se concluye que estas sustancias podrían considerarse como biopreservadores promisorios para los productos cárnicos elaborados en la provincia ya que podrían incrementar la seguridad higiénica de los mismos previniendo intoxicaciones por agentes patógenos.

ABSTRACT

Biopreservation has gained increased attention from food technologists as a tool to control in a natural way the safety of cooked meat products. Many lactic acid bacteria (LAB), frecuently associated to meat products, showed antagonic properties towards pathogen microorganisms. This antagonism can be addressed to the competence for nutrients and/or the production of active antimicrobial metabolites such as organic acids, hydrogen peroxide, enzymes and bacteriocins. Due to these properties, lactic acid bacteria and/or its metabolites could be used to enhance the safety quality of foods such as meat products. In this sense, the objectives of this work were: i) the isolation of LAB from cooked meat products manufactured in the province of Chaco, Argentina; ii) the evaluation of the antimicrobial activity of the isolated LAB towards pathogen microorganisms commonly associated to cooked meat products; iii) the characterization of the chemical nature of these substances; iv) the study of the

influence of many technological parameters on the inhibitory activity of these substances. The products chosen for these determinations were: Vienna type sausages, bologna sausage, cracovia and cooked smoked ring sausage. The samples were purchased in local markets from different cities throughout the province. The antimicrobial activity was detected using the agar well diffusion assay (AWDA). The indicator strains were *Listeria innocua* (*Li*) (as a model for *Listeria monocytogenes*) and *Staphylococcus aureus (Sa).*The antimicrobial activity was related to the diameter of the inhibition zone, expressed in milimeters. The cell free supernatants were treated with proteolytic enzymes, catalase and sodium hydroxide (NaOH) in order to determine the chemical nature of the antibacterial substance. The temperature effect was assayed submitting the cell free supernatants to different time-temperature combinations, as follows: a) 70 ºC during 15 minutes; b) 85 ºC during 15 and 30 minutes; c) 100 ºC during 15 minutes. From a total of 234 strains, isolated on MRS agar and identified as Gram positive and catalase negative bacteria, 7 strains showed antimicrobial activity against the two indicator microorganisms. The tests conducted to characterize these substances indicated that they could be bacteriocine-like substances. The technological processes applied did not affect significantly the antimicrobial activity of the cell free supernatants. Only one of the isolates showed a significative reduction (p_v=0,0007) at 100 ºC for both indicator microorganisms. It can be concluded that the substances tested could be considered as promising biopreservatives for the meat products manufactured in this region as they could improve their safety preventing people from foodborne illnesses.

PALABRAS CLAVE: *Biopreservación; BAL; Listeria innocua; Staphylococcus aureus.*

KEYWORDS: *Biopreservation; LAB; Listeria innocua; Staphylococcus aureus.*

INTRODUCCIÓN

La biopreservación ha ganado una creciente atención como una vía de control natural de la vida útil y seguridad de los productos cárnicos cocidos. Algunas bacterias ácido lácticas (BAL), asociadas comúnmente con productos cárnicos, demostraron antagonismo sobre microorganismos contaminantes y alterantes de estos (Vermeiren 2004).

La contaminación bacteriana de productos cárnicos es una consecuencia inevitable del procesamiento de la misma (Labadie, 1999) y la tecnología de los obstáculos es comúnmente usada para restringir el subsiguiente crecimiento de contaminantes. (Jones 2008)

A consecuencia del calentamiento de los productos cárnicos cocidos a temperaturas de 65-75 ºC, una gran cantidad de células vegetativas mueren y la recontaminación post – tratamiento térmico determina su vida útil (Borch *et al.* 1996). *Listeria monocytogenes* puede encontrarse como resultado de la contaminación post tratamiento térmico de productos cárnicos cocidos (Uyttendaele et al. 1999). Es el agente causal de listeriosis con un 30% de mortalidad en individuos infectados (Duffes et al. 1999), capaz de crecer a valores de pH tan bajos como 5, a temperaturas de refrigeración y a muy altas concentraciones salinas (Eklund *et al.* 1995).

Otro microorganismo patógeno asociado a productos cárnicos cocidos es *Staphylococcus aureus* el cual puede crecer en un amplio rango de condiciones ambientales y es un contaminante frecuente de alimentos (Charlier *et al.* 2009). Debido a su importancia y alta prevalencia en infecciones nosocomiales, *S. aureus* es uno de los patógenos Gram positivo más estudiado (Charlier *et al.* 2009).

Las BAL han sido usadas para la preservación de productos cárnicos fermentados y cocidos por muchos años, y se han reportado una variedad de cepas como antagonistas de patógenos y microorganismos alterantes asociados a estos alimentos (Aymerich *et al.* 1998; De Vuyst y Vandamme 1994; Kostrzynska y Bachand 2006; Leroy *et al.* 2006).

Las BAL son bien conocidas por la producción de bacteriocinas, péptidos inhibitorios de especies relacionados genéticamente (Todorov 2005) y son consideradas como microorganismos de grado alimenticio, seguras para consumir y que tienen una larga historia de uso en alimentos (Bredholt *et al.* 2001). Las bacteriocinas son consideradas como un biopreservador natural seguro debido a que son degradadas por proteasas en el tracto gastrointestinal (Cleveland *et al.* 2001) y tienen un interés creciente en la industria alimenticia debido a sus potenciales aplicaciones en la preservación de alimentos (Ammor *et al.* 2006) y a un incremento de consumidores que persiguen alimentos

mínimamente procesados, preparados sin preservadores químicos (Cleveland *et al.* 2001; Devlieghere *et al.* 2004).
Las BAL aisladas originalmente de productos cárnicos cocidos tradicionales son probablemente las mejores candidatas para proveer seguridad microbiológica a este tipo de productos ya que podrían ser más competitivas que aquellas BAL provenientes de otras fuentes (Ammor *et al.* 2006).
Considerando lo antes expuesto, el objetivo del presente trabajo fue aislar BAL de productos cárnicos cocidos elaborados en la provincia del Chaco, evaluar la actividad antimicrobiana de dichas bacterias sobre microorganismos patógenos comúnmente asociados a productos cárnicos cocidos, caracterizar la naturaleza de las sustancias y determinar la influencia de algunos parámetros de interés tecnológico sobre la actividad inhibitoria.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento de BAL

Las BAL utilizadas en este estudio fueron aisladas a partir de productos cárnicos cocidos elaborados en la provincia del Chaco. Los productos utilizados fueron: salchichas cocidas tipo Viena, mortadela, cracovia y chorizo ahumado cocido. Muestras de 10 g de los diferentes productos se tomaron asépticamente y se prepararon diluciones decimales seriadas en agua de peptona (1 g/l) las cuales fueron sembradas sobre agar MRS (de Man Rogosa Sharpe) (Biokar Diagnostics, Francia). Las placas se incubaron por 72 h a 32°C. Entre 10 y 15 colonias fueron tomadas al azar de las placas que mostraron crecimiento y todos los aislamientos que fueron Gram (+) y Catalasa (-) se purificaron sobre el mismo medio y se conservaron en MRS caldo (Biokar Diagnostics, Francia) + glicerol (20 % v/v) a -18 °C hasta su utilización.

Evaluación de la Actividad Antimicrobiana

Para la detección de la actividad antagónica se utilizó el ensayo de difusión en agar (AWDA) (Ponce *et al.* 2008). A placas conteniendo 10 ml de BHI (Breath and Heart Infusion, Britania, Argentina) agar 1,0% p/v inoculado con un cultivo activo (100 µl) de las especies indicadoras se le realizaron pocillos de 5 mm de diámetro. Alícuotas de 15 µl de sobrenadantes libres de células obtenidos a partir del crecimiento de los aislamientos de BAL se introdujeron en los pocillos. Las placas se incubaron a 30 o 37 ºC (de acuerdo al microorganismo indicador) durante 24h Transcurrido el tiempo de incubación se examinaron las zonas de inhibición (zonas claras de 6mm de diámetro o mayores fueron consideradas como inhibición positiva). La actividad se relacionó con el diámetro del halo de inhibición expresada en mm.
Los microorganismos indicadores usados fueron *Listeria innocua* 7 como modelo de *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* obtenido de aislados clínicos identificados por la cátedra de Microbiología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Tucumán.

Naturaleza de los compuestos antimicrobianos

Los aislados que mostraron actividad antagónica sobre al menos unos de los microorganismos indicadores fueron tomados para investigar la naturaleza del compuesto antimicrobiano.
La sensibilidad a enzimas proteolíticas de los sobrenadantes neutralizados (pH 6,5) libres de células se determinó mediante la adición Pepsina, Trypsina, Papaína y Proteasa tipo XIV todas a una concentración de 10 mg/ml. Según el método de AWDA anteriormente descrito 5µl de cada proteasa previamente esterilizada por filtración con filtros de tamaño de poro de 0,22µm se colocó al costado de cada pocillo conteniendo los sobrenadantes libres de células en medios semiblandos con los indicadores mencionados. La deformación de la zona de inhibición en presencia de la enzima confirmó la naturaleza polipeptídica de la sustancia antibacteriana.
Para identificar si la inhibición se debe a la producción de ácido, los sobrenadantes libres de células se neutralizan con NaOH 1N y se determinó la actividad residual.
La actividad inhibitoria debida a la producción de peróxido de hidrógeno se determinó con la adición de catalasa 1 mg/ml en buffer fosfato pH 7,5 a los sobrenadantes libres de células neutralizados (1:1) por 2 h a 32°C. Como control negativo se utilizan los SLC neutralizados (pH 6,5) diluidos con buffer fosfato 1:1.
La actividad residual se determinó por AWDA y se utilizó como control positivo *Lactobacillus curvatus* CRL705 productor de dos bacteriocinas.

Efecto de la temperatura sobre la actividad antimicrobiana

El efecto de la temperatura sobre la estabilidad de los compuestos antimicrobianos se determinó tratando los sobrenadantes libres de células en baño termostatizado a 70 ºC (15 min), 85 ºC (15 y 30 min) y 100 ºC (15 min). Inmediatamente después de cada tratamiento las muestras fueron enfriadas y se determinó la actividad residual. Como control positivo se utilizó un sobrenadante libre de células sin estos tratamientos. La actividad residual se determinó por AWDA como se describió anteriormente y los resultados se compararon estadísticamente.

Análisis estadístico

Para evaluar el efecto de los diferentes tratamientos térmicos sobre la estabilidad de los compuestos antimicrobianos se utilizó análisis de varianza de una vía (ANOVA) en STATGRAPHICS *Plus* Versión 4.0 (Statistical Graphics Corp., MD 20852, Estados Unidos).

RESULTADOS Y DISCUSIONES

A partir de los productos cárnicos cocidos elaborados y adquiridos de diferentes mercados de la provincia del Chaco se realizaron un total de 240 aislamientos, de los cuales 234 fueron Gram positivos y catalasa negativos. Estos resultados confirman la alta selectividad agar MRS para el aislamiento de BAL.

Mediante el ensayo de difusión en agar se pudo detectar la presencia de BAL con actividad antimicrobiana sobre los microorganismos indicadores usados. El espectro de inhibición se muestra en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Aislamientos que mostraron actividad antimicrobiana

Número de Aislamiento	*Listeria innocua*	*Staphylococcus aureus*
197	10,0[a]	-
268	13,0	11,5
299	13,0	12,0
300	13,5	14,0
302	13,5	13,5
304	13,0	14,0
305	10,0	-
409	12,5	12,5
411	11,0	10,5
417	13.5	12,0
418	-	11,0
423	-	10,0

[a]- diámetro del halo de inhibición (mm)

La actividad antimicrobiana exhibida por los aislamientos mostrados en la **Tabla 1** no sufrió modificaciones cuando los sobrenadantes libres de células fueron neutralizados indicando que, en ningún caso, la inhibición puede ser atribuida a la formación de ácidos orgánicos. Estos resultados coinciden con los de Campos *et al.* (2006) quienes indicaron que la actividad antimicrobiana de LAB frente a *L. monocytogenes* y *S. aureus* no es causada por la acidificación del medio.

Los aislamientos Nº 197, 305 y 411 perdieron completamente la propiedad de inhibir a los microorganismos indicadores cuando sus sobrenadantes libres de células fueron tratados con catalasa. En estos casos, la inhibición puede ser adjudicada a la formación de peróxido de hidróegeno. Estos aislamiento fueron descartados debido a que la formación de peróxido de hidrógeno por parte de las BAL podría influir negativamente sobre las características organolépticas de los productos cárnicos cocidos (Stekelenburg *et.al.* 1990).

Para el resto de los aislamientos, los sobrenadantes libres de células fueron sensibles a la acción de proteasas. Esta observación sugiere que la actividad antimicrobiana frente a los microorganismos indicadores podría estar basada en la biosíntesis y secreción de sustancias del tipo bacteriocinas.

Del total de aislamientos realizados 7 (268, 299, 300, 302, 304, 409 y 417) presentaron actividad frente a los dos indicadores por la producción de sustancias del tipo bacteriocinas y fueron tomados para analizar el efecto térmico sobre su actividad antimicrobiana.
Los sobrenadantes libres de células de estos 7 aislamientos se sometieron a ensayos para determinar su resistencia térmica. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 1**. Los tratamientos térmicos ensayados no afectaron significativamente (p_v>0,05) la actividad antimicrobiana de 6 de los aislamientos, tanto para *L. innocua* como para *S. aureus*. Sólo uno de los aislamientos (409) mostró una reducción significativa (p_v=0,0007) de la actividad antimicrobiana frente a ambos indicadores; ahora bien, esta reducción no implicaría una pérdida total de actividad, ya que el halo de inhibición sólo se reduce en un 12,5% con respecto al mostrado por el sobrenadante no tratado.

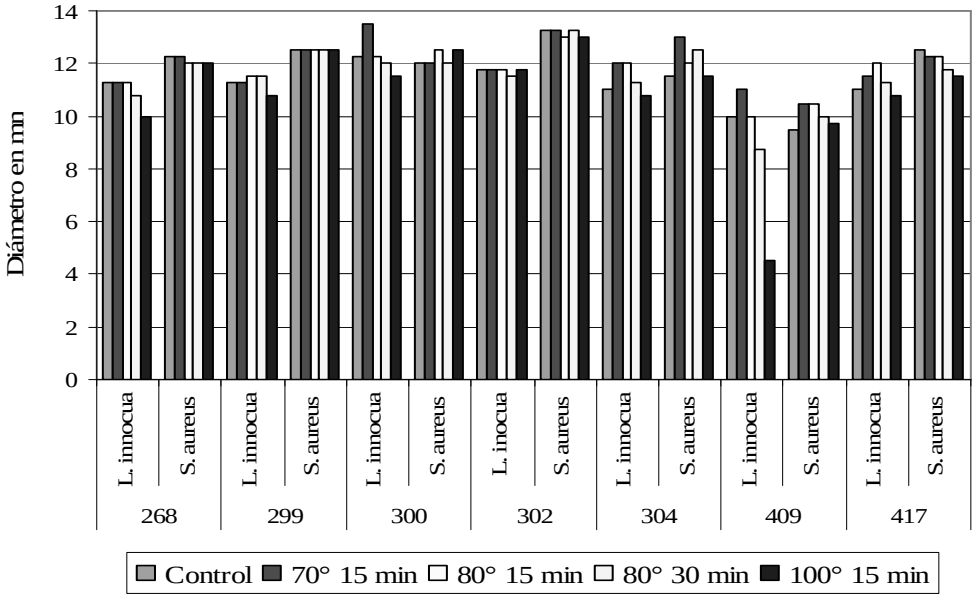


Figura 1: Efecto de la temperatura sobre la actividad antimicrobiana.

CONCLUSIÓN

Considerando que las bacteriocinas pueden ser aplicadas en productos cárnicos por dos métodos básicos: por adición de la bacteriocina cruda, purificada o semipurificada, o por inoculación con cultivos puros de cepas productoras de bacteriocinas (Ananou *et al.* 2005) nosotros consideramos que estas sustancias podrían considerarse como biopreservadores promisorios para los productos cárnicos elaborados en la provincia ya que podrían incrementar la seguridad higiénica de los mismos previniendo intoxicaciones por agentes patógenos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ammor S, Tauveron G, Dufour E, Chevallier I. 2006. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility. 1—Screening and characterization of the antibacterial compounds. Food Control 17: 454–461.

Ananou A, Garriga M, Hugas M, Maqueda M, Martınez-Bueno M, Galvez, A, Valdivia E. 2005. Control of Listeria monocytogenes in model sausages by enterocin AS-48. International Journal of Food Microbiology 103: 179–190.

Aymerich MT, Hugas M, Monfort JM. 1998. Review: bacteriocinogenic lactic acid bacteria associated with meat products. Food Science and Technology Int. 4: 141–158.

Borch E, Kant-Muermans ML, Blixt Y. 1996 Bacterial spoilage of meat and cured meat products. International Journal of Food Microbiology 33: 103–120.

Bredholt S, Nesbakken T, Holck A. 2001. Industrial application of an antilisterial strain of Lactobacillus sakei as a protective culture and its effect on the sensory acceptability of cooked, sliced, vacuumpackaged meats. International Journal of Food Microbiology, 66: 191–196.

Campos CA, Rodríguez O, Calo-Mata P, Prado M, Barros-Velázquez J. 2006. Preliminary characterization of bacteriocins from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus feacium* and *Enterococcus mundtii* strains isolated from turbot (Psetta maxima). Food Research International. 39: 356-364

Charlier C, Cretenet M, Even S, Le Loir Y. 2009. Interactions between Staphylococcus aureus and lactic acid bacteria: An old story with new perspectives. International Journal of Food Microbiology.131: 30-39

Cleveland J, Montville TJ, Nes IF, Chikindas ML. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. International Journal of Food Microbiology. 71: 1–20.

Devlieghere F, Vermeiren L, Debevere J. 2004. Newpreservation technologies: possibilities and limitations. International Dairy Journal 14: 273–285.

De Vuyst L, Vandamme EJ. 1994. Lactic acid bacteria and bacteriocins: their practical importance. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetics and Applications. Blackie Academic & Professional, Glasgow, pp. 1–12.

Duffes F, Corre C, Leroi F, Dousset X, Boyaval P. 1999. Inhibition of Listeria monocytogenes by in situ-produced and semipurified bacteriocins of Carnobacterium spp. on vacuum-packed cold-smoked salmon stored at 4 °C and 8 °C. Journal of Food Protection 62 (12): 1394–1403.

Eklund MW, Poysky FT, Paranjpye RN, Lashbrook LC, Peterson, ME, Pelroy GA. 1995. Incidence and sources of Listeria monocytogenes in cold-smoked fishery products and processing plants. Journal of Food Protection 58 (5): 502–508.

Labadie J. 1999. Consequences of packaging on bacterial growth. Meat as an ecological niche. Meat Science 52: 299–305.

Leroy F, Verluyten J, De Vuyst L. 2006. Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. International Journal of Food Microbiology 106: 270.

Jones RJ, Husseinb HM, Zagorecc M, Brightwella G, Tagg JR. 2008. Isolation of lactic acid bacteria with inhibitory activity against pathogens and spoilage organisms associated with fresh meat. Food Microbiology 25: 228–234

Kostrzynska M, Bachand A. 2006. Use of microbial antagonism to reduce pathogen levels on produce and meat products: a review. Can. Journal Microbiology 52: 1017–1026.

Ponce AG, Moreira MR, Del Valle CE, Roura SI. 2008. Preliminary characterization of bacteriocin-like substances from lactic acid bacteria islated from organic leafy vegetables. LWT 41: 432-441

Schlech WF. 2000. Foodborne listeriosis. Clin. Infect. Dis. 31: 770– 775.

Stekelenburg FK, Zomer WLJM, Mulder SJ.1990. A medium for the detection the bacteria causing green discolouration of cooked cured meat products. Applied Microbiology and Biotechnology. 33: 75-80

Todorov SD,. Dicks LMT. 2005 Screening for bacteriocin-producing lactic acid bacteria from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria. Comparison of the bacteriocins. Process Biochemistry 41: 11–19

Uyttendaele M, De Troy P, Debevere J. 1999. Incidence of Listeria monocytogenes in different types of meat products on the Belgian retail market. International Journal of Food Microbiology. 53: 75-80

Vermeiren L, Devlighere F, Debevere J. 2004. Evaluation of meat born lactic acid bacteria as protective cultures for the biopreservation of cooked meat products. International Journal of Food Microbiology. 96: 149-164

Efecto del extracto de esteviósidos y del sorbato de potasio sobre la inactivación térmica de *Zygosaccharomyces bailii* en sistemas modelo

Effect of Steviosides extract and potassium sorbate on thermal inactivation of *Zygosaccharomyces bailii* in model systems

Hracek, MV (1), Gliemmo, MF (1,2), Campos, CA (1,2).

(1) Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Int. Güiraldes 2160, Ciudad Universitaria, CP 1428, Argentina.
(2) CONICET
carmen@di.fcen.uba.ar

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la adición de extracto de esteviósidos (EE) y de sorbato de potasio (KS) sobre la inactivación térmica de *Zygosacharomyces bailii*, en sistemas modelo acuosos con el pH ajustado a 3,00. Para ello, se realizó un diseño factorial, en tres bloques, con dos variables a dos niveles y un punto central, realizando un total de 15 experimentos. Las variables y niveles fueron: nivel de EE (0,000, 0,175 y 0,350 %m/m) y nivel de KS (0,000, 0,0125 y 0,0250 %m/m). Los sistemas formulados fueron inoculados con *Z. bailii* NRRL 7256 y termostatizados a 50ºC por 60-80 min., retirándose a intervalos seleccionados alícuotas del sistema. La población remante se evaluó mediante el recuento de viables en placa. Los datos obtenidos se modelaron empleando la ecuación de Baranyi, seleccionándose la constante de inactivación como el parámetro más sensible. Se aplicó el diseño factorial a las constantes obtenidas calculándose la ecuación del modelo secundario. De acuerdo con la composición del sistema, se verificó la existencia de distintos tipos de curvas de inactivación: en general, se detectó la presencia de una cola y, en aquellos sistemas que contenían sólo KS o EE, no se observó la existencia de hombro. Estos resultados ponen de manifiesto que los aditivos añadidos afectan la inactivación térmica de la levadura. El incremento de la dosis de KS promovió un aumento significativo de las constantes de inactivación mientras que el aumento del nivel de edulcorante protegió a la levadura del tratamiento térmico. No se observó una interacción significativa entre ambas variables (KS-EE). En base a los resultados comentados, es de destacar que, el agregado de KS a sistemas endulzados con EE permitiría minimizar el efecto protector que los mismos ejercen ya que, la adición del preservador incrementa la inactivación térmica. A partir de la ecuación del modelo secundario se calculó que un nivel de 0,0135 %m/m de KS sería necesario para nulificar el efecto protector ejercido por la presencia de 0,350 %m/m de EE en los sistemas estudiados. Se concluyó que la presencia de los aditivos ensayados afecta la inactivación térmica de la levadura y una adecuada selección de los mismos permitiría disminuir la severidad del tratamiento térmico.

ABSTRACT

The goal of the present study was to evaluate the effect of steviosides extract (EE) and potassium sorbate (KS) addition on thermal inactivation of *Zygosacharomyces bailii* in aqueous model systems with pH adjusted to 3.00. For this reason, a factorial design was done, in three blocks, with two variables at two levels and a central point, for a total of 15 experiments. The variables and levels were: EE level (0.000, 0.175 and 0.350 %w/w) and concentration of KS (0.000, 0.0125 and 0.0250 %w/w). The formulated systems were inoculated with *Z. bailii* NRRL 7256 and warmed to 50ºC for 60-80 min., removing at selected times aliquots of the system. Remaining population was evaluated through viable plate count. Data obtained were fitted by means of Baranyi model, selecting inactivation constant as the more sensible parameter. The factorial design was applied to the constant obtained, calculating secondary model equation. In accordance with system composition, the existence of different kind of inactivation curves was verified: in general, a tail presence was detected and, it was not observed a shoulder in the systems containing KS or EE alone. These results highlight that the additives added affect yeast thermal inactivation. The increase of KS doses promoted a significant enhancement of inactivation constants whereas the increase of sweetener level protected yeast from

thermal treatment. It was not observed significant interaction between both variables (KS-EE). On the base of the mentioned results, it is emphasized that KS added to systems sweetened with EE would allow minimizing the protected effect of them since preservative addition increases thermal inactivation. From the equation of secondary model it was calculated that a level of 0.0135% w/w of KS would be necessary to nullify the protected effect produced by 0.350% w/w of EE presence in studied systems. It was concluded that the presence of assayed additives affects yeast thermal inactivation and an appropriate selection of them would allow diminishing thermal treatment severity.

PALABRAS CLAVE: *extracto de esteviósidos, sorbato de potasio, Z. bailii, inactivación térmica.*

KEWYWORDS: *Steviosides extract, potassium sorbate, Z. bailii, thermal inactivation.*

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, el hecho que la obesidad haya alcanzado tasas de epidemia a nivel mundial, ha originado en la población la necesidad de disponer de alimentos funcionales como lo son los reducidos en su tenor glucídico. La principal causa de deterioro de dichos alimentos, tales como jugos, jaleas y mermeladas, es la inestabilidad microbiológica debido, principalmente, a la acción de levaduras, en particular, *Zygosaccharomyces bailii* (Hatcher *et al.* 1992). Dicha levadura es osmofílica, resistente a la pasteurización y a preservadores lipofílicos, capaz de desarrollarse en condiciones anaerobias, de muy elevada acidez y con necesidades nutritivas mínimas (Thomas y Davenport 1985, Cheng *et al.* 1999).

A fin de desarrollar productos microbiológicamente estables y con adecuadas propiedades sensoriales, los alimentos de reducido tenor glucídico requieren la adición de edulcorantes, antimicrobianos y espesantes. Además, cabe destacar que en relación a la elección de dichos aditivos, debe considerarse la existencia de una creciente demanda por parte de los consumidores en disminuir la ingesta de aditivos sintéticos, sustituyéndola por los de origen natural. En esta línea se ubica el extracto de esteviósidos (EE), el cual se obtiene de una hierba de origen sudamericano, *Stevia Revaudiana* Bertoni, que posee un alto poder edulcorante (300 veces mayor al de la sacarosa). Su uso disminuye el riesgo de aparición de caries, la presión sanguínea y ayuda al riñón en la excreción de minerales (Huxtable y Kinghorn 2002, Geuns 2003).

Una barrera adicional para controlar el deterioro de alimentos de reducido tenor glucídico es la incorporación de agentes antimicrobianos. El ácido sórbico y su sal de potasio (KS) son ampliamente empleados como preservadores en este tipo de productos. La efectividad de dichos preservadores se ve modificada por factores del entorno y del procesamiento tales como pH, presencia de solutos, tratamiento térmico aplicado, presencia de otros aditivos. A modo de ejemplo podemos mencionar que el uso xilitol disminuye la velocidad de crecimiento de *Z. bailii*, resultando entonces ventajoso su empleo para controlar el desarrollo de la mencionada levadura (Gliemmo *et al.* 2006a). Por otra parte, el uso combinado de KS y calor ejerce un efecto sinérgico sobre la inactivación térmica de las levaduras (Makdesi y Beuchat 1996, Gliemmo *et al.* 2006b). Este comportamiento permitiría disminuir la severidad del tratamiento térmico aplicado.

Para describir y cuantificar los cambios que ocurren en una población microbiana en función del tiempo de tratamiento térmico se emplean distintos modelos empíricos primarios, uno de ellos es el modelo de Baranyi (Xiong *et al.* 1999). Su empleo permite modelar los cuatro tipos de curvas de inactivación térmica comúnmente observados, como lo son las lineales, con fase lag, con hombro y las sigmoideas (Xiong *et al.* 1999). A través de la obtención de los parámetros característicos del modelo primario, junto con la variación de los mismos debido a factores ambientales, se pueden obtener modelos secundarios y, de esta manera, predecir los cambios que se producen en la población microbiana cuando es sometida a diversas condiciones ambientales específicas.

Es de destacar que no se dispone de información acerca del efecto de EE sobre la supervivencia de *Z. bailii* y sobre la acción antimicrobiana del KS. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la adición de EE y de KS sobre la inactivación térmica de *Zygosacharomyces bailii*, en sistemas acuosos ácidos que modelan alimentos de reducido tenor glucídico, tales como jugos, jaleas o mermeladas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Metodología

Se elaboró un inóculo de *Zygosaccharomyces bailii* NRRL 7256 en caldo Sabouraud (Biokar Diagnostics, Beauvais, Francia) y se incubó a 25°C hasta alcanzar la fase estacionaria (30 h) que corresponde a un recuento de aproximadamente 10^7 UFC/ml.

Los sistemas modelo se prepararon en caldo Sabouraud y se les ajustó el pH a 3.0 mediante la adición de ácido cítrico. Se dispensaron alícuotas de 99,00 ml de los mismos por triplicado en erlenmeyers y se esterilizaron. Luego, se templaron a 50.0 (± 0.5) ºC y se les adicionó 1,00 ml del inóculo obteniéndose una población de 1.10^5 UFC/mL. Los erlenmeyers se agitaron durante 60-80 min. con un agitador orbital manteniéndose a 50.0 (± 0.5) ºC. A intervalos de tiempo predeterminados, se retiraron alícuotas de cada sistema y se evaluó la población remante mediante el recuento de viables en placa con agar Sabouraud, las cuales se incubaron a 25 (±0.5)ºC durante 7 días.

Análisis de los datos y diseño experimental

Los datos obtenidos se modelaron empleando la ecuación de Baranyi (Xiong *et al.* 1999), la cual expresa la relación logarítimica entre N, el número de microorganismos al tiempo t y N_0, el número de microorganismos al tiempo cero, en función del tiempo (t) de tratamiento:

$$\log \frac{N}{N_0} = \log\left[q_B + \left(1 - q_B\right)e^{-k\left(t - B(t)\right)}\right]$$

siendo q_B = ($Nmin/N$); $Nmin$ es la concentración remanente de células en la fase de cola; k es la máxima velocidad relativa de muerte y $B(t)$ es función del tiempo de latencia.

Los parámetros de las curvas de muerte de cada sistema se estimaron por regresión no lineal de los datos, seleccionándose la constante de inactivación térmica como el parámetro más sensible.

Para estudiar el efecto de la presencia de EE y de KS sobre dichas constantes, se aplicó un diseño factorial, en tres bloques, con dos variables a dos niveles (2^2) y un punto central, realizando un total de 15 experimentos. Las variables y niveles se indican en la **Tabla 1.** El nivel máximo de KS fue elegido teniendo en cuenta su mínima concentración inhibitoria frente al desarrollo de *Z. bailii* en los sistemas de estudio, determinada en estudios previos (Hracek *et al.* 2009).

Tabla 1. Niveles de las variables del diseño factorial 2^2.

Variable Independiente	Código de variable	Código de nivel		
		-1	0	+1
Nivel de sorbato de potasio (% m/m)	x_1	0,000	0,0125	0,0250
Nivel de extracto de esteviósidos (% m/m)	x_2	0,000	0,175	0,350

El efecto de cada variable independiente sobre la velocidad de inactivación térmica se evaluó a través del siguiente modelo de regresión:

$$k = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{12} x_1 x_2$$

donde x_1 y x_2 son las variables de estudio; β_0, el término de intersección; β_1 y β_2, los coeficientes lineales, y β_{12}, el coeficiente de interacción.

La regresión no lineal de los datos y la creación del diseño se realizaron mediante el empleo del programa Statgraphics (Statgraphics Plus para Windows, versión 5.0, 2001, Manugistics, Inc., Rockville, Maryland, USA). La significatividad estadística se evaluó al nivel del 5 % ($P \leq 0,05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Curvas de inactivación térmica

Las curvas de muerte térmica obtenidas fueron modeladas satisfactoriamente mediante la ecuación de Baranyi (R^2 = 0,92 - 0,99). De acuerdo con Xiong *et al.* (1999) y Gliemmo *et al.* (2006b), k fue el parámetro más sensible del modelo de Baranyi, por lo tanto el mismo fue utilizado como respuesta en el diseño factorial aplicado. Los valores de velocidad de inactivación térmica obtenidos para los distintos sistemas ensayados se exponen en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Comparación entre los datos observados y los predichos por el modelo para la velocidad de inactivación térmica de *Z. bailii*.

Ensayo	Variable Independiente		Valor experimental	Valor predicho
	x_1 (% m/m)	x_2 (% m/m)		
1	0,000	0,000	0,197	0,183
2	0,0125	0,175	0,200	0,201
3	0,0250	0,000	0,280	0,265
4	0,0250	0,350	0,210	0,241
5	0,000	0,350	0,120	0,116
6	0,000	0,000	0,170	0,189
7	0,0125	0,175	0,224	0,207
8	0,0250	0,000	0,250	0,270
9	0,0250	0,350	0,290	0,247
10	0,000	0,350	0,100	0,122
11	0,000	0,000	0,180	0,169
12	0,0125	0,175	0,150	0,187
13	0,0250	0,000	0,260	0,250
14	0,0250	0,350	0,220	0,227
15	0,000	0,350	0,125	0,102

En la **Figura 1** se muestran, a modo de ejemplo, los datos experimentales y las curvas predichas para el sistema conteniendo 0,0250% m/m de KS y 0,350% m/m de EE (panel A) y para el sistema con 0,0250% m/m de KS adicionado (panel B). De acuerdo con la composición del sistema, se verificó la existencia de distintos tipos de curvas de inactivación: en general, se detectó la presencia de una cola (**Figura 1**, panel A) y, en aquellos sistemas que contenían sólo KS o EE, no se observó la existencia de hombro (**Figura 1**, panel B). La existencia de una cola sugiere la presencia de una subpoblación resistente al calor, probablemente debido a la formación de un pequeño número de ascoesporas, las cuales son más resistentes que las células vegetativas. El mismo comportamiento fue previamente reportado en levaduras osmofílicas (Corry 1976, Gliemmo *et al.* 2006). Estos resultados ponen de manifiesto que los aditivos añadidos afectan la inactivación térmica de la levadura. Cabe mencionar que, en trabajos previos realizados empleando sistemas modelo acuosos de composición similar a los ensayados, se verificó que el agregado del edulcorante aspartamo incrementó la constante de inactivación témica de *Z bailii*. Ello pone de manifiesto la importancia de la adecuada selección de los edulcorantes a emplear a fin de asegurar la estabilidad microbiológica del sistema.

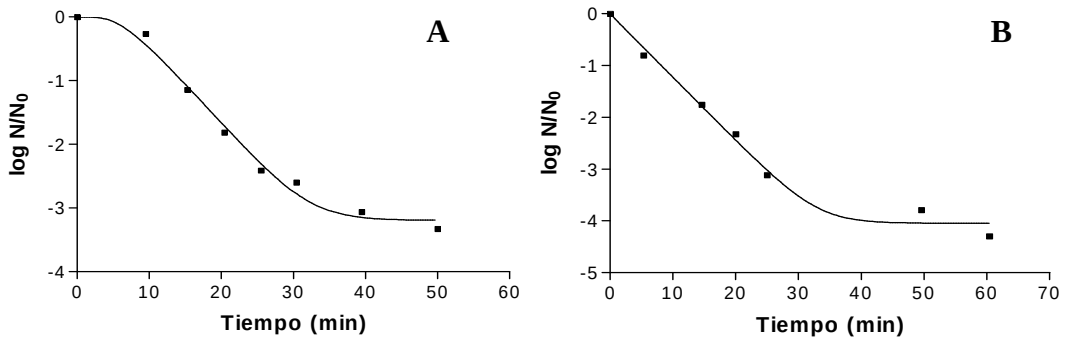


Figura 1. Curvas de inactivación térmica de *Z. bailii* modeladas. Panel A: sistema conteniendo 0,0250% m/m de sorbato de potasio y 0,350% m/m de extracto de esteviósidos. Panel B: sistema conteniendo 0,0250% m/m de sorbato de potasio. (■) datos experimentales, (—) modelo ajustado.

Diseño experimental

La relación entre las variables independientes y la respuesta fue ajustada al siguiente modelo de regresión:

$$k = 0{,}1894 + 0{,}0515 * \textit{nivel de KS} - 0{,}0226667 * \text{nivel de EE} + 0{,}011\, \textit{nivel de KS} * \text{nivel de EE}$$

Los valores de R^2 (85,3%) y R^2 ajustado (81,3%) obtenidos indican una dependencia y correlación entre los valores de respuesta observados y predichos (**Tabla 2**). Esta ecuación representa un modelo secundario, indicativo del efecto del nivel del preservador y del EE sobre la inactivación térmica de *Z. bailii*.

En la **Figura 2** se observa que el incremento de la concentración de KS promovió un aumento significativo de las constantes de inactivación (P = 0,001). Dicha tendencia armoniza con el signo positivo del coeficiente de regresión correspondiente. Por otra parte, el aumento del nivel de edulcorante protegió a la levadura del tratamiento térmico (**Figura 2**, P = 0,0201), lo cual se correlaciona con el valor negativo de su coeficiente de regresión. No se observó una interacción significativa entre ambas variables (KS-EE).

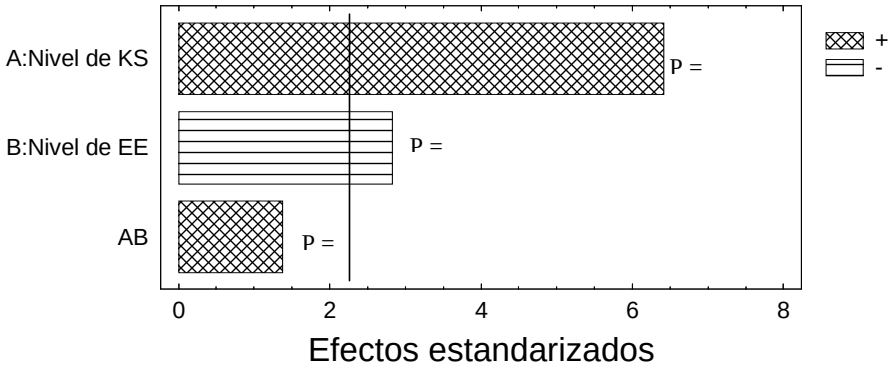


Figura 2. Gráfico de Pareto de los efectos estandarizados de las variables de estudio y sus interacciones sobre la velocidad de inactivación térmica.

En base a los resultados comentados, es de destacar que, el agregado de KS a sistemas endulzados con EE permitiría minimizar el efecto protector que los mismos ejercen ya que, la adición del preservador incrementa la inactivación térmica de la levadura. Nótese que, si bien la interacción no fue significativa, la presencia conjunta de ambos aditivos aceleraría la muerte térmica de la levadura (**Figura 2**). Por lo tanto, a partir de la ecuación del modelo secundario, se calculó el nivel del preservador que sería necesario adicionar a un sistema conteniendo 0,350% m/m de EE para que la constante de velocidad de muerte térmica sea igual a la predicha para un sistema libre de aditivos. Como resultado se obtuvo que una concentración de 0,0135% m/m de KS sería necesaria para nulificar el efecto protector ejercido por la presencia de 0,350 % m/m del edulcorante.

CONCLUSIONES

La presencia de los aditivos ensayados afectó la inactivación térmica de *Z. bailii*. Se obtuvo un modelo predictivo, el cual permitió determinar que se necesita 0,0135% m/m de KS para contrarrestar el efecto protector de 0,350% m/m de EE sobre la muerte térmica de la levadura. Además, debe tenerse en cuenta que una adecuada selección de los niveles de aditivos permitiría disminuir la severidad del tratamiento térmico.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo económico de la Universidad de Buenos Aires, del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina y de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica de la República Argentina.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Cheng L, Moghraby J, Piper PW. 1999. Weak organic acid treatment causes a trehalose accumulation in low-pH cultures of *Saccharomyces cerevisiae*, not displayed by the more preservative-resistant *Zygosaccharomyces bailii*. FEMS Microbiology Letters, 170: 89-95.

Corry J. 1976. The effect of sugars and polyols on the heat resistance and morphology of osmophilic yeasts. Journal of Applied Bacterioloy, 40: 269-276.

Geuns JMC. 2003. Molecules of Interest Stevioside. Phytochemistry, 64: 913-921.

Gliemmo MF, Campos CA, Gerschenson LN. 2006a. Effect of some humectants and potassium sorbate on the growth of *Z bailii* in model aqueous systems resembling low sugar products. Journal of Food Engineering, 77: 761–770.

Gliemmo MF, Campos CA, Gerschenson LN. 2006. Effect of sweet solutes and potassium sorbate on the thermal inactivation of *Z. bailii* in model aqueous systems. Food Research International, 39: 480–485.

Hatcher JrWS, Weihe JL, Splittstoesser DF, Hill EC, Parish ME. 1992. Fruit beverages. En: Vanderzant C, Splittstoesser DF, editores. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 3ª ed. NW Washington: American Public Health Association. pag. 953-960

Hracek VM, Gliemmo MF, Campos CA. 2008. Efecto de esteviósidos sobre la mínima concentración de sorbato de potasio inhibitoria del crecimiento de *Zygosaccharomyces bailii* y *Zygosaccharomyces rouxii* en sistemas modelo acuosos. Libro de resúmenes de las XIII Jornadas Argentinas de Microbiología, Rosario, Santa Fe, Argentina.

Huxtable R, Kinghorn AD. 2002. The Genus Stevia. 1ª ed. Londres: Taylor and Francis. pag 211.

Makdesi AK, Beuchat L. 1996. Evaluation of media for enumerating heat-stressed benzoate-resistant *Zygosaccharomyces bailii*. International Journal of Food Microbiology, 33: 169-181.

Thomas DS, Davenport RR. 1985. *Zygosaccharomyces bailii*- a profile of characteristics and spoilage activities. Food Microbiology, 2: 157-169.

Xiong R, Xie G, Edmondson AS, Linton RH, Sheard MA. 1999. Comparison of the Baranyi model with the modified Gompertz equation for modeling thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A. Food Microbiology, 16: 269-279.

Color, textura y aceptabilidad de productos de kiwicha

Color, texture and acceptance of kiwicha products

Jiménez, P[1], Armada, M[1], Corregidor, J[2], Hoyos, N[2]

[1]Facultad de Ingeniería, INIQUI, CIUNSa, [2] Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Nacional de Salta-
Avenida Bolivia Nº 5150- Salta-CP 4400
amaru@unsa.edu.ar

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar en productos precocidos de kiwicha (hojuelas, extrudidos y harinas precocidas) características de textura, color y aceptabilidad.

Se trabajó con granos de kiwicha de la variedad Caudatus, Ecotipo Fuerte Alto, cosecha 2007, procedente del Departamento de Cachi, Provincia de Salta. Se caracterizaron los granos, y su correspondiente harina 60 mesh, a partir de la cual se elaboraron: harinas precocidas (HP): HP1 secada en estufa con corriente de aire 60 minutos a 100° C y HP2 secada en microondas 4 minutos a potencia media, hojuelas y extrudidos. A los alimentos obtenidos se les determinó color, en Colorímetro de Reflectancia, textura en Texturómetro QTS 25 (CNS Farnell), y actividad de agua en un equipo Rotronic Hygroskop BT. Las hojuelas y los extrudidos fueron evaluados sensorialmente mediante la Prueba de Aceptabilidad. El color se determinó en base a los parámetros CIE L* a* b*(L*: luminosidad, a*: su posición entre magenta y verde y b*, su posición entre azul y amarillo).

El valor de "L", fue mayor para HP2* con respecto al valor de HP1* (79,22 vs. 77,64). El valor "L" asociado a un valor negativo de "a" indicó que HP1* presentó una mayor luminosidad, mientras el mayor valor de "L" con un valor de a positivo para HP2* indicó que la muestra tuvo una mayor cremosidad. En hojuelas y extrudidos los valores de "L" fueron menores a los encontrados en HP1* y HP2*, lo que indicó una menor blancura. El parámetro "a" en HP2*, hojuelas y extrudidos mostró una tendencia hacia el rojo y, en relación al parámetro "b" al amarillo, con el mayor valor para extrudidos.

Los parámetros de textura de los productos formulados se determinaron en relación a patrones comerciales; la fuerza de fractura de las hojuelas de kiwicha fue menor que los copos de maíz, con una menor adhesividad, pero con mayor rigidez lo que ocasionaría un mayor trabajo masticatorio. Para los extrudidos, la menor fuerza de fractura fue para el extrudido de kiwicha (189,16 g), y la mayor para el extrudido mezcla maíz:kiwicha 50:50 (723,66 g), con respecto al patrón. El extrudido de kiwicha presentó mayor masticabilidad, necesitó menos fuerza para fracturarse y su adhesividad fue menor al extrudido patrón. Los extrudidos mezcla (maíz kiwicha 50:50, 70:30), aumentaron su dureza y casi duplicaron el trabajo masticatorio con respecto al extrudido patrón y al de kiwicha. La a_w de los productos formulados se encontró entre 0,30 y 0,57 lo que aseguró buena estabilidad al almacenamiento en condiciones de estante. La evaluación sensorial se realizó para los extrudidos de kiwicha, maíz kiwicha 50:50, 70:30 y extrudido de maíz (patrón), y para hojuelas de kiwicha, utilizando copos de maíz (comerciales sin saborizar), la mayor aceptabilidad fue para el extrudido de maíz (69%) y la menor aceptabilidad para el extrudido de kiwicha (35%). La aceptabilidad de hojuelas de kiwicha fue buena (82%), presentando los copos de maíz un 90% de aceptación.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate in precooked products of kiwicha (flakes, pre-flours cooked and extruded) characteristics of texture, color and acceptability.

We worked with kiwicha seeds of the variety caudatus, ecotype Fuerte Alto, vintage 2007, from the Department of Cachi, province of Salta. Were characterized for their grain and flour 60 mesh, since it is pre-flours cooked (HP): HP1, drying in an oven with air flow 60 minutes at 100 ° C and HP2, drying in microwave 4 minutes on medium power), flakes and extruded.

We analyzed in the products: color (in color reflectance), texture (texture in CNS Farnell QTS-25), and water activity (in a Rotronic Hygroskop BT). The flakes and the extruded were evaluated by sensory test of acceptability.

Color was determined based on the parameters CIE L * a * b * (L *: lightness, a *: its position between magenta and green and b *, its position between yellow and blue). The "L" was greater for HP2 * to the value of HP1 * (79.22 vs. 77.64). The value "L" associated with a negative value of "a" indicated that HP1 * introduced a higher luminosity, while the highest value of "L" with a value of a positive HP2 * indicates that the sample had a higher dye cream. The values of "L" in flakes and extruded were less than those found in HP1 and HP2 * *, indicating a less whiteness. The parameter "a" in HP2 *, extruded and flakes showed a tendency towards red, and in relation to the parameter "b", a tendency to yellow, with the greatest value for extruded.
The parameters of texture of formulated products were determined in relation to patterns of trade, the fracture strength of kiwicha flakes was lower than the corn flakes, with a lower adhesiveness, but with greater rigidity which would cause more work masticatory
For extruded, the lowest fracture strength was from the kiwicha extruded (189.16 g) and higher for the extruded mixture corn:kiwicha 50:50 (723.66 g) with respect to the pattern. The extruded kiwicha presented a couple of chewed requires less force to fracture and the adhesiveness was lower than extruded pattern. The extruded mixture (corn kiwicha 50:50, 70:30), increased hardness and nearly doubled its masticatory work with respect to the pattern and kiwicha extruded.
Sensory evaluation was conducted by the kiwicha extruded, corn kiwicha 50:50, 70:30 and corn extruded (pattern), and flakes kiwicha using cornflakes (without commercial flavored), the acceptability was greater for extruded corn (69%) and the lower the acceptability of extruded kiwicha, which was accepted by only 35%. The flakes kiwicha were an acceptability of 82% and the corn flakes of 90%

PALABRAS CLAVE: *kiwicha, textura, aceptabilidad.*

KEYWORDS: *kiwicha, texture, acceptability.*

INTRODUCCIÓN

El amaranto es un grano originario de América del Sur, donde fue domesticado; es considerado un pseudocereal; pertenece a otra rama botánica que incluye verduras como la remolacha y la planta de espinaca.
Comúnmente cultivado durante el tiempo de los Incas en el Perú y de los Aztecas en México. La mayor variación genética se encuentra en los Andes (Ecuador, Perú, Bolivia y Argentina).
En la República Argentina se cultiva en las Provincias de Salta, Jujuy y Catamarca. En la provincia de Salta las regiones aptas para el cultivo del amaranto son: Monte Occidental, Puna, Bosque o Selva de Transición y Selva Montana (Sánchez 1991)
Las semillas de amaranto tienen un excepcional interés alimenticio, por la calidad y cantidad de proteínas que posee, y su composición en hidratos de carbono y grasas, la cual es más equilibrada que los cereales convencionales
La calidad de la proteína de amaranto, denominada amarantina o irapuatina es superior nutricional y funcionalmente a cualquier otra proteína vegetal conocida hasta ahora. Su perfil aminoacídico es equilibrado y el hecho de que contenga lisina, aminoácido esencial en la alimentación humana, y que suele encontrarse en poca cantidad en la mayoría de los cereales, hace que la misma sea de mejor calidad (FAO 1997)
El grano de amaranto no posee prolaminas, por lo que es un alimento apto para celiacos (Cardozo 1996).
El componente principal en la semilla del amaranto es el almidón, representa entre el 50 y 65 % de su peso seco. El diámetro del granulo de almidón oscila entre 1-3 micrones, mientras que los de maíz son hasta diez veces más grandes y los de la papa pueden ser hasta cien veces mayores. Estas reducidas dimensiones del gránulo de almidón de amaranto facilitan su digestión que resulta de 2,4 a 5 veces más rápida que el almidón de maíz. El contenido de fibras es del 2 al 13 %. Es rico en minerales como calcio, fósforo y hierro.
Su balance de carbohidratos, grasas y proteínas muestra que se necesita consumir menos cantidad para recibir los mismos beneficios nutritivos que con todos los demás cereales (González Castañeda, et. al. 2005)

Estas propiedades particulares que presenta el amaranto, hace que se constituya en un alimento de importancia, para la población de la Región; además por sus características funcionales permite ser incorporado en la alimentación como ingrediente de preparaciones o simplemente como alimento en sí (Manrique Lara 1996)

El desarrollo de tecnologías apropiadas que permitan conservar sus características nutritivas, aumentar su tiempo de conservación, facilitar su empleo como ingrediente con un tiempo de elaboración mínimo; podría lograrse por la obtención de productos derivados del grano de amaranto, como son los alimentos precocidos; éstos son sometidos a procesos de cocción tales como: extrusión, laminado, aplastado, tostado, calor húmedo, vapor, u otros tratamientos, produciendo modificaciones en sus componentes (gelatinización del almidón, desnaturalización de proteínas y otros) que favorecen la digestibilidad del alimento.

La extrusión es un proceso mediante el cual una mezcla de materiales se somete a fuerzas de presión y cizalla, que transforman su estructura molecular permitiendo crear nuevas formas y texturas; permitiendo la producción de una gran cantidad de productos de diferentes formas, texturas, colores y sabores a partir de materias primas básicas. Entre los productos posibles de fabricar se encuentran almidones precocidos y modificados, cereales de desayuno, productos "snack", sustitutos de panadería (Estévez 1998)

En el caso de harinas precocidas, la principal característica es la facilidad de hidratación, solubilización y desarrollo de una textura viscoelástica como resultado de los almidones modificados que tiene (Rodríguez Sandoval et. al. 2006)

Las hojuelas o escamas (Flakes) proteínicas de origen vegetal: son los productos desgrasados que se presentan en forma de laminillas y que por molienda dan origen a las harinas y sémolas desgrasadas (De La Canal 2000)

La harina del grano de kiwicha es adecuada para la preparación de panes con o sin la combinación de otros ingredientes, o para producir una variedad de productos como las tortillas. Para la fabricación de panes u otros productos a base de levaduras la kiwicha debe ser mezclada con harina de trigo para facilitar su procesamiento; también puede acompañar en forma de guarnición a platos tradicionales en el norte argentino (Informe de Economía y Producción 2007)

En función de lo anteriormente expuesto se planteó como objetivo de esta investigación la elaboración de alimentos precocidos de kiwicha: harinas precocidas, hojuelas y extrudidos

MATERIAL Y MÉTODOS

Se trabajó con granos de kiwicha de la variedad Caudatus, Ecotipo Fuerte Alto, cosecha 2007, procedente del Departamento de Cachi, Provincia de Salta. Se emplearon las instalaciones y el equipamiento del Laboratorio de Alimentos de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de Salta.

Obtención de harina de kiwicha

Se obtuvo en el laboratorio, utilizando un molinillo a hélice, el producto de la molienda se colocó en el equipo tamizador Zony Test, hasta obtener una harina 60 mesh (0,25 mm de diámetro de malla, 250 micrones según Normas ASTM).

Elaboración de productos precocidos

Harinas precocidas. En la elaboración de harina precocida se partió de granos previamente tratados por calor húmedo durante 15 minutos con una relación sólido líquido 1:3, se alcanzó una temperatura de 80° C (considerando como temperatura de gelatinización del almidón 60 a 95° C) (Robutti 1995)

Los granos así tratados, fueron colocados sobre bandejas y secados en estufa con corriente de aire, durante 15, 30 y 60 minutos a una temperatura de 100° C.

En granos secados durante 15 minutos (a) se observó aglomeración de granos y restos de humedad en el recipiente que los contenía.

En granos secados durante 30 minutos (b) se observó una mayor dispersión de granos, menos grupos de aglomeración y cambios de color sobre todo en granos sueltos, los cuales eran más oscuros, que los que aún se mantenían adheridos entre sí.

Los granos secados durante 60 minutos © estaban todos separados, sin presencia de humedad visible, con un color uniforme (más oscuro).

Las tres muestras fueron enfriadas y conservadas en recipientes herméticamente cerrados a temperatura ambiente, al cabo de 10 días en las muestras (a) y (b) se evidenció desarrollo de mohos

(debido al contenido de humedad presente aún en las muestras), observándose ausencia de éstos en la muestra (c).
Para el secado en microondas, los granos pretratados se colocaron en placas de Petri, a potencia media durante 2, 4 y 6 minutos, mezclando la muestra con una varilla de vidrio cada 1 minuto. En la muestra secada durante 6 minutos se observó, a diferencia de las restantes, ausencia de humedad en el recipiente, ausencia de granos adheridos, coloración más oscura y olor característico a tostado.
De acuerdo a las características observadas en granos pretratados y secados en estufa y microondas se seleccionaron los secados durante 60 minutos en estufa (HP1*) y 6 minutos en microondas (HP2*), para la elaboración de las harinas precocidas y su posterior análisis.
Los granos, posteriormente fueron molidos en un molinillo a hélice y tamizados hasta obtener harinas 60 mesh (0,25mm. De diámetro).
Hojuelas. Para la obtención de las mismas se partió de una mezcla de harina de kiwicha (60 mesh) y agua, en proporción 1:0,8, con una humedad final de la pasta de 47%. El hojuelado se realizó sometiendo la pasta obtenida a 150° C entre 2 planchas planas calefaccionadas, durante un tiempo de residencia de 25 segundos.
Se distribuyeron pequeñas porciones de la mezcla sobre la plancha inferior, se aplicó presión con la plancha superior, con el fin de dar forma de hojuelas y precocer la mezcla.
Realizado el hijuelado, el producto fue enfriado y conservado en recipientes de plástico herméticamente cerrados.
Extrudidos. Fueron realizados en el Instituto de Tecnología de los Alimentos (ITA) de la Universidad Nacional del Litoral, de la Provincia de Santa Fe.
El equipo utilizado fue un Extrusor Brabender 10 DN, compuesto con un tornillo de relación de compresión 3/1, con un diámetro de boquilla de 2mm.
La humedad de alimentación de la kiwicha cruda al extrusor fue del 16%. Los parámetros de proceso en el extrusor fueron: 180° C y 175 rpm.
Los productos elaborados, harinas precocidas, hojuelas y extrudidos, fueron evaluados en composición y características de calidad: funcionales y sensoriales.
Composición química. Se determinó sobre las harinas y los productos precocidos, humedad, proteína, Almidón, grasas, cenizas, hierro, calcio y fibras por diferencia, según técnicas oficiales de A.O.A.C. (A.O.A.C. 1996)
Características funcionales. Se determinó color sobre los productos elaborados, utilizando un colorímetro de Reflectancia (Color Tec PCM-Cole Parmer) y actividad de agua (a_w) en un equipo Rotronic Hygroskop BT, el cual mide la a_w desde un valor de 0,01 a 1,00, utilizando un sensor de humedad relativa (% HR).
Textura. La textura de los productos se determinó en un Texturómetro QTS 25 (CNS Farnell). Se aplicó un Test de Compresión cuyas características fueron:
-Total de ciclos: 1
-Unidad de meta: distancia
-Unidad de medida: g
-Valor de meta: 5mm (unidad de distancia)
-Velocidad de prueba: 60 mm / minuto
-Velocidad de regreso: 1000 mm/min vel. máx.
-Valor de Gatillo (punto de fuerza): 4 g
-Celda de carga: 25 kg
-Espacio de soporte: 60 mm
Los parámetros determinados fueron: fuerza de fractura, adhesividad, trabajo realizado por dureza, trabajo realizado en la 1º fractura y rigidez.
Evaluación sensorial. Se evaluó el nivel de aceptabilidad de los productos utilizando una Escala Hedónica de nueve puntos. Se trabajó con un grupo de 100 panelistas no entrenados, compuesto por niños y adultos.
La población adulta comprendió edades entre 19 y 57 años, pertenecientes a la comunidad universitaria (estudiantes, docentes, PAU, otros) La prueba se realizó en el Laboratorio de Dietotecnia de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Salta.
La población de niños comprendió edades entre 12 y 14 años alumnos de 7mo grado de la Escuela Nº 4031 “Pedro Bonifacio Palacios”, situado en el Barrio Ciudad del Milagro, de la Provincia de Salta. La

muestra fue designada por autoridades de la Escuela, comprendió las dos secciones de 7mo grado. La prueba se llevó a cabo en la institución antes mencionada.
La evaluación sensorial se realizó para los extrudidos de kiwicha, mezclas maíz kiwicha 50:50, 70:30 y extrudido de maíz, a fin de establecer el nivel de aceptabilidad del extrudido de kiwicha con respecto a los demás. También se realizó evaluación sensorial en hojuelas de kiwicha, junto a copos de maíz comerciales, sin saborizar, a fin de establecer niveles comparativos de aceptabilidad.

Análisis de Datos

Los resultados de las evaluaciones en la materia prima y productos obtenidos se expresan en Promedios con sus respectivos Desvíos Estándar y ordenados en cuadros. El análisis estadístico se realizó utilizando el Método de Análisis de Varianza de un solo factor (ANOVA) ((Murray 1991) y la Prueba de Duncan (Duncan 1955)
Los resultados obtenidos de aceptabilidad de los productos elaborados, se expresaron en porcentajes. Se agruparon de acuerdo a los puntajes de la Escala Hedónica en tres categorías Gusta (desde el punto 9 al 6), Indiferente (punto 5) y Disgusta (desde el punto 4 al 1), para determinar el nivel de aceptabilidad de los productos testeados. (Whatts 1992, Hough 2005)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinaciones químicas

En la **Tabla 1** se presentan los valores promedios de composición química proximal de los productos elaborados.

Tabla 1. Composición química proximal de harina de kiwicha (60 mesh) y de los productos

Componentes	Materia Prima* (g/100g)	Productos			
		Hojuelas (g./100g.)	HP1* (g./100g.)	HP2* (g./100g.)	Extrudido (g./100g.)
	X ± DS	X ± DE	X ± DE	X ± DE	X ± DE
Hidratos de Carbono	62,50 ± 0,28	62,2 ± 0,1	62,1 ±0,3	62,2 ± 0,15	62,3 ±0,56
-Proteínas	15,55 ± 0,094	15,39± 0,02^{a}	15,4 ±0,042^{a}	15,37±0,032^{a}	14,03±0,016^{b}
-Grasas	7,35 ± 0,042	7,08 ± 0,008	7,1 ± 0,05	7,15 ± 0,005	7,00 ± 0,008
-Humedad	8,40 ±0,049	2.66 ± 0,1^{c}	5,6 ± 0,16^{b}	6,2 ± 0,08^{a}	1,54± 0,4^{d}
-Cenizas	4,9 ± 0,081	4,7± 0,16^{bc}	4,65 ± 0,02^{c}	4,65 ± 0,02^{c}	5,3 ± 0,16^{a}
-Fibras	9,7**	10,63**	10,75**	10,63**	11,37**
-Calcio	169,4± 2,52	167± 0,016^{a}	64,2 ± 3,84^{bc}	64,2± 3,84^{c}	167 ± 0,016^{a}
-Hierro	17,40 ± 0,29	17,01± 0,008	16,54 ± 3,46	16,54±3,46	17,03 ± 0,024

*Harina de kiwicha 60 mesh (g/100g en base húmeda).
HP1*: secado en estufa con corriente de aire (60 minutos a 100° C).
HP2*: secado en microondas (4 minutos a potencia media).
** Calculado por diferencia.
Letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras.

El contenido de Hidratos de Carbono fue similar para todos los productos obtenidos. También fueron semejantes a los encontrados en la materia prima, lo cual podría deberse, a que las condiciones de procesamiento permitirían reducir la pérdida de nutrientes.
Al analizar los distintos productos elaborados, estadísticamente no se encontraron diferencias significativas, según el análisis de varianza.
El contenido de proteínas fue semejante al de la materia prima con valores que van de 14,03g/100g en extrudidos hasta 15,39g/100g en hojuelas, lo que demostraría que en la molienda y posterior tamizado de los granos se eliminaría material rico en celulosa, conservando valores de proteínas presentes.
El análisis de varianza demostró que existen diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$) entre los productos. Al aplicar la Prueba de Duncan no se encontraron diferencias entre hojuelas, HP1* y HP2*; pero sí entre éstas y extrudidos.
El porcentaje de grasas que presentaron los productos, al igual que para los otros nutrientes fueron similares al de la materia prima, valores elevados, sobre todo si los comparamos con el contenido

lipídico que presentan otros cereales (harina de maíz 4g/100g; harina de trigo 1,8g/100g; cebada 1,5g/100g).
Al aplicar el análisis de varianza no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, entre las distintas muestras.
Los valores de humedad fueron mayores en HP2* y HP1* y menores en hojuelas y extrudidos. Esto se debería a los tratamientos de precocción utilizados, considerando que para la obtención de harina se aplicó calor húmedo ocasionando un mayor contenido de humedad en el producto final.
Según el análisis de varianza ($P \leq 0,05$) se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras. Al aplicar la Prueba de Duncan también se encontraron diferencias estadísticas entre los cuatro productos
Los valores de ceniza fueron semejantes para hojuelas, HP1* y HP2*, similares a los de la materia prima, siendo mayores para los extrudidos, pudiéndose deber ésta diferencia al tratamiento previo, de los granos, a la extrusión, los cuales fueron ligeramente molidos sin tamizar (se realizó sobre grano entero y no con harinas).
El análisis de varianza mostró diferencias estadísticamente significativas entre hojuelas, HP1*, HP2* y extrudidos ($P \leq 0,05$). Al aplicar la Prueba de Duncan no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre hojuelas, HP1* y HP2*, pero si entre éstas y extrudidos.
En cuanto al contenido mineral se observó mayor concentración de calcio en hojuelas y extrudidos cuyos valores fueron de 167 mg/100 g, similares a los encontrados en la materia prima. En el caso de HP1* y HP2* presentaron valores más bajos en relación a los demás productos y a la materia prima, siendo éste de 64,2mg/100 g. Esto podría deberse al tratamiento térmico aplicado, ya que para la elaboración de harina precocida se empleó calor húmedo, lo que ocasionaría mayores pérdidas de minerales, por un aumento de solubilización de los mismos.
El análisis de varianza mostró diferencias estadísticamente significativas entre los productos ($P \leq 0,05$). Según la Prueba de Duncan no hubo diferencias significativas entre hojuelas y extrudidos, pero sí entre éstos y HP1* y HP2*.
El contenido de hierro se encontró entre 16,54 y 17,03 mg/100 g para los productos elaborados, siendo éstos similares a los encontrados en la materia prima.
Estadísticamente no existieron diferencias significativas entre los productos según el análisis de varianza.

Determinaciones Físicas y Funcionales

Color. Con respecto a la determinación de color, éste se determinó en base a los parámetros L, a y b. cuyos valores se observan en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Patrón colorimétrico en los productos elaborados

Muestras	**Escala**		
	L*	**a***	**b***
Harina Precocida 1 (HP1)	77,64	-0,12	15,81
Harina Precocida 2 (HP2)	79,22	1,40	13,99
Hojuelas	64,39	2,63	11,04
Extrudido	56,85	2,84	27,12

El valor de luminosidad L*, fue mayor para HP2* con respecto al valor determinado para HP1* (79,22 vs. 77,64). El valor de L* asociado a un valor negativo de a* indica que HP1* presentó una mayor luminosidad, mientras el mayor valor de L* con un valor de a* positivo para HP2* indicó que la muestra tiene un mayor tinte crema. Esto podría deberse a las reacciones de oscurecimiento, esencialmente Reacción de Maillard, que tendrían lugar durante el proceso de secado aplicado.
En hojuelas y extrudidos los valores de L* fueron menores a los encontrados en HP1* y HP2*, lo que indicó una menor blancura.
El parámetro a* (el cual corresponde a la escala del verde -a al rojo +a), en HP2*, hojuelas y extrudidos tuvieron una tendencia hacia el rojo y, en relación al parámetro b* (que corresponde a la escala del azul -b al amarillo +b), los productos presentaron una tendencia hacia el amarillo, con el mayor valor para extrudidos.

Determinación de Actividad de agua. Esta determinación, se realizó con la finalidad de estimar la estabilidad de los productos a temperatura ambiente, en función del agua libre disponible para deterioro de los productos.
Los valores encontrados para actividad de agua se presentan en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Actividad de agua de los productos elaborados con kiwicha

Muestras	a_w
HP1*	0,30 ± 0,001[a]
HP2*	0,52 ± 0,0008[a]
Hojuelas	0,57 ± 0,002[a]
Extrudidos	0,54 ± 0,005[a]

Letras iguales indican ausencia de diferencias estadísticamente significativas

La a_w de los productos formulados se encontró entre 0,30 y 0,57 lo que asegura buena estabilidad de los mismos al almacenamiento en condiciones de ambiente en estante.
El análisis estadístico de varianza indicó que existen diferencias significativas entre los productos ($P \leq 0,05$). Según Duncan no existen diferencias significativas entre las muestras.
Textura. Los parámetros de textura de los productos formulados se determinaron en relación a patrones. En la **Figura 1** se presentan los valores determinados en hojuelas de kiwicha y copos de maíz (comerciales, sin saborizar), los que se tomaron como patrón.

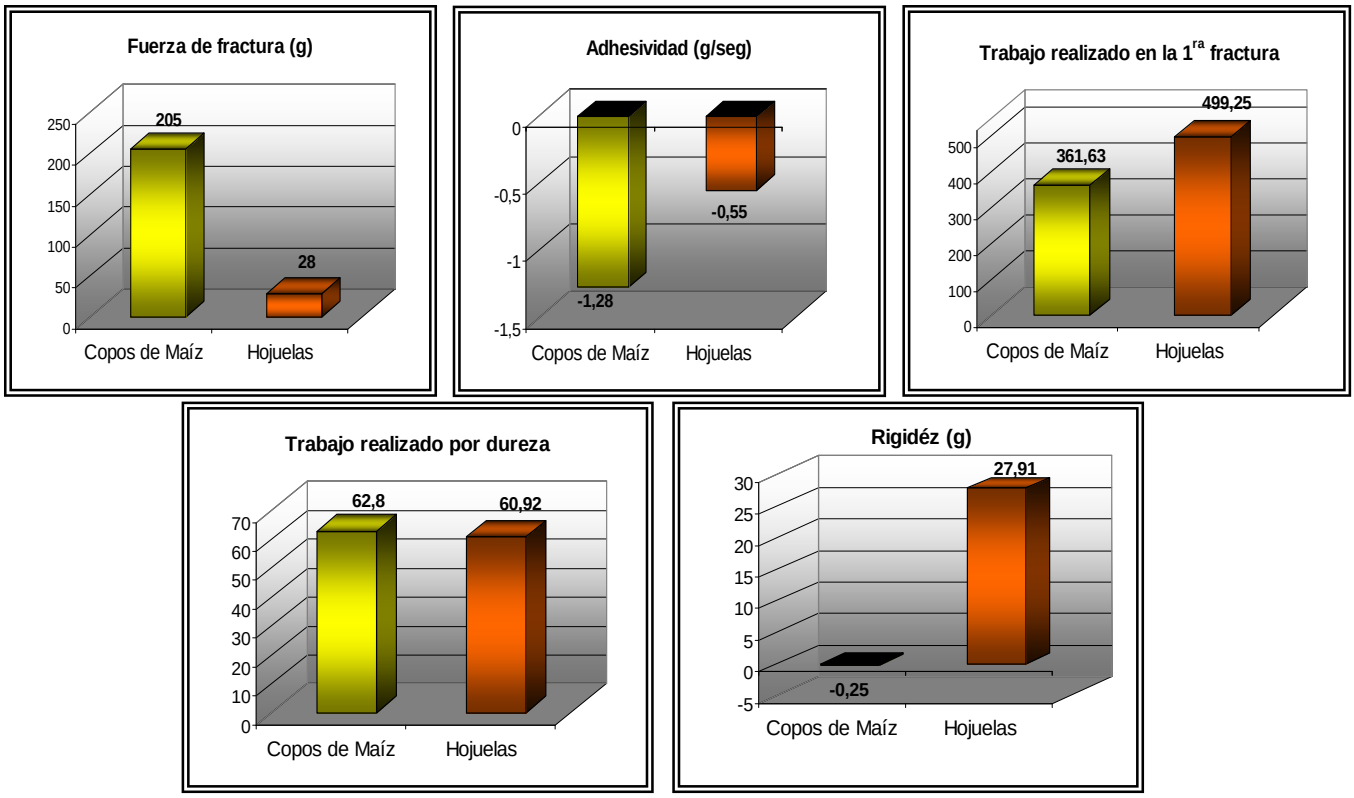


Figura 1. Parámetros texturales determinados sobre Copos de maíz y Hojuelas de kiwicha.

La fuerza de fractura de las hojuelas de kiwicha fue menor que los copos de maíz, con una menor adhesividad.
Sin embargo las hojuelas de kiwicha presentaron una mayor rigidez lo que ocasionaría un mayor trabajo masticatorio (trabajo realizado en la primera fractura).
Para los extrudidos de kiwicha, maíz kiwicha 50:50, 70:30, el patrón fue extrudido de maíz. Los resultados se presentan en la **Figura 2**.

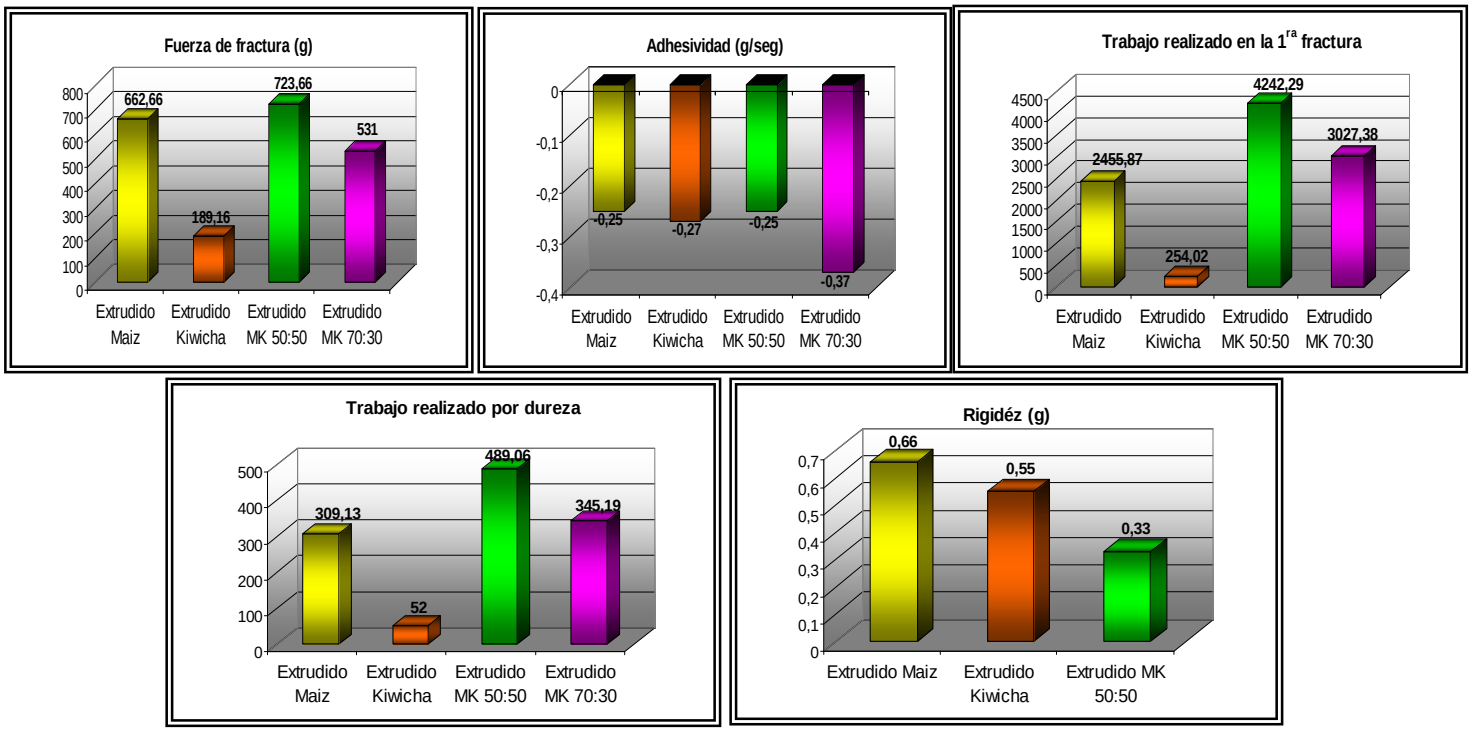


Figura 2. Parámetros texturales determinados sobre Extrudidos de maíz, de kiwicha, y mezclas maíz kiwicha 50:50 y 70:30.

La menor fuerza de fractura, fue para el extrudido de kiwicha (189,16 g), y la mayor para el extrudido mezcla maíz kiwicha 50:50 (723,66 g), con respecto al extrudido de maíz o patrón; lo que coincidió con los valores de carga pico sobre los productos

Se observó la misma tendencia en los valores de trabajo realizado por dureza, el menor valor (52g), fue para el extrudido de kiwicha y el mayor valor para el extrudido mezcla maíz kiwicha 50:50, con referencia al patrón; ocurriendo lo mismo con respecto a los valores de trabajo realizado en la primera fractura.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se podría inferir que el extrudido de kiwicha presentó una mayor masticabilidad, necesitó una menor fuerza para fracturarse y su adhesividad fue menor que el extrudido de maíz o patrón.

Los extrudidos mezcla (maíz kiwicha 50:50, 70:30), aumentaron su dureza y casi duplicaron el trabajo masticatorio (trabajo realizado en la primera fractura) con respecto al extrudido patrón y al de kiwicha.

Evaluación Sensorial. Los resultados de la prueba de aceptabilidad para los distintos extrudidos elaborados se presentan en la **Figura 3**.

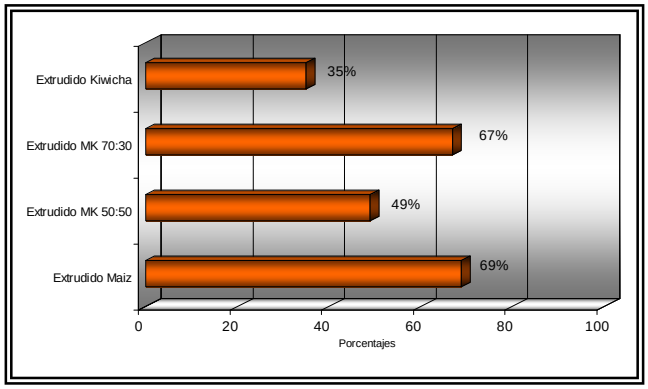


Figura 3. Porcentajes de aceptabilidad para Extrudidos de maíz, mezclas maíz kiwicha 50:50 y 70:30 y de kiwicha

Para el extrudido de maíz, el 30% de las respuestas coincidieron en el punto 6 de la escala hedónica, equivalentes a la categoría “Me gusta levemente”.
Dicho extrudido gustó a un 69%, resultó indiferente a un 19% y disgustó a un 12% de los participantes del panel, lo que indicó que fueron aceptados. Del total de evaluadores que aceptaron el producto un 42% fueron niños (12-14 años) y un 48% adultos (19-57 años).
Los resultados de la prueba de Aceptabilidad realizada sobre el extrudido de maíz kiwicha 50:50 indicaron que el mayor porcentaje de respuestas se registró en el punto 7 de la escala hedónica, que corresponde a la categoría “Me gusta moderadamente”.
El extrudido mezcla maíz kiwicha (50:50), resultó aceptable, ya que gustó al 49%, fue indiferente al 28%, y disgustó al 23% de los evaluadores. Del total de evaluadores que aceptó el producto, el 45% fueron niños (12-14 años) y el 55% adultos (18-57 años).
Para el extrudido maíz kiwicha 70:30, el mayor porcentaje de respuestas se registró en el punto 6 de la escala hedónica (33%) que corresponde a la categoría “Me gusta levemente”.
El extrudido mezcla maíz kiwicha (70:30) resultó aceptable, ya que gustó al 67%, fue indiferente al 19% y disgustó al 14% de los panelistas. Del total que aceptó el producto un 48% fueron niños (12-14 años) y un 52% adultos (19-57 años).
Con respecto al extrudido de kiwicha, se observó el mayor porcentaje de respuestas (27%) en el punto 5 de la escala hedónica, que corresponde a la categoría “Ni me gusta ni me disgusta”.
El extrudido de kiwicha gustó a un 35%, resultó indiferente a un 27% y disgustó a un 38% de los evaluadores, por lo cual se puede decir que no fue aceptado por la mayoría (61% niños y 39% adultos).
Según la prueba de aceptabilidad en los distintos extrudidos se puede observar que el extrudido de mayor aceptabilidad fue el tomado como patrón (extrudido de maíz) siendo el de menor aceptabilidad el extrudido de kiwicha. .
Los resultados de la prueba de aceptabilidad realizada a los copos de maíz (patrón comercial sin saborizar) y a las hojuelas de kiwicha se presentan en la **Figura 4**.

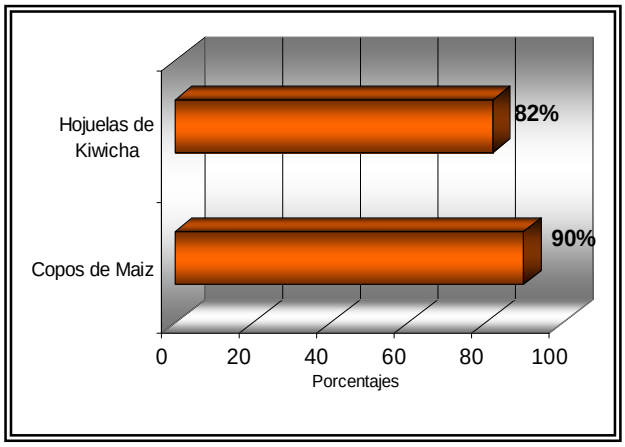


Figura 4. Porcentajes de aceptabilidad para Copos de maíz y Hojuelas de kiwicha

Para los copos de maíz (patrón), el mayor porcentaje de respuestas (28%), se registró en el punto 8 de la escala hedónica, que corresponde a la categoría “Me gusta mucho”.
El patrón resultó aceptable, ya que gustó al 90% de los evaluadores y fue indiferente al 10%. Del total de panelistas que aceptaron el producto 46% fueron niños (12-14 años) y 54% adultos (19-57 años).
El mayor porcentaje de respuestas (30%), para hojuelas de kiwicha, se registró en el punto 7 de la escala hedónica, que corresponde a la categoría “Me gusta moderadamente”.
Las hojuelas de kiwicha gustaron a un 82% de los panelistas, resultaron indiferentes a un 15% y disgustaron a un 3% de los participantes del panel, por lo cual se puede decir que fueron aceptables. De las personas que aceptaron el producto un 51% fueron niños (12-14 años) y un 49% adultos (19-57 años).
Según la prueba de aceptabilidad para copos de maíz y hojuelas de kiwicha se observó que el mayor porcentaje de aceptabilidad lo presentaron los copos. Los valores se presentan en la **Figura 4**.

CONCLUSIONES

La variedad de kiwicha estudiada presentó un buen valor nutritivo, el cual estaría dado por su contenido de proteínas, grasas, hidratos de carbono y minerales presentes, y una alta proporción de Calcio y de Hierro, en relación a otras harinas de cereales.
La harina de kiwicha (60 mesh) presentó mejor composición química que la de los cereales de consumo habitual, particularmente en el contenido de proteínas y grasas, lo que le otorga una mayor densidad calórica similar a la que presentan las leguminosas lo que permitiría incluirla en dietas de características especiales.
Los resultados de este estudio, predicen que es factible la elaboración de alimentos precocidos de kiwicha, aplicando tratamientos térmicos que no afectan su composición y que amplían la posibilidad de incluirlos en distintas preparaciones, solos o complementando distintas mezclas: las hojuelas de kiwicha presentaron mayor rigidez, respecto a copos de maíz, lo que ocasionaría un mayor trabajo masticatorio y el extrudido de kiwicha presentó mayor masticabilidad y necesitó menos fuerza para fracturarse.
Según su actividad de agua, los productos elaborados presentarían buena estabilidad al almacenamiento a temperatura ambiente. Los distintos productos de kiwicha tuvieron buena aceptabilidad, la que aumentaría si se saborizaran los mismos en otras instancias tecnológicas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Association of Oficial Agricultural Chemists (AOAC). Oficial Methods of Análisis of AOAC Internacional Washington. 1996.

Cardozo, G. J. L. y Coro, C. E. Elaboración y Evaluación de la Aceptabilidad de preparaciones con Amaranto. Tesis para obtener el título de Licenciada en Nutrición. Pág. 23 y 24

Código Alimentario Argentino. Buenos Aires. 2000. Art. 1409. Pág.445

Duncan D B. Multliple Range And Multiple F. Test. Biometrics 11. 1955. Pag. 1-42.

Estévez, A.; Escobar, A. B. Y Castillo V. E. Desarrollo de Productos Extrudidos de fácil consumo. Departamento de Agroindustria. Universidad de Chile. 1998

González Castañeda; J, Arroyo Torres, I, Borodanenko, A. y C.A.Carballo Monsivais. Efecto de la Época de Cosecha en las Características Físicas, Químicas y Funcionales del Amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*)**.** Instituto de Ciencias Agrícolas, Universidad de Guanajuato. Actas del VII Congreso Nacional de Ciencias de los Alimentos. III Foro de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. pp 95-102, 2005.

Hough G, Fiszman S. Estimación De La Vida Útil Sensorial De Los Alimentos. Valencia, España.

Programa CYTED. 2005. Pág. 24-41.

Informe De Economía Y Producción. Una completa visión de lo que ofrece la provincia de Salta en materia de economía. El Amaranto o Kiwicha. 2007

Manrique de Lara, Benito. Explotación estratégica del Recurso Amaranto en México. Una propuesta de combate a la desnutrición y a la pobreza. San Miguel de Proyectos Agropecuarios S.P.R. de R.S.

Grupo Nutrisol S.A. de C. V.Col. Cuauhtémoc,México, D.F.

Murray R. Estadistica. 2° ed. Chile: Industrias Gráficas S.A. 1991. Pag. 60-66, 375-387.

Robutti J L; Maize Kernel Hardness Estimation In Breeding By Near-Infrared Transmission Analysis. Cereal Chemistry. 1995. Pag. 632-636.

Rodríguez Sandoval, E. et al. Reología de Suspensiones Preparadas con Harina Precocida de Yuca. Ingeniería y Desarrollo. Universidad del Norte., 19:17-30, 2006.

Sánchez, S. A. Composición Química y Valor Nutritivo de la harina de Amaranto. Tesis para obtener el título de Licenciada en Nutrición. Universidad Nacional de Salta, 1991. Pág. 12

Whatts, B M. Metodos Sensoriales Basicos Para La Evaluacion De Alimentos (Traducción: Oficina de traducciones, Secretaria de Estado, Canadá). Ottawa, Canadá. 1992. Pág. 66-69, 73-77.

Estudio del efecto del proceso de secado sobre el contenido de tocoferoles en el aceite de soja

Effect of drying process on tocopherol content in soy oil

Laoretani D, Nolasco S M, Gely M C

UNCPBA, Facultad de Ingeniería. Avenida del Valle 5737, B7400JWI. Olavarría, Provincia de Buenos Aires, Argentina.
mail: cgely@fio.unicen.edu.ar

RESUMEN

Como consecuencia de la gran difusión del cultivo de soja y la importancia de mantener la calidad durante el almacenamiento es fundamental buscar una técnica de secado que asegure la calidad del producto. Los procesos convencionales utilizan temperatura elevada y enfriamiento inmediato deteriorando la calidad del producto. Un sistema alternativo es la seca-aireación que involucra una homogeneización intermedia entre un secado con aire caliente y una aireación lenta final. Estudios previos realizados para analizar el efecto del secado en lecho fluidizado de granos de soja sobre el contenido de tocoferoles en el aceite encontraron que la temperatura de secado y la humedad inicial del grano afectan el contenido de tocoferoles. En este trabajo se estudia el efecto de diferentes temperaturas de secado todo calor y tiempos de homogeneización de la humedad sobre la concentración de tocoferoles en el aceite, comparando simultáneamente los efectos del sistema de secado convencional frente al de seca-aireación. Se utilizó un equipo de secado que permite secar un lecho de granos monitoreando la temperatura del aire en su paso a través del mismo realizándose los procesos combinando dos temperaturas de secado (60 y 80°C) y dos tiempos de homogeneización de la humedad (30 y 120 min). Las mayores concentraciones de tocoferoles totales se observaron en la soja secada en forma convencional a 60°C, mientras que el secado convencional a mayor temperatura (80°C) fue el que afectó en mayor medida esta variable, observándose un comportamiento no regular en los sistemas de seca-aireación. El análisis de varianza permitió detectar diferencias significativas entre la muestra inicial y los procesos de secado ($P< 0,0001$) para el contenido de tocoferoles totales. El análisis de diferencias de medias (Tuckey, α =0,05) permite inferir que todos los tratamientos de secado disminuyeron significativamente el contenido de tocoferoles totales. A través del análisis de varianza se detectó una significativa interacción entre las variables temperatura de secado y tiempo de homogeneización de la humedad ($P=0,008$) en el proceso de seca-aireación. El α-tocoferol fue afectado por los procesos aplicados, solamente detectándose presencia del mismo en los granos procesados por seca-aireación a la menor temperatura. El γ-tocoferol mostró un comportamiento similar a los tocoferoles totales, en cambio el δ-tocoferol presentó un comportamiento diferente, no detectándose diferencias significativas entre la muestra inicial y el secado convencional a la menor temperatura ensayada. El γ-tocoferol fue afectado por los procesos aplicados en mayor medida (reducción promedio del 79,2%) que el δ-tocoferol (reducción promedio del 52,7%), siendo ambos los de mayor poder antioxidante in vitro. En función de los resultados obtenidos y fundamentalmente debido a una elevada interacción entre las variables temperatura de secado y tiempo de homogeneización de la humedad, se concluye que procesos de secado convencional a baja temperatura ó seca-aireación a elevada temperatura y corto tiempo de homogeneización de la humedad podrían conservar adecuadamente el contenido de tocoferoles.

ABSTRACT

As a consequence of both the great diffusion of soybean cultivation and the importance of keeping the quality during its storage, it is essential to search for a drying technique that ensures the product quality. The conventional processes employ high temperature and immediate cooling thus deteriorating the product quality. An alternative system is the dry-aeration that involves an intermediate homogenization between hot air drying and a final slow aeration. Previous research done in order to analyze the effect of drying on fluidized bedding of soybeans on the tocopherols level in

oils have found that both the drying temperature and the initial humidity of grains affect the content of tocopherols. This work studies the effect of different drying temperatures and tempering times on the concentration of tocopherols in oil, comparing simultaneously the effects of the conventional drying system facing dry-aeration. A drying equipment that allows monitoring the air temperature while drying through a grain bed combining two drying temperatures (60 and 80°C) and two tempering times (30 and 120 min) was employed. The highest total tocopherol concentrations were seen on soybeans dried under a conventional technique at 60°C, while conventional drying at a higher temperature (80°C) affected this variable more, showing a non-regular behavior on dry-aeration systems. The variance analysis allowed the detection of significant differences between the initial sample and the drying processes ($P<0.0001$) for the total content of tocopherols. The analysis of medium differences (Tuckey, $\alpha=0.05$) allows to infer that all the drying treatments decreased the total content of tocopherols significantly. It was detected a significant interaction between the variables drying temperatures and tempering time ($P=0.008$) in the dry-aeration process through the variance analysis. The α-tocopherol was affected by the employed processes, having only detected its presence in the grains processed by dry-aeration at the lowest temperature. The γ-tocopherol showed a behavior similar to those of total tocopherols, however, the δ-tocopherol showed a different behavior, not having been detected significant differences between the initial sample and conventional drying at the lowest tested temperature. The γ-tocopherol was more highly affected by the processes employed (79.2% average decrease) than the δ-tocopherol (52.7% average decrease), both being of a highest antioxidant power in vitro. According to the results obtained, and mainly, due to a high interaction between the variables of drying temperature and tempering time, it is concluded that low temperature conventional drying processes or high temperature and short - term dry-aeration processes could preserve the content of tocopherols properly.

PALABRAS CLAVE: *secado, soja, tocoferoles.*

KEYWORDS: *drying, soybean, tocopherols.*

INTRODUCCIÓN

La soja (*Glycine Max*) es actualmente el grano oleaginoso de mayor importancia en el mundo y su cultivo es la actividad más relevante del sector agropecuario argentino. Estados Unidos, Brasil y Argentina son los principales productores (Franco 2008), siendo Argentina el tercer productor y exportador mundial de la oleaginosa, además del principal productor y exportador de aceite de soja a nivel global.

Su aceite tiene muy buena calidad y bajo costo y es el más importante de los aceites vegetales del mundo contemporáneo (SAGPyA 2008). Contiene tocoferoles; antioxidantes naturales que disminuyen la formación de radicales libres producto de la autooxidación del aceite; retardando así el deterioro de su calidad. Estos compuestos también cumplen una importante actividad biológica como vitamina E, la cual debe ser incorporada al organismo mediante el alimento ya que, a diferencia de los microorganismos y vegetales, los animales superiores no la puedan producir (Bramley *et al.* 2000). El aceite de soja contiene en mayor proporción el γ-tocoferol (737 μg/g de aceite) y en menor cantidad el β-tocoferol (34 μg/g de aceite) (Gunstone *et al*. 1994).

Es habitual realizar una recolección temprana de los granos de soja cosechando el grano con un contenido de humedad superior al necesario para un almacenamiento seguro, siendo una de las causas que han impulsado la utilización del secado artificial del grano. La implementación de esta técnica posibilita la separación del grano de la planta madre en estado de madurez fisiológica, donde ya se ha desarrollado con todos sus elementos, pero con un alto contenido de humedad, lo que no permite una buena conservación por largo tiempo. Año tras año aumenta el volumen de grano secado artificialmente, apreciándose también un incremento en la pérdida de calidad del mismo (Tosi *et al.*1989). En la Argentina el 80% de la soja cosechada pasa por la secadora, donde se le extraen en promedio tres puntos de humedad, demostrando la importancia de este proceso (Yanucci 2001).

El sistema de secado de granos utilizado mayormente en Argentina es el secado convencional, el cual consiste en someter al grano a altas temperaturas y luego enfriarlo en forma continua. Este cambio brusco de temperatura sufrido por los granos hace que se afecte la calidad del mismo en forma

irreversible. Como el tiempo de ingreso de los granos a las plantas de acopio es acotado y la cantidad de los mismos es elevada, se genera un cuello de botella en la operación de secado ocasionando un conflicto entre la calidad del grano y la cantidad de granos procesados por unidad de tiempo, siendo un factor determinante la temperatura a utilizar. En muchas ocasiones se eleva la temperatura de secado posibilitando procesar mayor cantidad de granos sin considerar la calidad de los mismos.

Almacenar un grano dañado ofrece condiciones para acelerar el calentamiento de la masa de grano a causa de un aumento en los procesos respiratorios del mismo. También se aumenta la superficie expuesta al oxigeno provocando la oxidación de los lípidos contenidos en él. Un grano dañado brinda condiciones favorables para el ataque y desarrollo de hongos, ácaros e insectos con sus posteriores consecuencias, entre las que podemos citar el consumo por insectos, contaminación con micotoxinas, aumento de los procesos respiratorios del grano, etc (F.A.O. 2008).

Un proceso alternativo al secado convencional es la seca-aireación, que consiste en realizar un secado parcial con aire caliente, deteniéndolo cuando el grano esté con 2-4% de humedad por encima del valor de seguridad (0,135 decimal base húmeda, b.h.) para posteriormente dejarlo reposar un tiempo suficiente en silos especiales hasta lograr la homogenización de los perfiles de humedad y temperatura (thom), y finalmente pasar aire a temperatura ambiente para lograr el enfriamiento final y simultáneamente reducir la humedad al valor de seguridad. De esta manera se consigue una mayor calidad del producto final (Gely 2002).

Como consecuencia de la gran difusión del cultivo de soja en el territorio argentino y de la importancia que involucra mantener la calidad del grano durante el almacenamiento es fundamental buscar una técnica de secado que permita asegurar el mantenimiento de la calidad del producto. En un estudio realizado por Colombo *et al*. (2006) sobre el efecto del secado de granos de soja sobre la concentración de tocoferoles en el aceite, donde se analizaron tres humedades iniciales diferentes y cuatro temperaturas de secado en lecho fluidizado, se observó que, para cada temperatura de secado, a mayor humedad inicial del grano la concentración de tocoferoles totales fue menor al alcanzar la humedad de almacenamiento seguro (15,6% base seca, b.s.), coincidente con mayores tiempos de procesos. Nolasco *et al*. (2007) también estudiando el efecto del secado en lecho fluidizado de granos de soja sobre el contenido de tocoferoles en el aceite, encontraron que tanto la temperatura del proceso de secado como la humedad inicial del grano afectan el contenido de tocoferoles. Otro estudio muestra el efecto del tostado a altas temperaturas sobre la vitamina E en semillas de calabaza *Cucurbita pepo* con un contenido inicial de tocoferoles de 1070 μg/g de aceite (Gemrot *et al*. 2006). El tostado de las mismas a 140ºC durante 5 minutos produjo una pérdida de tocoferoles totales del 36%, siendo la pérdida más alta la del β-tocoferol, con un 50%, la del α-tocoferol de un 41% y la del γ-tocoferol del 36%. Teniendo en cuenta estos resultados previos, en este trabajo se plantea estudiar el efecto de diferentes temperaturas de secado todo calor y tiempos de homogeneización de la humedad sobre la concentración de tocoferoles en el aceite de los granos de soja, comparando simultáneamente los efectos del sistema de secado convencional frente al de seca-aireación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia Prima

Para el desarrollo de este trabajo se utilizó una muestra de soja A.C.A. 360 GR (Asociación de Cooperativas Argentinas C.L.), cosechada en la zona de Olavarría (provincia de Buenos Aires, Argentina), durante la campaña 06/07. Los granos de soja no recibieron ningún tratamiento previo de secado, siendo el contenido de humedad en base seca (b.s.) en el momento de recibo de 12,3 ± 0,36 % (AOAC 1980).

Para la realización de los ensayos de secado se humectó la muestra original hasta una humedad promedio de 27,24% b.s. (21,43% b.h.). La humedad final se determinó por duplicado con la misma técnica (AOAC 1980), luego de transcurridas 48 horas durante las que se permite la homogeneización del agua en el interior del grano.

Rendimiento de Aceite

La extracción del aceite para cuantificar el contenido del mismo en el grano de soja se realizó mediante la técnica de Butt por triplicado, sobre 10 g de muestra previamente molida, utilizando como solvente de extracción n-hexano. El solvente se eliminó por evaporación (rotavapor) y posterior arrastre de las trazas con burbujeo de nitrógeno (AOCS 1998).

Determinación de Tocoferoles

La extracción de aceite para la determinación de tocoferoles se realizó sobre 30 g de muestra previamente molida en un equipo Soxhlet (2 horas a temperatura ambiente y 4 horas a una temperatura máxima de 90ºC, a presión atmosférica) utilizando como solvente n-hexano. El disolvente se eliminó por evaporación (rotavapor, 50ºC, vacío parcial) y posterior arrastre de las trazas con burbujeo de nitrógeno.
El contenido de tocoferoles en el aceite de soja se determinó mediante una técnica cromatográfica basada en el Método oficial AOCS Ce8-89 (AOCS 1998). La muestra de aceite se disolvió en hexano grado HPLC para su posterior separación mediante Cromatografía Liquida de Alta Resolución (HPLC). Se utilizó un equipo Hewlett Packard Series 1050 equipado con detector de fluorescencia (longitud de onda de excitación: 292 nm y longitud de onda de emisión: 330 nm) y provisto de una columna Lichrosorb Si 60, 25 x 0,4 cm, 5 µm de tamaño de partícula. Se empleó una fase móvil de isopropano: hexano, 0,5:99,5 (v/v), filtrado y desgasificado, con una velocidad de flujo de 1,5 ml/min. La concentración de tocoferoles se determinó por el método de estándar externo, utilizando α-tocoferol (Sigma T#3251, 95% de pureza) como referencia y se expresaron los resultados en µg de tocoferol/ g de aceite.

Ensayos de Secado

Los ensayos de secado se realizaron utilizando un equipo de secado existente en la Facultad de Ingeniería de la ciudad de Olavarría, (Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires), el cual cuenta con un sistema de adquisición de datos para la variable temperatura que permite realizar un seguimiento de la temperatura del aire en su paso a través del lecho de granos. En el equipo se puede secar un lecho de granos modificando la temperatura y el caudal de aire de secado.
El equipo contiene cuatro bandejas, de 16 cm de ancho por 16 cm de largo y 0,5 cm de alto, mediante las cuales se pudo hacer un seguimiento del contenido de humedad de los granos en una capa delgada (secado de granos individuales), y cuatro cajones correspondientes a cada una de las bandejas, de 16 cm de ancho por 16 cm de largo y 5 cm de alto. En cada una de las bandejas se localiza un sensor tipo termorresistencia PT100 standard con un transductor incorporado para la conversión de la señal de la termorresistencia en una señal standard de 420 mA. Fueron calibrados por el fabricante para un rango de T de 0 a 200°C.
Se analizaron 4 procesos de seca-aireación, cada uno por duplicado, los cuales corresponden a la combinación de dos temperaturas de secado, comprendidas entre los valores utilizados normalmente en las plantas de acopio, y dos tiempos de homogeneización de la humedad (ttemp.). Se realizaron dos procesos de secado convencional por duplicado, uno para cada nivel de temperatura considerado.
La **Tabla 1** expone los procesos experimentales desarrollados, los cuales, de P1 a P4 corresponden a los procesos de seca-aireación y P5 y P6 son los procesos de secado convencional ensayados.
En el desarrollo de los ensayos se colocaron aproximadamente 100 g de muestra en cada bandeja del equipo de secado y 1300 g de muestra en cada uno de los cajones utilizados. Se utilizaron las cuatro bandejas y tres de los cajones contenidos en el mismo.

Tabla 1: Descripción de los procesos de secado analizados.

Proceso (P)	Temperatura (ºC)	Tiempo de homogeneización de la humedad (min.)
P 1	60	120
P 2	60	30
P 3	80	120
P 4	80	30
P 5	80	Secado Conv.
P 6	60	Secado Conv.

El flujo de aire ingresó a la masa de grano en forma perpendicular, desde la primera bandeja hacia la última. Durante todos los procesos de secados ensayados se trabajó con una velocidad promedio del aire de 0,088 ± 0,016 m/s.
En los ensayos de seca-aireación, se realizó un seguimiento en el contenido de humedad de las muestras (por diferencia de pesos) dando por finalizado el proceso de secado todo calor cuando el promedio de humedades alcanzaba la humedad de 19% bs realizando el proceso de homogeneización

de la humedad en el mismo equipo de secado. La aireación, con un caudal de aire similar al empleado durante la etapa de secado todo calor (0,088 m/s) se realizó hasta llegar a la humedad de comercialización exigida para soja (15,6% bs). En los duplicados se respetaron los tiempos de proceso. Los ensayos de secado convencional, a cada una de las temperaturas analizadas (60 y 80ºC), se realizaron en el mismo equipo mediante un seguimiento en el contenido de humedad de las bandejas, hasta un valor final coincidente con el de comercialización procediendo a enfriar la masa de granos inmediatamente con aire a temperatura ambiente.
Finalizado cada ensayo se realizó la mezcla de la muestra contenida en cada una de las bandejas y en cada uno de los cajones utilizados del equipo, formando de esta manera una muestra conjunta a partir de la cual se realizó cada uno de los análisis de calidad y se confirmó la humedad final (AOCS 1980).

Análisis de Datos

El análisis de los datos obtenidos se realizó mediante ANOVA (análisis de la varianza) utilizando para ello el programa SYSTATWS (1990), también se implemento la prueba de Tukey (α= 0,05) para verificar la diferencia de medias entre la muestra sin recibir ningún tratamiento de secado y las muestras secadas mediante cada uno de los sistemas de secado propuestos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de la muestra

La muestra de soja en estudio presentó un rendimiento de aceite de 23,5 ± 0,31% valores comprendidos dentro del rango obtenido entre las campañas 97/98 a 03/04 (Cuniberti *et al*. 2004) en la zona núcleo-sojera argentina.
La muestra de soja original, con un contenido de humedad de 12,3%, presentó una concentración de tocoferoles totales (**Tabla 2**) inferior a la informada por Gunstone *et al*. (1994) como típica para aceite de soja. Concordante a lo informado por el mismo autor, el γ-tocoferol presentó la mayor proporción de los tocoferoles totales (66,1%), seguido por el δ-tocoferol (32,7%), siendo muy baja la concentración de α-tocoferol. Sin embargo, a diferencia de lo informado por Gunstone *et al.* (1994) e Izquierdo (2007), no se detectó presencia de β-tocoferol, forma homóloga generalmente presente en menor proporción.

Tabla 2: Contenido de tocoferoles en el aceite de soja.

	Tocoferoles µg/g				
	α	β	Γ	δ	Total
ACA 360 G.R. (12.3% b.s.)	11,3	ND	588,8	291,3	891,4
ACA 360 G.R. (27.2% b.s.)	6,2	ND	369,8	305,4	681,3
Valores de Bibliografía (Gunstone *et al.* 1994)	116	34	737	275	1162

ND: no detectado

El contenido de tocoferoles totales en el aceite obtenido de los granos de soja humectados a un valor de 27,2% b.s., mostró un valor del orden del 23,6% menor comparado con los valores observados en la muestra original, de los cuales el α-tocoferol y el γ-tocoferol registraron valores menores del orden de un 45,7% y 37,3% respectivamente y el δ-tocoferol se mantuvo constante. Los resultados observados en el presente estudio respecto a la concentración de tocoferoles sugieren que la humedad del grano también podría afectar la extracción de tocoferoles, considerando necesarios mayores estudios al respecto.

Análisis del efecto del proceso de secado sobre el contenido de tocoferoles

En la **Tabla 3** se expone el contenido de tocoferoles totales obtenido a partir de las muestras finales tratadas (seca-aireación y secado convencional). Las mayores concentraciones de tocoferoles totales se observaron en la soja secada en forma convencional a menor temperatura (P6), mientras que el secado convencional a mayor temperatura (P5) fue el que afectó en mayor medida a esta variable. En los sistemas de seca-aireación se observó un comportamiento no regular.

Tabla 3: Contenido promedio de tocoferoles totales (µg/g) para cada uno de los sistemas de secado.

Proceso	tocoferoles totales (µg/g)
Muestra húmeda sin tratar	681,3 a
P1 Seca-aireación (60°C, 120 minutos de homogeneización de la humedad)	234,8 b
P2 Seca-aireación (60°C, 30 minutos de homogeneización de la humedad)	130,2 b
P3 Seca-aireación (80°C, 120 minutos de homogeneización de la humedad)	151,1 b
P4 Seca-aireación (80°C, 30 minutos de homogeneización de la humedad)	273,3 bc
P5 secado convencional (80°C)	112,6 b
P6 secado convencional (60°C)	432,8 c

Medias seguidas de letras iguales indican no diferencia significativa (Tukey, $p \leq 0,05$)

El análisis estadístico de la varianza (ANOVA) permitió detectar diferencias significativas entre la muestra inicial y los procesos de secado estudiados ($P<0,0001$) para el contenido de tocoferoles totales en el aceite de soja. El análisis de diferencias de medias permitió inferir que todos los tratamientos de secado aplicados disminuyeron significativamente el contenido de tocoferoles totales en el aceite de soja (**Tabla 3**). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos de secado bajo el sistema de seca-aireación.

En el sistema de secado convencional, el aumento de la temperatura del aire (de 60°C a 80ºC) produjo una reducción significativa en el contenido de tocoferoles en el aceite de los granos de soja. Por otra parte, no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos de seca-aireación y el secado convencional a 80°C, para la variable analizada. Mientras que el sistema de secado convencional a 60°C presentó un similar comportamiento que el sistema de seca-aireación a 80°C y 30 minutos de homogeneización de la humedad (**Tabla 3**).

En la **Figura 1** se observa que, para un tiempo de homogeneización de la humedad de 30 minutos, a mayor temperatura de tratamiento se conserva un mayor contenido de tocoferoles en el aceite, mientras que para un tiempo de homogeneización de la humedad mayor (120 minutos) el efecto es inverso. Analizando el efecto del tiempo de homogeneización de la humedad (**Figura 2**), podemos observar que para una temperatura de secado de 80ºC, un mayor tiempo de homogeneización de la humedad disminuye en mayor medida el contenido de tocoferoles, mientras que a más baja temperatura de secado (60ºC) el efecto es inverso.

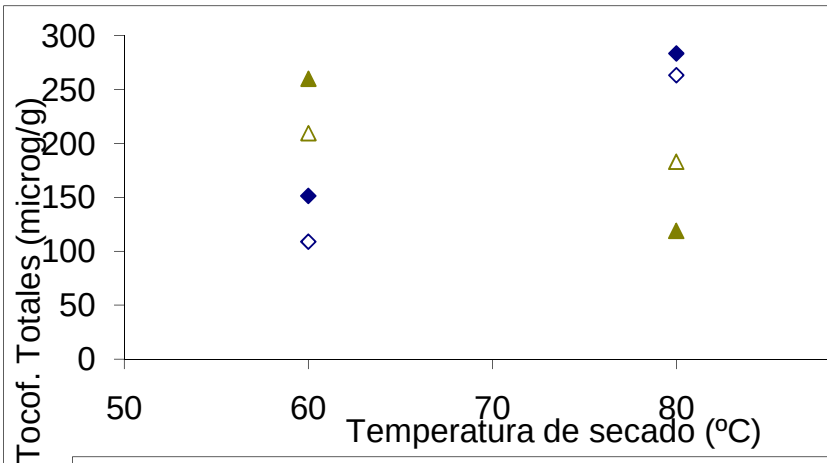


Figura 1. Efecto de la temperatura de secado sobre el contenido de tocoferoles totales en el aceite de soja para los sistemas de seca-aireación.

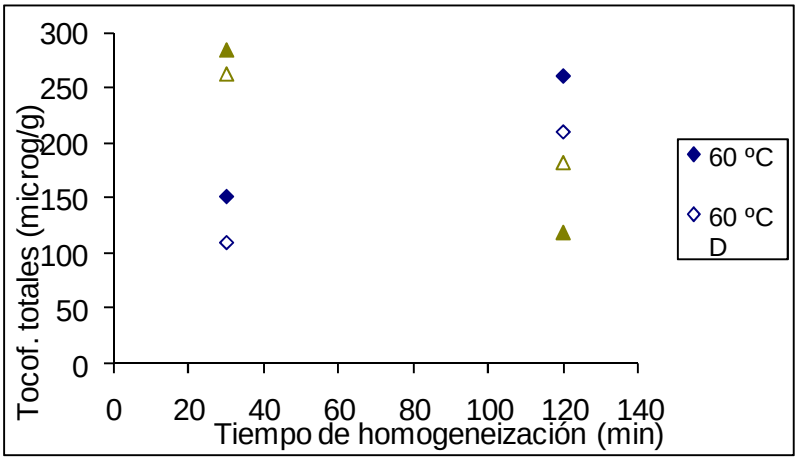


Figura 2. Efecto del tiempo de homogeneización de la humedad sobre el contenido de tocoferoles totales en el aceite de soja para los sistemas de seca-aireación.

Estos resultados corroboran lo detectado a través del análisis de la varianza de una elevada y significativa interacción entre las variables temperatura de secado y tiempo de homogeneización de la humedad (P=0,008) en el proceso de seca- aireación. Al mismo tiempo, no se verificó efecto significativo de la temperatura de secado en estos procesos (P>0,275), ni de los tiempos de homogeneización de la humedad (P>0,726), para el contenido de tocoferoles totales.

En la **Tabla 4** se muestra el contenido promedio de los diferentes tocoferoles en las muestras procesadas bajo las diferentes condiciones de secado. El α-tocoferol fue fuertemente afectado por los procesos aplicados, detectándoselo solamente en los granos procesados por seca-aireación a la menor temperatura de ensayo (P 1 y P 2). El γ-tocoferol, uno de los componentes mayoritarios de los tocoferoles totales en el aceite de soja, muestra en general un comportamiento similar a los tocoferoles totales. En cambio, el δ-tocoferol muestra un comportamiento diferente, no detectándose diferencias significativas entre la muestra inicial y el secado convencional a la menor temperatura ensayada. El γ-tocoferol fue afectado por los procesos aplicados en mayor medida (reducción promedio del 79,2%) que el δ-tocoferol (reducción promedio del 52,7%), siendo ambos tocoferoles los de mayor poder antioxidante in vitro (Izquierdo 2007).

Tabla 4. Contenido de cada uno de los tocoferoles (μg/g) en el aceite de soja para cada uno de los sistemas de secado.

Proceso	α-toc (μg/g)	β-toc (μg/g)	γ-toc (μg/g)	δ-toc (μg/g)
P 0	6,14 ± 1,7	ND	369,8 ± 91,8 a	305,4 ± 6,8 a
P 1	5,3 ± 0,3	ND	79,7 ± 14,4 b	149,9 ± 20,9 b
P 2	1,5 ± 2,1	ND	35,8 ± 20,0 b	93,0 ± 8,0 c
P 3	ND	ND	56,8 ± 29,6 b	94,3 ± 15,6 c
P 4	ND	ND	88,8 ± 4,0 b	184,5 ± 10,3 b
P 5	ND	ND	30,8 ± 12,7 b	81,9 ± 11,7 c
P 6	ND	ND	169,7 ± 5,2 c	263,2 ± 8,7 a

ND: no detectado. Medias seguidas de letras iguales indican no diferencia significativa (Tukey, $p \leq 0,05$).

CONCLUSIONES

Todos los tratamientos de secado aplicados disminuyeron significativamente el contenido de tocoferoles totales en el aceite de soja. El secado convencional a la menor temperatura de secado (60ºC) y el proceso de seca-aireación a la mayor temperatura (80ºC) y menor tiempo de homogeneización de la humedad (30 minutos) fueron los que conservaron el mayor contenido de tocoferoles, mientras que los restantes procesos de secado analizado no se diferenciaron

significativamente en sus efectos. Por otro lado, en el secado convencional se observó un efecto de la temperatura de secado sobre la reducción de tocoferoles totales, mientras que entre los distintos tratamientos de secado bajo el sistema de seca-aireación no se observaron diferencias significativas pero si una elevada interacción entre temperatura y tiempo de témpering. Los diferentes tipos de tocoferoles detectados fueron afectados por los tratamientos aplicados. El γ-tocoferol, homólogo mayoritario, presentó un comportamiento similar a los tocoferoles totales. Sería de interés complementar el presente trabajo con el estudio del efecto que los sistemas de secado ensayados podrían tener sobre los ácidos grasos de los granos de soja y ahondar sobre posibles causas de las diferencias detectadas en la disminución de los tocoferoles mayoritarios.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo con el apoyo económico de la Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires y desarrollado con equipamiento de secado aportado por PICT 09-12196, (Investigador responsable. Dr. S. Giner)- Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica. Los autores agradecen a la Prof. Carmen Mateo por la colaboración en los análisis de tocoferoles.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC Methods. 1980. Official methods of analysis, 15 th end. Association of Official Analytical.

AOCS. 1998. Official and Recommended Practices of the Americam Oil Chemists´ Society, 5th edn., edited by D. Firestone, AOCS Press, Champaign Illinos.

Bramley PM, Elmadfa I, Kafatos A, Nelly FJ, Manios Y, Roxborough HE, Schuch W, Sheehy PJA, Wagner KH. 2000. Review Vitamin E. Journal of the Science of Food and Sgriculture, 80:913-938.

Colombo D, Gely MC, Cocconi M, Cravioto R, Nolasco MS, Giner SA. 2006. Efecto del secado sobre los parámetros de calidad del grano de soja. En: Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos: 135 – 136.

Colombo D, Gely MC, Cocconi M, Cravioto R, Nolasco MS, Giner SA. 2006. Efecto del secado sobre los parámetros de calidad del grano de soja. En: Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos: 135 – 136.

Cuniberti M, Rossi R, Herrero R, Ferrari B. 2004. Calidad industrial de la soja argentina.

F.A.O. 2008. Los granos y su calidad. www.fao.org/docrep/x5027S/x5027S00.htm, (10/06/08)

Franco D. 2008. Aceite de soja. Análisis de cadena alimentaría. www.alimentosargentinos.gov.ar/0-3/olea/Aceite_Soja-r19/A_soja.htm, (27/03/ 2008).

Gely MC. 2002. Factibilidad técnico – económica de la seca – aireación de soja en plantas de acopio. Tesis de Magíster en Gestión Empresaria, UNCPBA, Olavarría.

Gemrot F, Barouh N, Vieu Jean-Pierre, Pioch D, Montet D. 2006. Effect of roasting on tocopherols of gourd seeds (Cucúrbita pepo). Grasas y Aceites, 57: 409 – 414.

Gunstone FD, Harwood JL, Padley FB. 1994. The Lipid Handbook. Second Edition, Chapman & Hall. London:130.

Izquierdo NG. 2007. Factores determinantes de la calidad de aceites en diversas especies. Tesis doctoral en Ciencias Agrarias. Universidad Integral Balcarce, Argentina.

Nolasco SM, Gely MC, Colombo D, Giner SA. 2007. Efecto del secado de soja sobre la concentración de tocoferoles en el aceite. Acta del congreso: XI Congreso de Ciencia y Tecnología de Alimentos-CYTAL 2007. Argentina. CD-Rom: 8pp.

SAGPyA (Secretaria de Ganadería Pesca y Agricultura). 2008. www.sagpya.gov.ar, (14/05/2008).

Tosi E, Tamburelli M, Prado R. 1989. Cinética del secado de soja (glicine max). Ecuación empírica para el secado en lecho fluidizado. Agroquim tecnol. Aliment, 30(1): 130-137.

Yanucci D. 2001. Conservación de granos y semillas en postcosecha. www.sagpya.mecon.gov.ar (08/04/2008).

Efecto de estreses ácidos sobre *Listeria innocua* en suero de queso tratado con antimicrobianos naturales

Response to acid stress of Listeria innocua after exposure to natural antimicrobials in cheese whey

Lehrke G, Hernaez L, Mugliaroli S, Jagus R J

Laboratorio de Microbiología Industrial: Tecnología de Alimentos, Dpto. de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, Universidad de Buenos Aires.
Pabellón de Industrias, Ciudad Universitaria, (1428) Buenos Aires, Argentina.
E-mail rjagus@di.fcen.uba.ar

RESUMEN

El suero de queso presenta propiedades nutricionales y funcionales de interés para la industria alimentaria. Asimismo, debido a su alta demanda biológica de oxígeno, no puede ser eliminado sin tratar. Su procesamiento para la obtención de productos en polvo como concentrados y aislados proteicos, tiene asociado un alto costo y sólo resulta rentable para plantas de gran envergadura.

Es importante, entonces, buscar opciones para conservarlo y utilizarlo como base de alimentos con el fin adicional de no contaminar el medio ambiente. Se ha comprobado que el suero de queso procedente del proceso de membrana (producto intermedio), puede ser estabilizado microbiológicamente utilizando los antimicrobianos naturales nisina, Microgard^{TM} y extracto de té verde. Considerando que este producto será utilizado como ingrediente en la formulación de alimentos, es importante conocer como afectará su incorporación en relación a la efectividad de los estreses que posteriormente serán utilizados en la elaboración y preservación de los mismos. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de diferentes estreses ácidos sobre *Listeria innocua* en suero de queso tratado con nisina (300UI/ml), Microgard^{TM}300 (5%) y extracto de té verde (3%).

Para llevar a cabo el estudio se inocularon dos cepas de *L.innocua* (cepa 1: CIP 8011, CCMA29 y cepa 2: ATCC33090) en muestras de suero de queso (8% sólidos, pH 5,5) estabilizadas con los antimicrobianos naturales. Posteriormente las muestras tratadas fueron expuestas a estreses ácidos (pH 4,0) producidos por la aplicación de ácido clorhídrico, láctico y cítrico.

Los tratamientos previos con nisina y té verde favorecieron la acción de los ácidos láctico y cítrico. Al utilizar nisina, los posteriores ensayos de estrés con estos ácidos mostraron una reducción de 4,2 y 3,8 ciclos log con respecto al suero sin tratar en el caso de la cepa 1. De la misma forma, para la cepa 2, los valores fueron de 2,0 y 3,2 ciclos log.

En presencia de té, las reducciones fueron de 5,3 y 4,2 ciclos log (cepa 1) y de 4,7 y 1,8 ciclos log (cepa 2) para los estreses con ácido láctico y ácido cítrico, respectivamente. A su vez, cuando las cepas se estudian como cocultivo, también mejoran las respuestas de los estreses ácidos en presencia de nisina o extracto de té verde.

Por el contrario, la aplicación previa de Microgard^{TM} 300 no afectó el comportamiento de los microorganismos frente a los ácidos.

Estos resultados indican que la respuesta de *L.innocua* frente a los estreses ácidos aplicados en suero estabilizado, dependen de la cepa ensayada, el antimicrobiano aplicado y el ácido empleado.

El conocimiento de las interacciones entre antimicrobianos y estreses tiene importantes implicancias en la industria al momento de considerar el tratamiento que asegure la inocuidad y, a la vez, minimizar las concentraciones requeridas para alcanzar los objetivos sin alterar la calidad del alimento.

ABSTRACT

Cheese whey is a by-product from the cheese manufacture, with interesting nutritional and functional properties for the application in the food industry. On the other hand, because of its high biological demand, cheese whey cannot be directly discharged into sewage as wastewater.

The process to obtain dry products is economically attractive only for a large scale plant. As a consequence, it is important to find alternative processes in order to preservate cheese whey as an ingredient and to avoid environmental pollution.

The liquid cheese whey from the membrane process (intermediate product) could be stabilized by the addition of natural antimicrobials like nisin, Microgard™ and green tea extract.
Considering that this product will be used as an ingredient in food formulation, is important to know whether pretreatments with natural antimicrobials would enhance sensitivity or resistance of food borne bacteria to different stress conditions commonly applied in food-processing.
The objective of this study was to evaluate the effect of acid stresses on *Listeria innocua* in cheese whey treated with nisina (300UI/ml), Microgard™300 (5%) and green tea extract (3%).
The stabilized cheese whey (8%, pH 5,5) was inoculated with two strains of *L.innocua* (strain 1: CIP 8011, CCMA29 y strain 2: ATCC33090). Then, acid stresses were performed (pH=4) with clorhidric, lactic and citric acid.
Previous treatments with nisin or green tea extract improved the performance of lactic and citric acids, showing an increase of the reduction of the strain 1, of 4.2 and 3.8 log cycle respectively, compared with the cheese whey without antimicrobial. In the same way, the strain 2, showed an increased of 2.0 and 3.2 respectively.
In the presence of green tea extract, the increase in the reduction was 5.3 and 4.2 (strain 1), and 4.7 and 1.8(strain 2). Also the coculture improved the perfomance when the stress acid was applied in cheese estabilized with nisin or green tea extract.
On the contrary, the application of Microgard™ 300 before de acid stress, did not modified the effect of the acids.
Data collected in the present study showed that the response to stress conditions, previously treated with an antimicrobial, varies with the microorganism, the antimicrobial and the type of acid.
The knowledge about the interactions between natural antimicrobials and stresses has important implications for the food industry when considering which food preservation regime is the best to adopt in order to obtain a safety and high quality food.

PALABRAS CLAVE: *Procesamiento de alimentos, antimicrobianos naturales, estrés ácido, suero de queso.*

KEYWORDS: *Food processing, natural antimicrobials, acid stress, cheese whey.*

INTRODUCCIÓN

El suero de queso posee gran valor nutritivo que radica fundamentalmente en su composición, conteniendo más de la mitad de los sólidos de la leche utilizada para la elaboración del queso, incluyendo las proteínas (20% del total) y la mayor parte de la lactosa, además de minerales y vitaminas hidrosolubles (Atra *et al*. 2006). Asimismo, debido a su alta demanda biológica de oxígeno, no puede ser eliminado sin tratar. El tratamiento del suero como efluente resulta antieconómico dada la gran inversión necesaria para la instalación de una planta de tratamiento, siendo ésta comparable a la inversión de una planta elaboradora de productos derivados (Peters 2005). Por otro lado, su procesamiento para la obtención de productos en polvo como concentrados (WPC) y aislados proteicos (WPI) para su utilización en alimentos para consumo humano, tiene asociado un alto costo y sólo resulta rentable para plantas de gran envergadura (Henning *et al.* 2006). Por lo tanto, es importante ofrecer alternativas de tratamientos para pequeñas y medianas empresas, desarrollando métodos simples y económicos que permitan estabilizar este efluente para que pueda ser almacenado hasta su utilización o traslado, manteniendo un estándar microbiológico y nutricional adecuado, con el fin adicional de no contaminar el medio ambiente.
Una opción interesante es utilizar directamente el líquido concentrado proveniente de la ultrafiltración, evitando el costo y el daño que pueda producir el secado. Se ha comprobado que el suero de queso procedente del proceso de membrana (producto intermedio), puede ser estabilizado microbiológicamente utilizando los antimicrobianos naturales nisina, Microgard™ y extracto de té verde (von Staszewski y Jagus 2007; von Staszewski y Jagus 2008).
Durante el procesamiento, preservación y almacenamiento de alimentos, los microorganismos son sometidos a varias condiciones de estrés como las inducidas por presencia de ácidos. Los ácidos orgánicos se encuentran como componentes naturales en muchos alimentos y también son extensamente usados como preservadores.

Dado que en la bibliografía se pueden encontrar microorganismos patógenos y contaminantes que pueden volverse más resistentes o más virulentos bajo condiciones de estrés (Leenanon y Drake 2001, Skandamis *et al.* 2008), y considerando que el suero tratado con antimicrobianos será utilizado como ingrediente en la formulación de alimentos, es importante conocer como afectará su incorporación en relación a la efectividad de los estreses ácidos que posteriormente serán utilizados.
Estos conocimientos permitirán desarrollar nuevas combinaciones de tratamientos que aseguren el control del crecimiento bacteriano y garanticen la seguridad de los alimentos (Faleiro *et al.* 2003, Lin y Chou 2004).
El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de diferentes estreses ácidos sobre *Listeria innocua* en suero de queso tratado con nisina, Microgard™ y extracto de té verde.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Se utilizaron dos cepas de *L.innocua* (CIP8011 CCMA29 y ATCC 33090, identificadas como cepa 1 y cepa 2 respectivamente).Estas cepas fueron evaluadas en forma individual y en cocultivo. Ambas cepas fueron precultivadas durante 16 - 18 horas a 28ºC en caldo triptona de soya enriquecido con extracto de levadura (TSYE, Biokar Diagnostics, France). Sendos inóculos fueron transferidos a caldos frescos de TSYE y los mismos se incubaron hasta la densidad poblacional deseada. Alícuotas de 20 ml de cada cultivo fueron centrifugadas durante 40 minutos a 10.000 rpm y los pellets de células fueron resuspendidos en el mismo volumen de suero líquido con 8% de sólidos. Se mezclaron iguales volúmenes de los mismos para preparar el inóculo de cocultivo.

Tratamientos con antimicrobianos

Preparación del extracto de té verde. Se pesaron 3,0 g de hojas de té verde comercial, se molieron en molinillo de café y se agregaron 97 ml de agua destilada caliente (95ºC aproximadamente) para lograr un extracto soluble en agua al 3% (P/V). Esta infusión se mantuvo en un baño térmico a 100ºC durante 20 minutos. Luego se filtró con algodón y se centrifugó a 10000 rpm durante 20 minutos para eliminar el polvillo. El extracto se esterilizó en autoclave (120ºC, 15min.).
El suero de queso 8% de sólidos conteniendo extracto de té verde al 3% se preparó disolviendo el WPC 34 (concentrado de proteína con 34% de proteínas, provisto por Williner S.A.) en dicho extracto, ajustando el pH a 5,5 por la adición de HCl 0,1 N.
El Microgard™ 300 5% (provisto por Danisco, Copenhagen, Denmark) se preparó disolviéndolo en suero de queso líquido 8 % de sólidos, ajustando el pH a 5,5 con HCl 0,1N.
La solución stock de nisina ($1x10^5$ IU ml^{-1}) fue preparada disolviendo Nisaplin® (provisto por Danisco, Copenhagen, Denmark) en agua destilada. El pH fue ajustado a 2,0 con HCl 0,1N para asegurar la estabilidad de la bacteriocina durante su almacenamiento a -20ºC.
La nisina fue agregada al suero ya inoculado para obtener una concentración final de 300 UI/ml. Cuando nisina o Microgard™ fueron agregados al suero, no se observaron cambios de pH en el mismo.
El suero inoculado con las cepas individuales o en cocultivo, sin agregado de antimicrobiano fue utilizado como control. Tanto controles como tratamientos con antimicrobianos fueron almacenados a 20ºC por 48 h.

Ensayos de susceptibilidad a distintos estreses

Se prepararon tubos con 9 ml de buffer PBS de pH 7,0 para el control. En el caso de los tratamientos con ácidos HCl, láctico y cítrico se procedió de la misma manera y se llevó a pH 4,0 con el ácido correspondiente a cada estrés. Se inocularon con 1 ml de las muestras control y de las tratadas con los distintos antimicrobianos, y se incubaron a 20ºC durante 1 h.
Luego de cumplido este tiempo, se evaluó la efectividad de los tratamientos por sembrado en placas de medio TSYE. El recuento se efectuó después de la incubación por 24-48 h a 37ºC. Las determinaciones fueron realizadas por duplicado.

Tratamiento estadístico

Las determinaciones y análisis se llevaron a cabo por duplicado. Se empleó Microsoft® Office Excel 2003 para calcular las diferencias significativas ($P<0.05$) en el efecto antibacteriano de los diferentes tratamientos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las cepas de *Listeria innocua* evaluadas en forma individual y en cocultivo mostraron poca sensibilidad frente al tratamiento con ácido clorhídrico, láctico y cítrico en suero sin tratamiento previo con antimmicrobiano.

Está informado en la bibliografía que *Listeria* spp. son tolerantes a la acción de los ácidos. Este comportamiento representa un problema en la seguridad de alimentos de baja acidez como el caso de algunos quesos (Gahan *et al.* 1996; O´Driscoll et al. 1996). El pH que el microorganismo puede tolerar depende de la composición del medio, la cepa y su estado fisiológico. Shabala *et al.* (2006) mostraron que *Listeria innocua* mantiene su pH interno frente a estreses ácidos. A su vez, estudiaron las estrategias empleadas por el microorganismo frente a un cambio abrupto de pH externo a la célula, producido por la aplicación de ácido clorhídrico o ácido láctico. Estos investigadores informaron que, el microorganismo puede restaurar su pH interno luego de un descenso abrupto de pH 6,0 a pH 4,0 en forma casi instantánea y en 30 minutos con cada uno de los ácidos evaluados. De esta forma muestran que la respuesta y el mecanismo dependen del ácido empleado.

Phan-Thanh *et al.* (2000) observaron que a igual pH externo, los ácidos orgánicos débiles son más efectivos frente a *Listeria* que ácidos inorgánicos fuertes como el HCl. Para un pH externo de 3,8; el pH interno de la célula es de 4,5; 3,8 y 3,6 cuando este valor se obtiene por el agregado de HCl, una mezcla de ácidos grasos o ácido acético respectivamente. Ésto confirma los diferentes mecanismos que los ácidos utilizan para atravesar la membrana celular. Los ácidos inorgánicos fuertes se encuentran completamente disociados y la membrana celular tiene una muy baja permeabilidad a H^+. Por el contrario, los ácidos orgánicos sin disociar pueden difundir a través de la membrana celular. Cuando el pH intracelular es mayor que el del medio externo, se disocia, liberando protones y acidificando el citoplasma (George *et al.* 2008). Para eliminar el exceso de protones y mantener un adecuado pH interno, las células deben gastar energía. Ésto afecta el transporte de nutrientes y la actividad metabólica, dando como resultado un aumento de la fase de latencia y una disminución de velocidad de crecimiento y densidad máxima poblacional.

Este efecto también se ha comprobado en este trabajo. El empleo de ácido clorhídrico resultó ser mucho menos efectivo para la reducción de las cepas 1, 2 y cocultivo en todos los sistemas estudiados (**figura 1**, **figura 2** y **figura 3**).

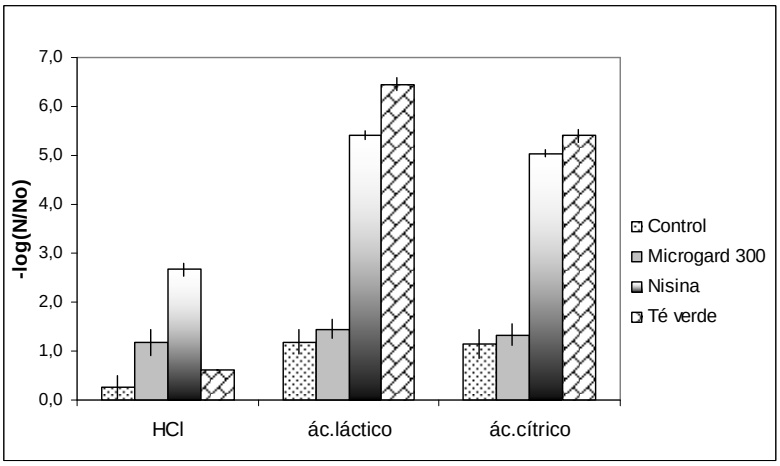


Figura 1. Reducción de *L.innocua* (cepa 1) frente a estreses ácidos en presencia de los antimicrobianos naturales nisina, Microgard™ y extracto de té verde

Sin embargo, cuando el suero es tratado previamente con nisina o té, la acción de los estreses ácidos posteriores sobre la cepas individuales y en cocultivo muestran aumento de efectividad, fundamentalmente para los ácidos orgánicos (**figura 1**, **figura 2** y **figura 3**). Para la cepa I, en el caso de suero estabilizado con nisina, el tratamiento posterior con ácido cítrico o láctico produce una reducción de 3,8 y 4,2 órdenes mayor con respecto al mismo estrés en las muestras control (suero solo con estrés ácido), resultando en un efecto sinérgico (**Tabla 1**).

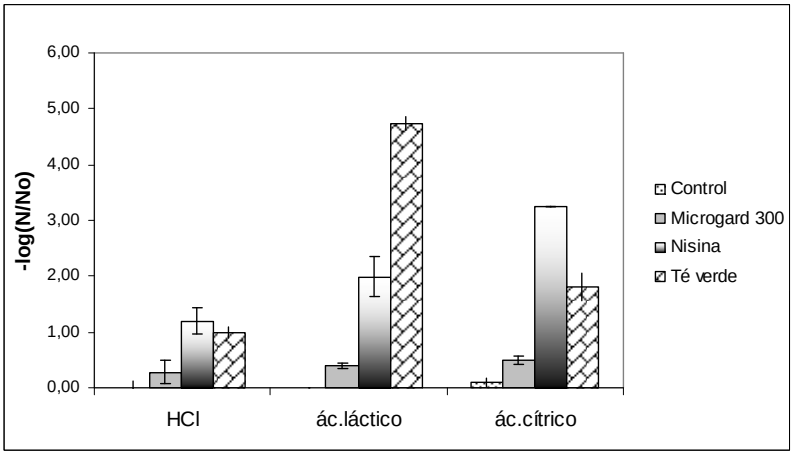


Figura 2. Reducción de *L.innocua* (cepa 2) frente a estreses ácidos en presencia de los antimicrobianos naturales nisina, Microgard™ y extracto de té verde

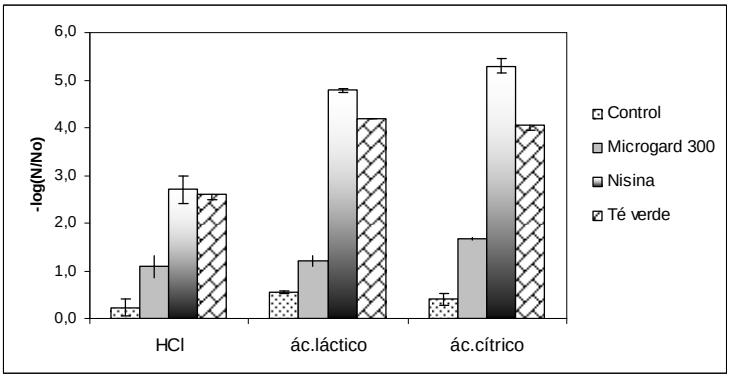


Figura 3. Reducción de *L.innocua* en cocultivo (cepa 1 y 2) frente a estreses ácidos en presencia de los antimicrobianos naturales nisina, Microgard™ y extracto de té verde.

Tabla 1. Aumento de la efectividad de estreses ácidos sobre cepas de *Listeria innocua* en cultivo individual y cocultivo, en presencia de antimicrobianos naturales

Antimicrobiano	ÁCIDO LÁCTICO			ÁCIDO CÍTRICO		
	cepa 1	cepa 2	cocultivo	cepa 1	cepa 2	cocultivo
NISINA 300	4,2	2,0	4,2	3,8	3,2	5,3
TÉ 3%	5,3	4,7	3,6	4,2	1,8	4,1

Se sabe que la nisina actúa formando poros por desestabilización de la membrana, produciendo flujo de iones y solutos citoplasmáticos e inhibiendo procesos biosintéticos (Deegan *et al.* 2006). Este proceso sensibilizaría a la célula a cambios externos de osmolaridad y pH.

De la misma manera, el suero tratado con té (en la misma cepa), muestra un aumento en la reducción de 4,2 y 5,3 ciclos log en presencia de los ácidos cítrico o láctico con respecto al suero control (**Tabla 1**). Esto pudo deberse a que los polifenoles del té verde interactúan con la matriz alimentaria, principalmente con las proteínas, favoreciendo la acción de los estreses posteriores. El mismo comportamiento se observa cuando se evalúa a las cepas 1 y 2 en cocultivo, y en menor medida cuando la cepa 2 se encuentra en cultivo individual (**figuras 2 y figura 3**).

La respuesta al ácido clorhídrico sólo se ve modificada favorablemente para la cepa 1 y el cocultivo, cuando el suero es tratado con nisina ,y para el cocultivo con el té como tratamiento previo.

A su vez, el tratamiento con Microgard™, no afecta significativamente la actividad de los ácidos en ningún caso (**figura 1**, **figura 2** y **figura 3**). Skandamis *et al.* (2008) estudiaron la respuesta adaptativa de cepas de *Listeria monocytogenes* frente a tratamientos individuales y múltiples, aplicados en forma simultánea o secuencial. En todos los casos observaron desarrollo de resistencia, siendo más pronunciada cuando fueron aplicados tratamientos subletales múltiples como estrés ácido y calor.

Phan-Thanh y col. (2000) estudiaron la respuesta de *Listeria monocytogenes* frente distintos ácidos y los mecanismos de adaptación entre ácidos y frente a otros estreses. Observaron que la adaptación de este microorganismo a un ambiente ácido producido con ácidos lipofílicos débiles (acético, butírico y propiónico), produce un aumento de resistencia al tratamiento posterior con calor (52°C), shock osmótico (25% NaCl) y estrés alcohólico (15%). Microgard™ tiene en su composición ácido acético, propiónico y láctico, que eventualmente podrían producir un aumento de resistencia al estrés ácido posteriormente aplicado. Sin embargo, no se observa este fenómeno, probablemente debido a la composición del Microgard™ . Este antimicrobiano es un producto fermentado que, además de los ácidos posee compuestos inhibitorios que inducen la sensibilidad microbiana. A su vez, en la compleja matriz que presenta el suero, pueden encontrarse componentes que ejerzan efectos protectores, produciendo como consecuencia el comportamiento observado.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos indican que los antimicrobianos naturales, representan una buena herramienta para conservar el suero de queso, con el objetivo que pueda ser empleado como ingrediente en la formulación de alimentos.

La utilización de los antimicrobianos nisina, Microgard™ y té verde no producen mayor resistencia de los microorganismos evaluados cuando son expuestos a estreses ácidos posteriores habitualmente aplicados en la elaboración de alimentos.

A su vez, es posible obtener respuestas sinérgicas mediante la utilización de suero estabilizado con antimicrobianos naturales en procesos donde se aplican estreses ácidos. Sin embargo, resulta importante evaluar cada sistema alimenticio con el fin de optimizar las concentraciones a utilizar y estudiar posibles efectos protectores.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad de Buenos Aires por su apoyo económico y a la empresa Danisco, Danmark por la donación de los productos Nisaplin y Microgard™.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Atra R, Vatai G, Bekassy-Molnar E, Balint, A. 2006. Investigation of ultra- and nanofiltration for utilization of whey protein and lactose. Journal of Food Engineering,, 67: 325-332.

Deegan L, Cotter PD, Colin, H., Ross, P. 2006. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal*, 16: 1058-1071.

Faleiro M L, Andrew, PW, Power D. 2003. Stress response of *Listeria monocytogenes* isolated from cheese and other foods. *International Journal of Food Microbiology*, 84: 207-216.

Gahan CG, O`Driscoll B, Hill C. 1996. Acid adaptation of *Listeria monocytogenes* can enhance survival in acid foods and during milk fermentation. Appl. Environ. Microbiol., 62: 3128-3132.

George SM, Metris A, Stringer SC. 2008. Physiological state of single cells of *Listeria innocua* in organic acids. Int. Journal od Food Microbiol., 124: 204-210.

Henning DR, Baer R.J, Hassan AN, Dave R. 2006. Major Advances in Concentrated and Dry Milk Products, Cheese, and Milk Fat-Based Spreads. *Journal of Dairy Science*, 89: 1179-1188.

Leenanon BR, Drake MA. 2001. Acid stress, starvation, and cold stress affect poststress behaviour of *Escherichia coli* O157:H7 and nonpathogenic *Escherichia coli.* Journal Food Protection, 64: 970-974.

Lin Y, Chou C. 2004. Effect of heat shock on thermal tolerance and susceptibility of *Listeria monocytogenes* to other enviromental stresses. *Food Microbiology*, 21: 605-610.

O`Driscoll B, Gahan CG, Hill C. 1996. Adaptative acid tolerance response in *Listeria monocytogenes*: isolation of an acid-tolerant mutant wichdeemonstrated increased virulence. Appl. Environ. Microbiol., 62 (5): 1693-1698.

Peters RH. 2005. Economic aspects of cheese making as influenced by whey processing options. *International Dairy Journal,* 15: 537- 545.

Phan-Than L, Mahouin F, Aligé S. 2000. Acid responses of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology,* 55: 121-126.

Skandamis, P.N., Yoon, Y., Stopjorth, J.D., Kendall, P., Sofos, J. 2008. Heat and acid tolerance of *Listeria monocytogenes* after exposure to single and multiple stresses. Food Microbiology, 25: 294-303.

Shabala L, McMeekin T, Budde BB, Siegumfeldt H. 2006. *Listeria innocua* and *Lactobacillus delbrueckii* subs. *Bulgaris* employ different strategies to cope with acid stress. Int. Journal od Food Microbiol., 110: 1-7.

von Staszewski M, Jagus R J 2007. Efecto antimicrobiano de distintas variedades de té verde argentino en suero de queso líquido. Alimentos, Ciencia e Ingeniería, 16 (3): 305-307. ISSN 1390-2180.

von Staszewski M, RJ Jagus 2008. Natural antimicrobials: effect of Microgard^{TM} and nisin against *Listeria innocua* in liquid cheese whey. International Dairy Journal, 18, 255-259. ISSN 0958-6946.

Vida útil de carne de conejo envasada en películas plásticas durante el almacenamiento refrigerado

Shelf-life of rabbit meat packed with plastic films during refrigerated storing

Londoño Orjuela[1], M; Dello Staffolo[1], M; Bertola[1], N, Bevilacqua, A[1,2]

[1]CIDCA-CCT La Plata, CONICET, Facultad de Ciencias Exactas, [2] Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de La Plata, 47 y 116, La Plata (1900) Argentina.
nbertola@ing.unlp.edu.ar

RESUMEN

Actualmente la carne de conejo es considerada como una de las carnes más sanas desde el punto de vista nutricional, en comparación con otras carnes rojas de consumo humano habitual. La carne de conejo tiene un mayor contenido de proteínas, un menor contenido de grasa total y un menor contenido de colesterol que la carne vacuna. La vida útil es definida como el período de tiempo de almacenamiento, en el cual un producto alimenticio es seguro para el consumo, teniendo en cuenta determinados parámetros de calidad. Considerando los datos bibliográficos, se estableció como límite, el tiempo de almacenamiento en el cual las muestras presentaban un contenido de Nitrógeno básico volatil de 30 mg/L, Nº de TBA de 2 mg/L, recuento de coliformes totales de 500 ufc/g y recuento de Lactobacilos de 10^6 ufc/g.

El objetivo del presente trabajo fue determinar la vida útil de carne de conejo envasada en películas plásticas de diferente permeabilidad al oxígeno durante almacenamiento refrigerado a 0 y 4°C.

Cortes de los músculos dorsales fueron envasados en dos tipos de película y almacenados a 0° y 4°C. Las películas utilizadas fueron: BB4L (permeabilidad al oxígeno = 6 – 14 cm^3 / m^2 día atm) y BK1 (permeabilidad al oxígeno = 175 cm^3 / m^2 día atm). A distintos tiempos de almacenamiento (0, 7, 14 y 21 días) se determinó la concentración de nitrógeno básico volátil (destilación por arrastre de vapor en un equipo Bucchi) y la concentración de sustancias reactivas al ácido tíobarbitúrico (Nro de TBA). Además se realizaron recuentos en placa de coliformes totales, Pseudomonas, lactobacilos, hongos y levaduras a 0, 2, 4, 6 y 8 días de almacenamiento. Para estudiar si los factores ensayados (tipo de película, tiempo y temperatura de almacenamiento) produjeron un efecto significativo en las distintas variables analizadas se realizaron los correspondientes análisis de varianza (ANOVA) y comparación de medias (test de LSD) utilizando el software estadístico SYSTAT.

El NBV y el Nro de TBA fueron afectados significativamente ($P< 0.05$) por el tiempo y la temperatura de almacenamiento. A 4°C los valores de TBA resultaron mayores que a 0ºC, sin embargo fueron menores a 2 mg malonaldehído/kg carne, valor informado por otros autores como causante de rechazo. Con respecto al recuento de microorganismos, los recuentos de bacterias coliformes y el de hongos y levaduras fueron afectados significativamente por el tiempo, la temperatura y la película de envase. El recuento de lactobacilos mostró diferencias significativas con el tiempo y la temperatura de almacenamiento. No se encontró Pseudomona sp. durante todo el almacenamiento en ninguna de las muestras analizadas.

De los resultados obtenidos se estableció una vida útil para la carne de conejo envasada en BBL y almacenada a 4ºC de 4 días y a 0º de 8 días.

ABSTRACT

Nowadays rabbit meat is considered as one of the healthiest meat from a nutritional point of view compared to others types of red meats regularly consumed by people. The rabbit meat has higher protein content, lower total fat content and lower cholesterol content than cow meat. Shelf life is defined as a period of storage time which a food product is safety for human consume, taking into account quality and safety parameters. In this work, time which samples reached a VBN of 30 mg/L, 2 mg/L of TBA number, 500 CFU/g for total coliforms counts and 10^6 CFU/g for Lactobacillus counts was taken as limit of shelf life based on literature data.

The purpose of this study was to determine shelf life of rabbit meat packaged in plastic film with different oxygen permeability during refrigerated storage at 0 y 4°C.
Pieces of dorsal muscles were packaged in two different plastic films and storaged at 0° and 4°C. The films utilized were: BB4L (oxygen permeability = 6 – 14 cm^3 / m^2 day atm) y BK1 (oxygen permeability= 175 cm^3 / m^2 day atm). Volatile basic nitrogen concentration or VBN (distillation in a Bucchi equipment) and reactive substances to tiobarbituric acid concentration (TBA number) were measured at different storage times (0, 7, 14 y 21 days). In addition, plate counts for total coliforms, Pseudomonas spp., Lactobacillus spp., moulds and yeast were carried out at 0, 2, 4, 6 and 8 days of storage time. The ANOVA test was used to study influence of assayed factors (type of film, storage time and storage temperature) on analysed variables. LSD test was utilised to compare means at 0.05 level of probability. Both testes were performed using the software SYSTAT.
The VBN and TBA number were significantly affected ($P< 0.05$) by time and temperature of storage. At 4°C TBA numbers were higher than those at 0ºC. However, they were lower than 2 mg malonaldehide/Kg meat. This value was accepted as food-rejection cause by others authors. With regard to bacterial counts, coliforms, molds and yeast were significantly affected by time and temperature storage but also by type of film. The Lactobacillus count showed significantly differences with time and temperature of storage. Did not found Pseudomona spp. in analysed samples during storage. The results of this study indicated a shelf life of 4 days at 4ºC and 8 days at 0ºC for rabbit meat packaged in BBL plastic bags.

PALABRAS CLAVE: *conejo, película plástica, refrigeración.*

KEYWORDS: *rabbit, plastic film, refrigeration.*

INTRODUCCIÓN

Debido a la constante preocupación durante los últimos años sobre una alimentación sana y saludable baja en colesterol y rica en proteínas que permita suplir requerimientos nutricionales sin afectar o deteriorar la salud se pensó en la carne de conejo como generadora de estos recursos. La carne de conejo tiene un mayor contenido de proteínas (20.8 g/100g frente a 16.3g/100g para el ganado vacuno), un menor contenido de grasa total (10.2g/100g frente a 28.0g/100g para vacuno) y un menor contenido de colesterol (50mg/100g frente a 130mg/100g para los vacunos) con un alto aporte de ácidos grasos poliinsaturados (Vergara et al. 2005).
Por todo lo expuesto la carne de conejo constituye un alimento requerido por consumidores y adecuado a regímenes alimentarios orientados a prevenir o atenuar enfermedades cardiovasculares.
Un factor importante a tener en cuenta en la conservación de carne es la oxidación de los lípidos durante el almacenamiento. La carne de conejo es rica en ácidos grasos poliinsaturados que podrían ser la causa de una rápida reducción de su estabilidad oxidativa, lo cual produciría aromas indeseables (Berruga et al. 2005).
Contrariamente a lo que ocurre con otros tipos de carne existe en la literatura escasa información sobre los sistemas de envasado más adecuados para almacenar carne de conejo. El envasado al vacío reduce la oxidación de lípidos con lo cual se logra extender la vida útil de la carne de conejo durante su almacenamiento refrigerado (Fernandez-Espla y O'Neill 1993) pero produce su oscurecimiento.
Los cambios producidos sobre la calidad de la carne durante el almacenamiento refrigerado están fuertemente afectados por diferentes factores como la temperatura, tiempo de almacenamiento, tipo de envase, etc (Hulot y Ouhayoun 1999).
El objetivo del presente trabajo fue determinar la vida útil de carne de conejo envasada en películas plásticas durante almacenamiento refrigerado a 0 y 4°C.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para cada condición de almacenamiento se realizaron tres experiencias utilizando en cada una dos animales. Se extrajeron los lomos, principalmente el músculo *Longissimus dorsi*, se mezclaron en forma aleatoria las piezas provenientes de todos los animales para luego ser envasadas en dos tipos de película y almacenados a 0° y 4°C. Las películas utilizadas fueron: BB4L (permeabilidad al oxígeno = 6 – 14 cm3 / m2 día atm) y BK1 (permeabilidad al oxígeno = 175 cm3 / m2 día atm).

A distintos tiempos de almacenamiento (0, 7, 14 y 21 días) se determinó la concentración de nitrógeno básico volátil y la concentración de sustancias reactivas al ácido tíobarbitúrico (Nro de TBA).
La cantidad de nitrógeno básico volátil (NBV) liberado se determinó por triplicado mediante una destilación por arrastre de vapor, utilizando un equipo para determinación de nitrógeno por el método de Kjeldahl. La rancidez de las muestras se determinó por el número de TBA, dicho índice está relacionado con la cantidad de malonaldehido y otros productos de oxidación presentes en la muestra de carne analizada. Las determinaciones de Nro de TBA se realizaron por cuadriplicado según la técnica de Tironi et al. (2007).
Para estudiar el deterioro por microorganismos se realizaron recuentos en placa de Coliformes totales, Pseudomonas, Lactobacilos, Hongos y Levaduras a 0, 2, 4, 6 y 8 días de almacenamiento. El agar para el recuento en placa de coliformes totales es un medio de cultivo selectivo. El cristal violeta y las sales biliares que contiene inhiben el crecimiento de la flora acompañante Gram positiva. La fermentación de la lactosa provoca la acidificación del medio, dando unas colonias de color rojo debido al indicador (rojo neutro) y a veces con un halo de precipitación de ácidos biliares. El agar para el recuento de Pseudomonas favorece la selección de Pseudomona aeruginosa y la formación de pigmentos, el cloruro de magnesio y el sulfato de potasio que contiene promueven la formación de piocianina, pioverdina y piomelanina de Pseudomona aeruginosa, la cetrimida que contiene es un detergente catiónico que actúa como agente inhibidor, libera el nitrógeno y el fósforo de las células de casi toda la flora acompañante. El agar para el recuento de hongos y levaduras es un medio selectivo que tiene un alto poder nutritivo y bajo pH que inhibe el crecimiento bacteriano, el extracto de levadura y glucosa que contiene favorecen el crecimiento de las levaduras y mohos. La presencia de cloranfenicol, que es un antibiótico estable al calor, inhibe el crecimiento de bacterias. En todos los casos se tomaron 10 gramos de muestra en 90 ml de agua peptonada 0.1% estéril asegurando la dilución 1:10. Se homogeneizó esta dilución inicial en stochmacher y se realizaron diluciones seriadas hasta 10-6.
Se realizó un análisis de varianza para evaluar el efecto de los factores analizados utilizando el programa Systat (Evenston, IL, USA, 12.01.00, 2007). Para los ensayos de comparación de medias se empleó el test de menor diferencia significativa (LSD) con $P < 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Nitrógeno básico volátil

La valoración del nitrógeno básico volátil es muy importante para apreciar el estado higiénico de una carne. El NBV fue afectado significativamente ($P < 0.05$) por el tiempo y la temperatura de almacenamiento. No se observaron diferencias significativas con la película de envase. De los resultados obtenidos se puede observar que a 4°C la producción de NBV fue más rápida que a 0°C. Se observó una variación lineal del NBV con el tiempo realizándose el ajuste de los valores experimentales para cada temperatura (**Figura 1**). La pendiente de dichas rectas correspondería a la constante cinética (k) de formación del NBV. Los valores obtenidos son mostrados en la **Tabla 1**.

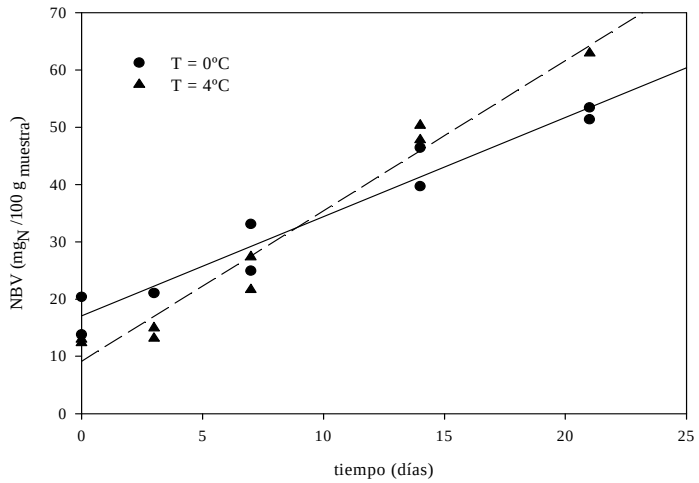


Figura 1. Variación del contenido de Nitrógeno Básico Volátil (NBV) en función del tiempo para muestras de conejo almacenadas a dos temperaturas de refrigeración.

Tabla 1. Valores de las constantes cinéticas (k, mg / 100 g $_{muestra}$ día) de formación del NBV para cada una de las temperaturas estudiadas.

	Temperatura	
	0	4
k NBV	1.8	2.3
k Nro TBA	0.011	0.019

Sustancias reactivas al ácido tíobarbitúrico

Los valores de Nro de TBA fueron afectados significativamente ($P< 0.05$) por el tiempo y la temperatura de almacenamiento. No se observaron diferencias significativas con la película de envase. A 4 °C los valores de Nro de TBA resultaron mayores que a 0° C; sin embargo fueron menores a 0.6 $mg_{malonaldehído}$ / kg_{carne}, valor correspondiente al nivel mínimo detectable de rancidez en hamburguesas de carne vacuna (Georgantelis et al. 2007). Los valores informados por otros autores como causante de rechazo en carne de conejo son de 2 $mg_{malonaldehído}$ / kg_{carne} (Vergara et al. 2005).

Los resultados obtenidos son mostrados en la **Figura 2**. Se observó una variación lineal del Nro de TBA con el tiempo realizándose el ajuste de los valores experimentales para cada temperatura. La pendiente de dichas rectas correspondería a la constante cinética (k) de formación de las sustancias reactivas al ácido tíobarbitúrico. Los valores obtenidos son mostrados en la **Tabla 1**.

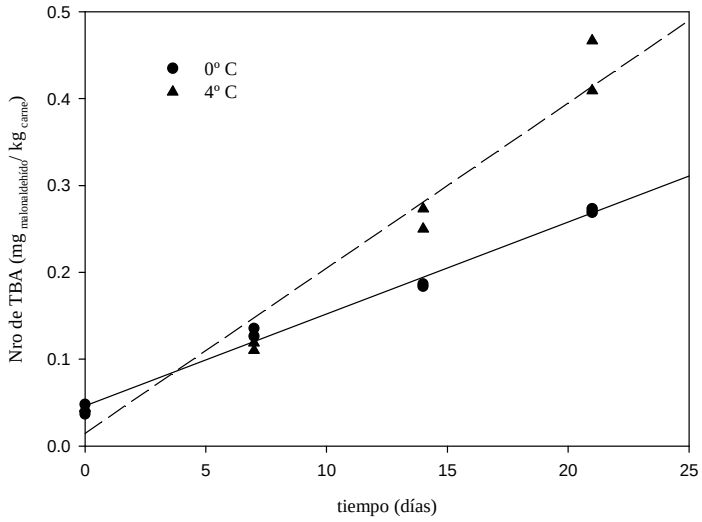


Figura 2. Variación del contenido de sustancias reactivas al ácido tíobarbitúrico (Nro de TBA) en función del tiempo para muestras de conejo almacenadas a dos temperaturas de refrigeración.

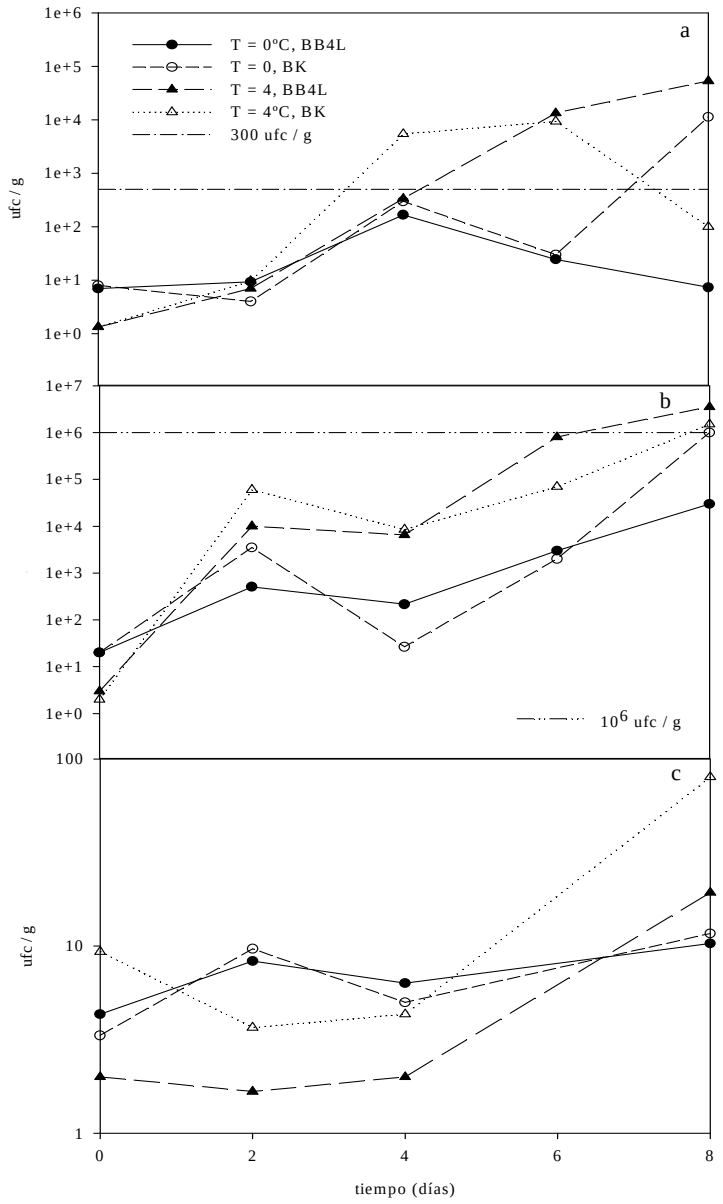
Recuento de microorganismos

Con respecto al recuento de microorganismos, el contenido de bacterias coliformes, lactobacilos y hongos y levaduras fueron afectados significativamente por el tiempo, la temperatura de almacenamiento y la película de envase (**Figura 3**).

No se encontró Pseudomona sp. durante todo el almacenamiento en ninguna de las muestras analizadas. Estos resultados difieren de Rodríguez-Calleja el al. (2005) en donde se obtuvo crecimiento en placa a partir de muestras conservadas en refrigeración durante un periodo de ocho días.

Vida útil

La vida útil es definida como el período de tiempo de almacenamiento, en el cual un producto alimenticio es seguro para el consumo, teniendo en cuenta determinados parámetros de calidad. En este trabajo, se estableció como límite del tiempo de almacenamiento cuando las muestras presentaban un contenido de Nitrógeno Básico Volátil (NBV) de 30 mg_N/ 100 g_{carne}, un contenidose substancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) de 0.6 $mg_{malonaldehído}$ / Kg_{carne}, recuento de coliformes totales de 300 ufc/g y recuento de lactobacilos de 10^6 ufc/g (Georgantelis et al. 2007, Rofriguez-Calleja et al. 2005).



a) Bacterias coliformes, b) Lactobacilos, c) Hongos y levaduras

Figura 3. Variación del número de microorganismos expresados como ufc / g en función del tiempo de almacenamiento.

Para determinar el tiempo de almacenamiento a cada temperatura que cumpliera con los requisitos establecidos, primero se calculó el tiempo al cual el contenido de NBV alcanzaba valores de 30 mg_N/ 100 g_{carne} a partir de las velocidades de formación obtenidas previamente a partir de:

$$t = \frac{(30 - NBV_0)}{k}$$

Como valor de la concentración de NBV inicial (NBV_0) se utilizó el promedio de los valores obtenidos de NBV iniciales correspondientes a cada conjunto de músculos para todos los conejos utilizados. El valor resultante fue de 14.8 mg_N/ 100 g_{carne} día. Los tiempos obtenidos fueron 8 días para 0ºC y 6 días para 4ºC.

Se verificó que para los tiempos obtenidos se cumplieran los demás requisitos. Respecto al Nro de TBA y el recuento de lactobacilos fueron menores al valor establecido, sin embargo el recuento de

coliformes a la temperatura de 4ºC fue mayor al establecido, siendo este requisito el que limitó la vida util a esta temperatura.
De los resultados obtenidos se estableció un tiempo de almacenamiento para la carne de conejo envasada al vacío de 3 días a 4ºC y de 8 días a 0º.

CONCLUSIONES

- De los resultados obtenidos se puede observar que el contenido de nitrógeno básico volátil y de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico fueron afectados significativamente por la temperatura y el tiempo de almacenamiento pero no por el tipo de película utilizada. El recuento de microorganiosmos fue afectado por el tiempo, la temperatura y la película de envase.
- Se estableció un tiempo de almacenamiento para la carne de conejo envasada al vacío de 3 días a 4ºC y de 8 días a 0º.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la financiación suministrada por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y por la Universidad Nacional de la Plata, Argentina.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Berruga M.I., Vergara H, Linares B. 2005. Control of microbial growth and rancidity in rabbit carcasses by modified atmosphere packaging. J Sci Food Agric 85:1987–1991

Fernandez-Espla, O'Neill, E. 1993. Lipid oxidation in rabbit meat under different storage conditions. J. Food Sci. 58 (6), 1262–1264.

Georgantelis, D., Blekas, G., Katikou, P., Ambrosiadis, I. D.J. 2007. Effect of rosemary extract, chitosan and α-tocopherol on lipid oxidation and colour stability during frozen storage of beef burgers. Meat Science, 75: 256-264.

Hulot, F., Ouhayoun, J. 1999. Muscular pH and related traits in rabbits: A review. World Rabbit Sci. 7 (1), 15–36.

Rodríguez-Calleja, J M, García-López, M L, Santos, J A, Otero, A. 2005. Development of the aerobic spoilage flora of chilled rabbit meat. Meat Science 70:389–394

Tironi, V. A.; Tomás, M.C. y Añón M.C. 2007. Lipid and protein deterioration during the chilled storage of minced sea salmon (Pseudopercis Semidasciata). J. Sci. Food Agric. 87(12): 2239-2246.

Vergara H, Berruga M. I. Linares B. 2005. Effect of gas composition on rabbit meat quality in modified atmosphere packaging. J Sci Food Agric 85:1981–1986

Pachyrhizus ahipa: revalorización de un cultivo ancestral como fuente alternativa de almidón

Pachyrhizus ahipa: reassessment of ancient crop as alternative starch source

López OV (1), Pachas, AN (2), Rohatsch, PH (2), Mugridge, A (1), Fassola, H.E. (2), Viña, SZ (1), García MA (1)

(1) CIDCA (Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos), Facultad de Ciencias Exactas UNLP – Centro Científico Tecnológico La Plata (CCT-La Plata) CONICET, 47 y 116 S/Nº, La Plata (B1900AJJ), Buenos Aires, Argentina
(2) EEA Montecarlo INTA, Misiones, Argentina
ovlopez75@yahoo.com.ar

RESUMEN

La ahipa (*Pachyrhizus ahipa*) es una planta Leguminosa cultivada antiguamente en la región andina, caracterizada por su resistencia al ataque de diversas plagas. Su raíz tuberosa acumula almidón como compuesto de reserva. El objetivo de este trabajo fue evaluar el comportamiento del cultivo de ahipa en la provincia de Misiones, caracterizar la composición química de las raíces obtenidas, analizar su conservación, implementar un proceso para obtener su almidón y evaluar las propiedades funcionales del mismo.

P. ahipa se adaptó satisfactoriamente a las condiciones agroecológicas de Misiones, permitiendo obtener rendimientos máximos de 20.839 kg ha^{-1}. Una vez en el CIDCA, las raíces se acondicionaron para su almacenamiento a 4, 10 ó 25ºC. Inicialmente, se cuantificó humedad, cenizas totales, materia grasa, fibra cruda, proteínas totales, compuestos libres de nitrógeno, concentración de sólidos solubles (ºBrix) y producción de CO_2. Asimismo, durante el almacenamiento se determinó el color en el corte transversal de las raíces (usando un colorímetro Minolta CR400) y la textura (análisis del perfil de textura, TPA). Los resultados obtenidos permiten señalar que el tenor de proteínas (6,5%) resultaría medio, dado el elevado contenido de humedad de las muestras (82%). Sin embargo dicho contenido resultó superior al de otras raíces, como batata y mandioca. La conservación a bajas temperaturas produjo considerable daño por frío y ocasionó proliferación de microorganismos, en tanto que el almacenamiento a 25ºC no indujo cambios significativos en el color o la textura de las raíces de ahipa.

El proceso de extracción de almidón comenzó con el lavado, pelado y procesado de las raíces. La pasta rallada se colocó en agua y se almacenó a 4°C durante 24h. La mezcla se filtró y se obtuvo el almidón en suspensión acuosa que se decantó a 4°C. El material insoluble sedimentado se secó a 40°C y se sometió a molienda. El rendimiento de la extracción de almidón de raíces de ahipa fue de 56,54 g/100 g de materia seca.

Con el fin de proponer usos alimentarios para este producto, se evaluó la gelatinización y la retrogradación en condiciones de refrigeración de sus pastas mediante DSC, TPA y estudio del grado de sinéresis. Se halló que el almidón de ahipa gelatinizó a 67,18°C y sus pastas no retrogradaron en los tiempos ensayados, ya que la dureza de los geles no varió significativamente y el grado de sinéresis resultó muy bajo. Las propiedades funcionales evaluadas indican que el almidón de ahipa sería un espesante adecuado para la formulación de alimentos refrigerados.

ABSTRACT

Ahipa (*Pachyrhizus ahipa*) is a leguminous plant cultivated formerly in the Andean region, characterized by its resistance to the attack of diverse pests. Ahipa tuberous root accumulates starch as reserve compound. The objective of this work was to evaluate ahipa crop management in Misiones (Argentina), to characterize the chemical composition of the obtained roots, to analyze its conservation, to implement a process to obtain ahipa starch and to evaluate its functional properties.

P. ahipa successfully adapted to the agroecological conditions of Misiones, allowing maximum yield of 20,839 kg ha^{-1}. Once in the CIDCA, roots were conditioned for storage at 4, 10 or 25 º C. Initially, moisture content, total ash, fat, crude fiber, total protein, nitrogen-free compounds, total soluble solids (º Brix) and CO_2 production were quantified.

During storage, color changes in the cut section of the roots (measured using a Minolta colorimeter CR400) and texture (texture profile analysis, TPA) were evaluated. Results indicate that the protein content (6.5%) would be intermediate, since samples showed relatively high moisture content (82%). However, protein levels were higher than that of other roots, like sweet potatoe and cassava. Conservation at low temperatures resulted in considerable injury and caused proliferation of microorganisms, while storage at 25 ° C did not cause significant changes in color or texture of the roots.
The process of starch extraction began with the washing, peeling and processing of the ahipa roots. The paste of the grated ahipa was placed in water and stored at 4°C during 24hs. The mixture was filtered and the starch presented in the aqueous suspension was poured off at 4°C. The settled insoluble material was dried at 40°C and it was triturating. The yield of the extracted starch of the ahipa roots was 56.54 g/100 g of dry matter.
In order to suggest food uses for this product, the starch pastes gelatinization and retrogradation under refrigeration conditions were evaluated by DSC, TPA and syneresis degree. Ahipa starch gelatinized at 67.18°C and its pastes did not retrograded during the assayed times, since the gels hardness did not significantly vary and the syneresis degree was too low. The evaluated starch functional properties indicate that it is an adequate thickener for refrigerated foods.

PALABRAS CLAVE: *cultivos no tradicionales, conservación poscosecha, almidones nativos.*

KEYWORDS: *non traditional crops, postharvest storage, native starches.*

INTRODUCCIÓN

El estudio de especies que podrían ser cultivadas con propósitos múltiples (uso alimentario humano, ganadero, agroindustrialización, recuperación de suelos, etc.) implica potenciales beneficios económicos y agroecológicos, relacionados con la diversificación de cultivos y la generación de materias primas y productos elaborados alternativos.
Organizaciones tales como el Centro Internacional de la Papa (CIP) han implementado programas de emergencia para rescatar especies vegetales, silvestres y domesticadas, amenazadas de extinción biológica y/o debilitamiento genético severo.
Se ha establecido así que al menos nueve especies andinas productoras de raíces y tubérculos comestibles revisten importancia en sistemas agrícolas basados en la producción de papa. Estos cultivos son relevantes desde el punto de vista económico y nutricional en la subsistencia de agricultores de la región, que frecuentemente los usan sustituyendo en la dieta a ciertas frutas y hortalizas de mayor costo.
Las especies correspondientes son: ahipa, achira, arracacha, maca, mashua, mauka, oca, ulluco y yacón. Se considera que es posible encontrar nuevos usos para las mismas que puedan estimular su demanda, incluyendo a la exportación, y crear nuevas oportunidades económicas.
La ahipa, *Pachyrhizus ahipa* (Wedd.) Parodi, fue utilizada por los pueblos originarios desde tiempos inmemoriales. Sin embargo, con el proceso de transculturización y migración esta planta fue abandonada y actualmente su cultivo es muy reducido, restringido a un limitado número de valles andinos.
Se trata de una planta Leguminosa, caracterizada por su resistencia al ataque de diversas plagas. Podría considerarse como un cultivo integral, pues la planta es aprovechable en su totalidad (Amaya Robles y Julca Hashimoto, 2006). Sus raíces tuberosas acumulan almidón como compuesto de reserva.
De acuerdo con Piyachomkwan *et al*. (2002), las fuentes disponibles de almidón a escala comercial no cubren totalmente el amplio espectro de necesidades en cuanto a propiedades funcionales que las industrias requieren. En este contexto, la búsqueda de nuevas fuentes de almidón cobra relevancia.
La composición química y las propiedades físicas del almidón determinan su aptitud para el procesamiento y sus aplicaciones en la industria alimentaria (Burrell, 2003). El contenido de amilosa es una de las características que condiciona las propiedades funcionales del mismo, particularmente cuando se requiere una baja tendencia a la retrogradación.
El objetivo de este trabajo fue evaluar el comportamiento del cultivo de ahipa en la provincia de Misiones, caracterizar la composición química de las raíces obtenidas, analizar su conservación,

implementar un proceso para obtener su almidón a escala de laboratorio y evaluar las propiedades funcionales del mismo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los ensayos se realizaron a partir de raíces tuberosas de ahipa (*Pachyrhizus ahipa)* cultivadas en la Chacra Experimental Colonia Laharrage de la EEA INTA Montecarlo. Las mismas fueron cosechadas en el año 2007 y se remitieron al CIDCA (La Plata, Buenos Aires). Allí fueron acondicionadas (lavado con agua corriente, eliminación de restos de tierra, secado por oreo), envasadas para su almacenamiento a 4, 10 ó 25ºC o utilizadas como materia prima para la obtención de almidón.

Caracterización de las raíces

Se determinó inicialmente la composición química de las raíces, efectuando el análisis proximal de acuerdo con los métodos de referencia señalados por la AOAC (1990). Se investigó el contenido de materia seca, grasa y fibra crudas y cenizas totales. El contenido de nitrógeno total se analizó mediante el método Kjeldahl (AOAC, 1990) y éste se utilizó para calcular el de proteína bruta (N×6,25). Se determinó el contenido de sólidos solubles totales (ºBrix), mediante un refractómetro Abbe. Se evaluó también la producción de CO_2 de las raíces y para ello se empleó un Sensor de CO_2 Compuflow 8650 Indoor Air Quality Meter.

Color superficial y textura de raíces almacenadas. Al inicio y al final del almacenamiento se determinó el color en el corte transversal de las raíces (usando un colorímetro Minolta CR400) y la textura de las mismas. Se llevó a cabo el análisis del perfil de textura (TPA), utilizando un texturómetro TAXT2i Texture Analyzer (Stable Micro Systems Ltd), equipado con una celda de carga de 25 kg y una sonda (plato de compresión de aluminio) de 75 mm de diámetro. Se determinaron la dureza (fuerza máxima correspondiente al primer ciclo de compresión, en N), elasticidad (altura de la muestra detectada en la segunda compresión, dividida por la distancia original de compresión, mm/mm), cohesividad (relación entre el área del segundo y primer ciclo de compresión) y resiliencia (área durante la recuperación de la primera compresión dividida por el área de la primera compresión) (Andrés et al., 2006).

Asimismo, inspeccionando visualmente las muestras, se evaluó el desarrollo de microorganismos durante la conservación de las raíces, observando la manifestación de signos y síntomas.

Extracción del almidón

Se optimizaron las etapas de extracción del almidón a escala de laboratorio. Tal como se mencionó anteriormente, el proceso comenzó con la recepción de la materia prima y el lavado de las raíces, para eliminar restos de tierra. Con el fin de reducir la carga microbiana, se incorporó un tratamiento de lavado con solución de hipoclorito de sodio (250 ppm de cloro). Luego las raíces se pelaron y se procesaron en un rallador de disco rotatorio especialmente diseñado para este fin. La pasta de ahipa rallada se colocó en agua y se almacenó a 4°C durante 24 hs. Luego, la mezcla se filtró y se obtuvo el almidón en suspensión acuosa, denominado “lechada de almidón”. La suspensión se decantó a 4°C y se recuperó el material insoluble sedimentado constituido principalmente por almidón de ahipa, el que luego se secó a 40°C. Finalmente, el material seco se sometió a molienda. Para el cálculo del rendimiento de la extracción se realizó el balance de masas del proceso, lo que permitió calcular la relación entre los pesos de las raíces y del almidón extraído.

Propiedades funcionales del almidón de ahipa. Las propiedades térmicas de los almidones fueron determinadas por calorimetría diferencial de barrido (DSC) en un DSC Polymer Laboratorios (Rheometric Scientific Surrey, UK) equipado con un software PL-V5.41. Se utilizó un programa de calentamiento de 10ºC/min de 10 a 120ºC. Se analizaron suspensiones de almidón al 20 % p/p empleando una cápsula vacía como referencia. Se registraron los termogramas correspondientes (flujo de calor en función de la temperatura) y se determinaron la entalpía de gelatinización (ΔH), en mJ/mg de muestra seca, y las temperaturas de inicio (To) y de pico (Tp), en ºC, con el software mencionado. Los pesos secos de las muestras se obtuvieron en estufa a 105º C hasta peso constante. Las determinaciones se realizaron al menos por triplicado.

La retrogradación de las pastas de almidón se evaluó mediante ensayos de sinéresis, de análisis de perfil de textura (TPA) y de DSC de geles obtenidos a partir de suspensiones al 7% p/p, gelatinizadas a 90ºC durante 20 min y almacenadas refrigeradas (4ºC).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización y ensayos de almacenamiento de las raíces

Bajo las condiciones de los ensayos de campo implementados, *Pachyrhizus ahipa* se adaptó satisfactoriamente tanto a las condiciones agroecológicas como a las prácticas de cultivo implementadas (datos no mostrados), presentando rendimientos máximos de 20.839 kg ha^{-1}.

La composición química de las raíces de ahipa se muestra en la **Tabla 1**. Las mismas presentaron elevado contenido de humedad, similar al de la papa. Constituirían un alimento rico en glúcidos (almidón y azúcares simples), que aportan energía. El tenor de proteínas resultaría medio, pero superior al de otras raíces comestibles (Ej.: batata, mandioca).

Tabla 1. Composición química y producción de CO_2 de raíces de ahipa, en el inicio del almacenamiento.

Humedad (%)	Cenizas Totales (%)	Materia Grasa Bruta (%)	Fibra Bruta (%)	Proteína Bruta (%)	Compuestos libres de N (%)	Sólidos Solubles Totales (ºBrix)	Producción de CO_2 (mL kg^{-1} h^{-1})
81,9±5,0	3,7±0,6	1,5±0,5	13,3±6,1	6,5±0,7	58,5±8,5	8±0,4	12,3 ± 2,6

Los valores corresponden a los promedios ± la desviación estándar. Los contenidos de las distintas fracciones se encuentran expresados sobre base seca.

La actividad respiratoria de raíces de ahipa (**Tabla 1**) resultó comparable a la de batatas curadas, medida en este último caso a 15ºC.

En lo que respecta al almacenamiento, las raíces pudieron conservarse sólo durante un mes a 4 y 10ºC. Es factible que las bajas temperaturas ocasionaran considerable daño por frío, que se manifestó fundamentalmente en la alta incidencia de patógenos (**Figura 1**).

Figura 1. Raíces evidenciando síntomas y signos de ataque fúngico, durante el almacenamiento a bajas temperaturas (4 y 10ºC).

El almacenamiento a 25ºC, que se prolongó durante 5 meses, no ocasionó cambios significativos en el color interno (L* y Chroma) de las raíces.

Los atributos dureza, elasticidad, cohesividad y resiliencia, que permitieron caracterizar la textura, no mostraron cambios significativos durante el almacenamiento (**Tabla 2**).

Tabla 2. Color y textura de raíces de ahipa frescas, almacenadas un mes a 4 ó 10ºC, o cinco meses a 25ºC.

Muestra	Atributos de Color		Atributos de Textura			
	L* (luminosidad)	Chroma (saturación)	Dureza (N)	Elasticidad	Cohesividad	Resiliencia
Inicial	80,7±4,5	7,7±3,7	135,4±22,4	0,79±0,06	0,45±0,24	0,53±0,28
5 meses a 25ºC	82,8±2,6	11,6±1,1	147,0±22,6	0,72±0,08	0,58±0,18	0,42±0,19
1 mes a 4ºC	83,0±2,7	11,3±1,7	121,8±30,5	0,69±0,11	0,61±0,16	0,48±0,13
1 mes a 10ºC	76,5±7,3	12,6±6,2	149,8±26,7	0,77±0,24	0,40±0,23	0,46±0,22

Los valores corresponden a los promedios ± la desviación estándar.

Extracción y rendimiento de almidón

En la **Figura 2** se muestra un esquema del proceso de extracción del almidón de ahipa a partir de sus raíces tuberosas. Durante el proceso de extracción del almidón se optimizó el volumen de agua a utilizar así como también el número de veces que debía repetirse la operación de obtención de lechadas de almidón y su posterior sedimentación. Además, el lavado con agua clorada de las raíces y la elección de una temperatura baja (4°C) de almacenamiento, tanto de la pulpa como de la lechada de almidón, resultaron determinantes para evitar, principalmente, la proliferación de hongos. Se evaluó además la necesidad de incorporar una etapa de centrifugación de las suspensiones de almidón. Los resultados obtenidos indicaron que la misma resultó innecesaria ya que la decantación de las lechadas era suficiente para recuperar el almidón extraído.

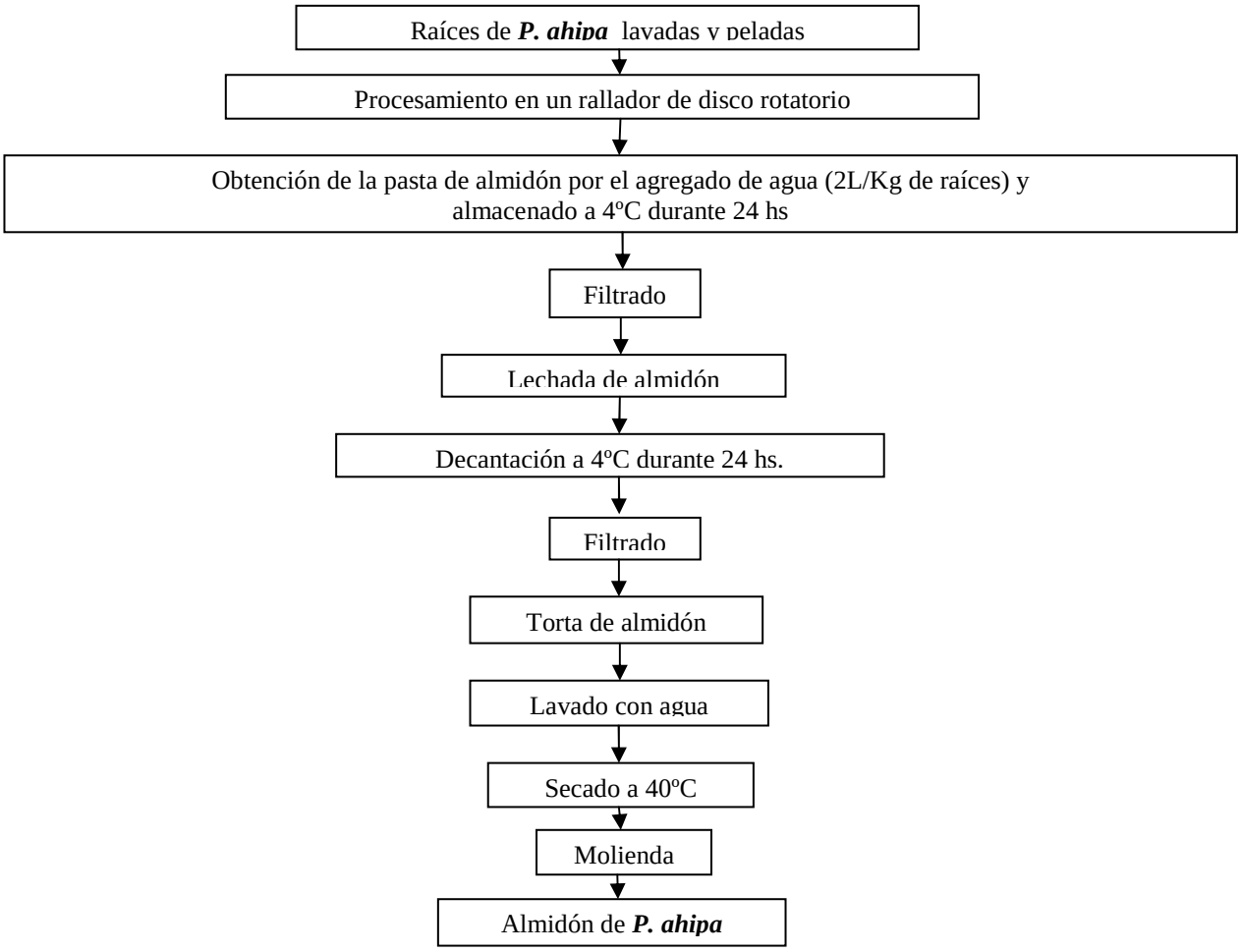


Figura 2. Esquema del proceso de extracción del almidón a partir de las raíces tuberosas de *P. ahipa*.

El proceso optimizado permitió obtener un rendimiento de la extracción de almidón de raíces de ahipa de 56,54 g de almidón / 100 g de materia seca. Este resultado es comparable con el rendimiento de otros tubérculos y raíces andinas como *Mirabilis expansa* "miso" y *Oxalis tuberosa* "oca" (Espín et al., 2004). No se detectó nitrógeno total por Kjeldahl en el producto obtenido, lo que demuestra la eficiencia del proceso de extracción.

Propiedades funcionales del almidón de ahipa

En la **Tabla 3** se muestran las propiedades térmicas del almidón extraído. Los valores de entalpía obtenidos son similares a los reportados para la gelatinización de almidón de otras especies, como por ejemplo para el almidón de maíz. Las temperaturas de gelatinización halladas resultaron similares a las temperaturas de gelatinización del almidón de papa y mandioca (Hung *et al*., 2005).

Tabla 3. Temperaturas de transición (onset: T_o), de pico (T_p) y entalpía de gelatinización ($\Delta H_{gelat.}$) de almidón de ahipa

Almidón extraído de raíces de ahipa	T_o (ºC)	T_p (ºC)	$\Delta H_{gelat.}$ (mJ/mg)
	64.25±0.20	67.18±0.07	9.53±0.20

Una de las características diferenciales del almidón de ahipa es su bajo contenido de amilosa. Forsyth *et al*. (2002) reportaron contenidos de amilosa para almidón de *P. ahipa* de hasta 16,8 %; lo que indicaría que las pastas de este almidón serían estables y con una baja tendencia a la retrogradación.
Las pastas de almidón de ahipa se almacenaron a 4º C durante 11 días, ya que a partir de ese momento presentaron deterioro microbiano. Durante este tiempo no se observó en los ensayos de DSC el pico endotérmico característico de retrogradación de amilopectina.
Los niveles de exudado (% de sinéresis) alcanzados resultaron muy bajos, siendo 0,20%. A partir de los ensayos de TPA realizados en el texturómetro se observó que la dureza de los geles de ahipa permaneció constante durante el tiempo de almacenamiento ensayado (**Figura 3**).

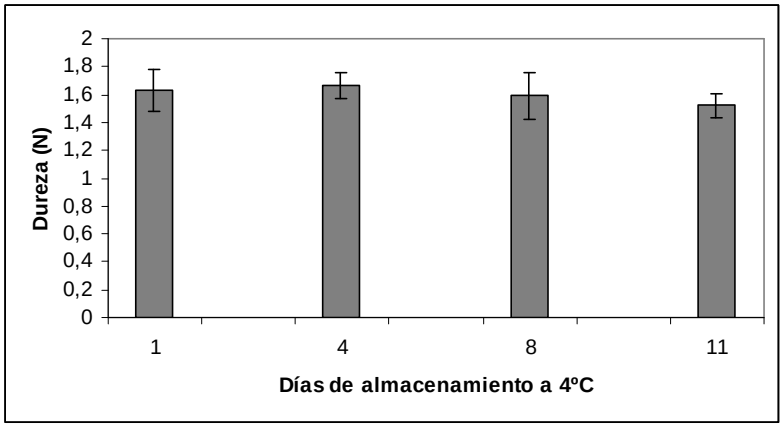


Figura 3. Dureza de geles de almidón de ahipa en función del tiempo de almacenamiento a 4ºC.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos indican que es posible adaptar el cultivo de ahipa a las condiciones agroecológicas de Misiones, admitiendo la implementación de prácticas culturales habituales en la región.
El uso de la conservación refrigerada para raíces de ahipa se vio limitado por el desarrollo de daño por frío. Este desorden fisiológico fue acompañado por el ataque de hongos. Por lo tanto, dentro de las alternativas ensayadas, la conservación a 25ºC mostró ser la más adecuada. Luego de 5 meses de almacenamiento a dicha temperatura, las raíces mantuvieron sus atributos de color y textura.
Por otra parte, fue posible diseñar un proceso de extracción simple que permitió obtener el almidón de las raíces tuberosas con un rendimiento aceptable. El almidón de ahipa gelatinizó a temperaturas relativamente bajas y las pastas obtenidas a partir del mismo resultaron estables durante su

almacenamiento en condiciones de refrigeración. Así este almidón resulta una alternativa viable a los almidones tradicionales utilizados como agentes espesantes.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado a través del proyecto CONICET–Monsanto Argentina "Raíces y tubérculos nativos: producción, conservación y aplicaciones industriales basadas en la caracterización de propiedades fisicoquímicas, reológicas y microestructurales del almidón de ahipa (*Pachyrhizus ahipa*)" que recibió el 3º Premio en su edición 2006 "Animarse a emprender".
Nuestro agradecimiento al Laboratorio de Fitoquímica (FCAyF UNLP), por las determinaciones de humedad, cenizas totales, materia grasa, fibra bruta, proteína bruta y compuestos libres de nitrógeno.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amaya Robles, J. E., Julca Hashimoto, J. L. 2006 "Ajipa" *Pachyrhyzus ahipa* (Weddell.) Parodi. Área Temática: Biodiversidad y Conservación de los Recursos Fitogenéticos Andinos. Gerencia Regional de Recursos Naturales y Conservación del Medio Ambiente. Gobierno Regional La Libertad. Trujillo. Perú.

Andrés S. C., García, M. E., Zaritzky, N. E., Califano, A. N. 2006. Storage stability of low-fat chicken sausages. J Food Eng. 72, 311–319

Burrell, M. M. 2003. Starch: the need for improved quality or quantity –an overview. J Exp Bot. 54 (382), 451-456.

Espín, S., Villacrés, E., Brito, B. 2004. Capítulo IV: Caracterización físico-química, nutricional y funcional de raíces y tubérculos andinos. In: V. Barrera, C. Tapia & A. Monteros (eds.). Raíces y Tubérculos Andinos: Alternativas para la Conservación y Uso Sostenible en el Ecuador. INAIA, IPC, COSUDE, Quito-Lima. Pp 91-116.

Forsyth, J. L., Ring, S. G., Noel, T. R., Parker, R., Cairns, P., Findlay, K., Shewry, P. R. 2002. Characterization of Starch from Tubers of Yam Bean (*Pachyrhizus ahipa*). J. Agric. Food Chem. 50, 361-367.

Hung, P. V, Morita, N. (2005) Physicochemical properties and enzymatic digestibility of starch from edible canna (*Canna edulis*) grown in Vietnam. Carbohydrate Polymers 61, 314-321.

Piyachomkwan, K., Chotineeranat, S., Kijkhunasatian, C., Tonwitowat, R., Prammanee, S., Oates, C. G., Sriroth, K. 2002. Edible canna (Canna edulis) as a complementary starch source to cassava for the starch industry. Industrial Crops and Products. 16, 11–21.

Diseño de un modelo referencial integrado para la gestión de la inocuidad en la producción de carne de conejo.

A reference model design for assurance steps in rabbit meat production

Marín MA y Faillaci SM

Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Centro de Vinculación BIOGESTION- FCEFyN UNCórdoba. Av. V. Sarsfield 1600. CP 5016.
Córdoba–Argentina. ma.andrea.marin@gmail.com

RESUMEN

La gestión de la inocuidad es un requisito imperativo en cualquier industria o explotación agroalimentaria y en los últimos años se ha convertido en preocupación creciente de todos los actores que intervienen en la cadena de valor, desde la producción primaria de los alimentos hasta su consumo. El cumplimiento con los requisitos reglamentarios y las renovadas exigencias de los consumidores aceleraron el desarrollo y la aplicación de sistemas de gestión que pudieran garantizar el origen, a través de controles estrictos en todas las etapas de la producción, transformación, transporte y comercialización. En Argentina, la producción, transformación y consumo de carne de conejo se realiza en un contexto de clara separación física, geográfica y económica. Esta dispersión alcanza a la producción primaria (granjas cunícolas); al sector transformador compuesto por frigoríficos habilitados para faena según los requisitos reglamentarios y a un mercado interno poco desarrollado, a lo que debe sumarse el escaso soporte jurídico específico a nivel nacional para animales pequeños que establezca reglamentaciones inherentes a la calidad e inocuidad de los alimentos obtenidos. Considerando lo expuesto, los objetivos del trabajo fueron: i- Definir la cadena alimentaria para la producción de carne de conejo, identificando los actores y su participación en la gestión de la inocuidad. ii- Diseñar un modelo integral para la gestión de la inocuidad para la producción de carne de conejo aplicable a cada eslabón de la cadena. iii- Desarrollar una herramienta para la auditoria y seguimiento de la gestión de la inocuidad. Se llevó a cabo una investigación bibliográfica de la situación actual de productores de animales, establecimientos de faena, distribuidores, puntos de venta, mercado y normativa vinculada para evaluar cómo se desempeñan en relación a la implementación de sistemas integrados de inocuidad los distintos actores. El análisis se complementó con el relevamiento de granjas productoras y frigoríficos regionales. Se identificaron los procesos, se definieron estrategias para su interrelación y se elaboró un modelo referencial integrado para la gestión de la inocuidad así como una ficha de control y seguimiento para realizar auditorias para establecer el grado de cumplimiento de cada eslabón en particular y de toda la cadena de valor del producto. Esta propuesta de modelo referencial integrado para la gestión de la inocuidad tiene la finalidad de sensibilizar y fomentar entre los productores de carne de conejo, la aplicación y seguimiento de sistemas de reducción de riesgos de contaminación física, química o microbiológica a fin de lograr un alimento inocuo, a la vez que motiven la ampliación del mercado nacional y de exportación, y se espera pueda ser extrapolado a otras cadenas de producción de carne de animales pequeños con características similares.

ABSTRACT

Safety management is an imperative requirement in any farm or agro-food industry and in recent years has become a growing concern for all actors in the value chain from primary production of food to its consumption. Regulatory requirements and renewed consumer demands accelerated the development and implementation of management systems that could guarantee the origin, through strict controls at all stages of production, processing, transportation and marketing. In Argentina, production, processing and consumption of rabbit meat is done in a clear physical, geographic and economic separation. This dispersion reaches the primary production (rabbit keeping and rearing), the processing sector which includes processing establishments (Slaughterhouses and Carving-up establishments) authorized according to regulatory requirements and an underdeveloped domestic market, to which should be added the low specific national legal support to establish small animals regulations related to

the quality and safety of foods derived. Considering the above, the objectives of the study were: i- Define the food chain for the production of rabbit meat by identifying actors and their involvement in safety management. ii- Design a model for safety management for the production of rabbit meat to be applied to each link in the chain. iii- Develop a tool to audit and monitor safety management. A bibliographical investigation of the animals producers' current situation, slaughter facilities, distributors, points of sale, market and regulation linked was done to evaluate how the different actors managed themselves in relation to the implementation of integrated safety systems. The analysis was complemented by a survey of farms producers and processing establishments in the region. Processes were identified, strategies for its interface were defined and a reference model for integrated safety management was developed, and also so a check and monitoring list to perform audits to establish the degree of fulfillment of each bond in particular and the entire product value chain. The proposed reference integrated model for safety management intends to make aware and encourage rabbit-meat producers to put into operation and monitor systems to reduce risks of physical, chemical or microbiological contamination in order to achieve food harmless, while motivating the opening out of the domestic market and export, and it is expected to be extrapolated to other chains of production of meat of small animals with similar characteristics.

PALABRAS CLAVE: *gestión, inocuidad, carne de conejo, modelo referencial integrado.*

KEYWORDS: *management, safety, rabbit meat, integrated reference model.*

INTRODUCCIÓN

Las crisis sanitarias de los últimos tiempos, relacionadas con los alimentos, han puesto en evidencia la complejidad del proceso de producción de los mismos y la necesidad de abordar la inocuidad alimentaria con un planteamiento global que involucre a toda la cadena, desde la producción primaria hasta el suministro a los consumidores finales, con un único objetivo: La protección de la salud de la población (FAO, 2003). Esto exige que las autoridades responsables, así como todos lo actores de la cadena alimentaria pongan en práctica medidas destinadas a reforzar, mejorar y proteger el desarrollo de los sistemas de evaluación y de gestión de los riesgos para la salud vinculados a las materias primas, las prácticas agrícolas y ganaderas, y las actividades de procesamiento y distribución de alimentos.

En este sentido el Acuerdo de la Organización Mundial del Comercio (OMC) sobre la Aplicación de Medidas Sanitarias y Fitosanitarias y el Acuerdo sobre Obstáculos Técnicos al Comercio (OTC) proporcionan el marco normativo global para el comercio internacional de alimentos y productos agrícolas y contribuyen a la gestión de la inocuidad.

La gestión de la inocuidad es en la actualidad un requisito imperativo en cualquier industria o explotación agroalimentaria y exige el compromiso de todos los operadores económicos que intervienen en la cadena de valor, desde la producción de los alimentos hasta su consumo.

La globalización obliga al sector agropecuario nacional a desarrollar estrategias y modelos que permitan incrementar las posibilidades de permanencia y competitividad de los agro negocios. Es aquí donde la implementación de sistemas de gestión de la inocuidad se transforma en un elemento diferenciador y en los últimos años se ha convertido incluso en una herramienta estratégica para el posicionamiento competitivo.

Por otra parte, se observa que los consumidores están modificando sus patrones de consumo y requieren algo más que productos frescos y naturales; exigen que los alimentos sean inocuos para la salud, que los procesos productivos sean limpios y seguros, que protejan el medio ambiente y que respeten los derechos de los trabajadores.

De esta forma se advierte que el cumplimiento con los requisitos reglamentarios y las renovadas exigencias de los consumidores aceleraron el desarrollo y la aplicación de sistemas de gestión que pudieran garantizar el origen, a través de controles estrictos en todas las etapas de la producción, transformación, transporte y comercialización.

En Argentina, la producción y transformación de carne de conejo se realiza en un contexto de clara separación física, geográfica y económica. Las granjas cunícolas por un lado, como eje de una economía familiar o local, cuyo principal obstáculo productivo es el precio del alimento balanceado y los frigoríficos habilitados para faena según los requisitos reglamentarios por el otro, en la mayoría de

los casos, alejados de las granjas y en el caso de los habilitados para exportación, distribuidos principalmente en la provincia de Buenos Aires (SAGPyA, 2008). A esto se suma, un mercado interno poco desarrollado, un mercado externo fluctuante, y el escaso soporte jurídico específico a nivel nacional para animales pequeños que establezca reglamentaciones inherentes a la calidad e inocuidad de los alimentos obtenidos.

Los objetivos del presente trabajo fueron:

- Definir la cadena alimentaria para la producción de carne de conejo, identificando los actores y su participación en la gestión de la inocuidad.
- Diseñar un modelo integral para la gestión de la inocuidad para la producción de carne de conejo aplicable a cada eslabón de la cadena.
- Desarrollar una herramienta para la auditoria y seguimiento de la gestión de la inocuidad

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el desarrollo del presente trabajo se llevó adelante una investigación bibliográfica de la situación actual de los distintos actores involucrados, productores de animales, establecimientos de faena, distribuidores, puntos de venta y mercado interno y externo.

Así mismo se estudiaron las exigencias legales para cada eslabón tanto en Argentina como para la exportación a la Comunidad Europea, principal mercado para la carne de conejo producida en el pais (SAGPyA, 2009).

El marco legal argentino se encuentra contemplado en el Código Alimentario Argentino, Ley N° 18284/69, Decreto N° 2126/71, en el Decreto PEN N° 815/99 (Establecimiento del Sistema Nacional de Control Alimentario) y Decreto N° 4238/68 SENASA (Reglamento de Inspección de los establecimientos con habilitación nacional dedicados a elaborar productos, subproductos y derivados de origen animal) y la Resolución N° 233/98 incorporada al mismo, así como los requisitos propios del sector contemplados en la Ley de Cunicultura N° 23.634 y su Decreto Reglamentario N° 881/98 y la Resolución N° 618/2002 (Medidas de bioseguridad e higiene a las que deberán ajustarse todos los establecimientos de producción cunícola, destinados a la reproducción y/o engorde de conejos para consumo humano. Requisitos para la habilitación. Condiciones generales y operativas. Instalaciones).

La legislación europea en relación a la seguridad alimentaria se resume en los Reglamentos (CE) Nº 178/2002 (Principios y requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria)**,** Nº 852/2004 (Higiene de los productos alimenticios), Nº 853/2004 (Normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal), Nº 2377/90 (Límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal) y Nº 1935/04 (Requisitos sobre los materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimento).

Finalmente se las relacionó con el marco normativo internacional vigente vinculado considerado en el CÓDIGO DE PRÁCTICAS SOBRE BUENA ALIMENTACIÓN ANIMAL del Codex *CAC/RCP 54-2004*; el CÓDIGO DE PRÁCTICAS DE HIGIENE PARA LA CARNE del Codex *CAC/RCP 58/2005***,** la ISO 22000:2005 "Sistemas de gestión de la inocuidad de los alimentos-Requisitos para cualquier organización en la cadena alimentaria" y la ISO 22005:2007 "Trazabilidad en la cadena alimentaria-Principios generales y requisitos básicos para el diseño y la implementación del sistema", para poder evaluar cómo se desempeñan cada uno de los eslabones en relación a los requisitos de inocuidad y al desarrollo e implementación de sistemas integrados de inocuidad.

Los datos recabados se complementaron con el relevamiento y auditoria de granjas productoras y frigoríficos regionales para completar el análisis.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Debido a la dispersión organizacional y operativa (granjas cunícolas y frigoríficos) en la producción de carne de conejo para consumo humano, como primer paso se definió la cadena alimentaria para poder estudiar cada eslabón en particular, identificar los procesos, sus interrelaciones, el flujo del producto y el flujo de información. Luego se relevaron las operaciones vinculadas a cada eslabón.

Posteriormente, se analizaron los requisitos reglamentarios y normativos propios de cada eslabón, se definieron estrategias para su interrelación y se elaboró un modelo referencial integrado para la gestión de la inocuidad.

Producción primaria

Granja cunicola. En Argentina, los establecimientos destinados a la cría de conejos para la producción de carne para consumo humano de tráfico nacional e internacional deben solicitar habilitación al Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, SENASA, y deben cumplir con los requisitos establecidos en la Resolución 618/2002. Con ello pasan a formar parte del "Registro Nacional de Establecimientos Habilitados para Productores de Conejos" y demuestran frente a la autoridad sanitaria el cumplimiento de Buenas Prácticas de Crianza**.**

En cuanto a los requisitos de la Comunidad Europea los más importantes son: el Reglamento (CE) Nº 178/2002 que en particular en el artículo 18 introduce la exigencia de la demostración de la trazabilidad en la cadena alimentaria, el Reglamento (CE) Nº 852/2004 relativo a la higiene de los productos alimenticios que en el Anexo 1 hace referencia a la producción primaria y operaciones conexas y el REGLAMENTO (CE) Nº 2377/90 por el que se establecen límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal.

Los requisitos de información de entrada para insumos y materias primas adquiridas tienen relación con la identificación de los proveedores de los mismos, el control de lotes y fechas de compra y en el caso de los animales, con el cumplimiento de las disposiciones legales relacionadas con su traslado. Los piensos, medicamentos, vacunas y complementos nutricionales, ya se adquieren rotulados de acuerdo a la legislación, y los números de identificación deben registrarse en las fichas de control. (Marín *et al*, 2007)**.**

Transporte. Los requisitos para el traslado de conejos vivos con destino a faena u otro destino también se encuentran definidos en la Resolución 618/02 la que obliga al productor o responsable del establecimiento a tramitar el Documento para el Tránsito de Animales (DTA) y responsabiliza al transportista por dicho documento en las rutas. Los animales, a su vez, deben estar identificados mediante algún sistema que permita referirlos al establecimiento del cual provienen y esa información debe estar detallada en el DTA. Este documento, particularmente, contribuye a la trazabilidad y a la interrelación de los dos lugares, dentro de la cadena de valor, donde se realizan los procesos de transformación ya que vincula la producción primaria con el frigorífico destinado a la faena (**Figura 1**).

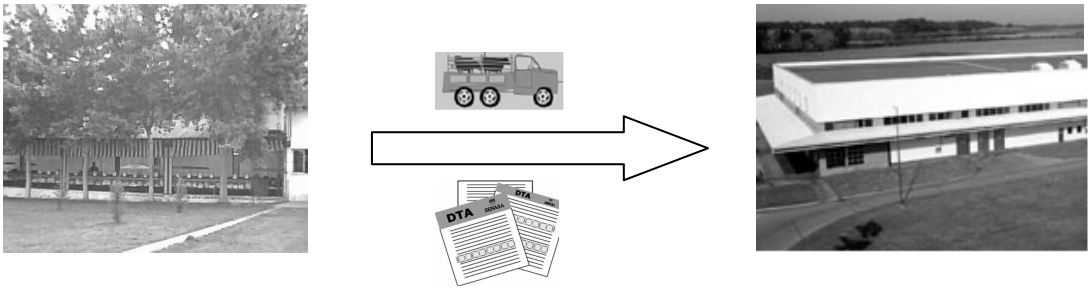


Figura 1. Relación y comunicación granja-frigorífico

Transformación-frigorífico

Para que un frigorífico alcance tráfico nacional debe demostrar cumplimiento con las condiciones generales que se especifican en el Capítulo II del Código Alimentario Argentino (Ley Nº 18284/69, Decreto Nº 2126/71) y en lo particular con el Decreto N° 4238/68, "Reglamento de inspección de productos, subproductos y derivados de origen animal" y con la Resolución Nº 233/98 del SENASA Capitulo XXXI, que obliga a las plantas frigoríficas que se habilitan para carnes de conejos domésticos procesada a aplicar un estricto control de Buenas Prácticas de Fabricación (BPF) y Procedimientos Operativos estandarizados (POES).

La comercialización de la carne de conejo es en cortes y pieza entera y se presentan individualmente por rubros en envases primarios de polietileno y en unidades de cartón. Las unidades van etiquetadas según el Capítulo V del Código Alimentario Argentino, que establece las Normas para la Rotulación y Publicidad de los Alimentos.

Tanto el Capitulo II como el V del CAA corresponden a la incorporación de los Reglamentos Técnicos MERCOSUR Resolución Nº 80/96 y Resolución Nº 31/06 respectivamente.

En cuanto a los requisitos específicos para la exportación, debe atenderse adicionalmente el Reglamento (CE) Nº 853/2004 que establece normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal y el Reglamento (CE) Nº 1935/04 que establece los requisitos sobre los materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimento.

Distribución

El Capitulo VI del Código Alimentario Argentino**,** referido a Alimentos cárneos y afines, define el concepto de carne (Artículo 247) y carne fresca (Artículo 248) y los requisitos que las mismas deben cumplir, así como los requisitos para el transporte de carnes frescas de consumo (Artículo 259). A su vez, la Resolución Conjunta Nº 40/03 y 344/03 de la Secretaria de Políticas, Regulación y Relaciones Sanitarias y la Secretaria d Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos incorpora el artículo 154 bis al Código Alimentario Argentino, en el que se definen las condiciones generales que debe reunir el transporte de sustancias alimenticias y precisa las responsabilidades de las personas involucradas en esa actividad.

Los datos comerciales, sanitarios como de trazabilidad de cada unidad que constituye un lote de producto terminado, se encuentran registrados en la etiqueta-rótulo del pack primario, según legislación vigente tanto en el país de origen como las exigidas en el país de destino. Para la exportación debe realizarse también el encajado de las unidades. Las cajas deben estar etiquetadas individualmente con rótulos que contengan los datos comerciales, sanitarios como de trazabilidad. (Marín *et al*, 2007).

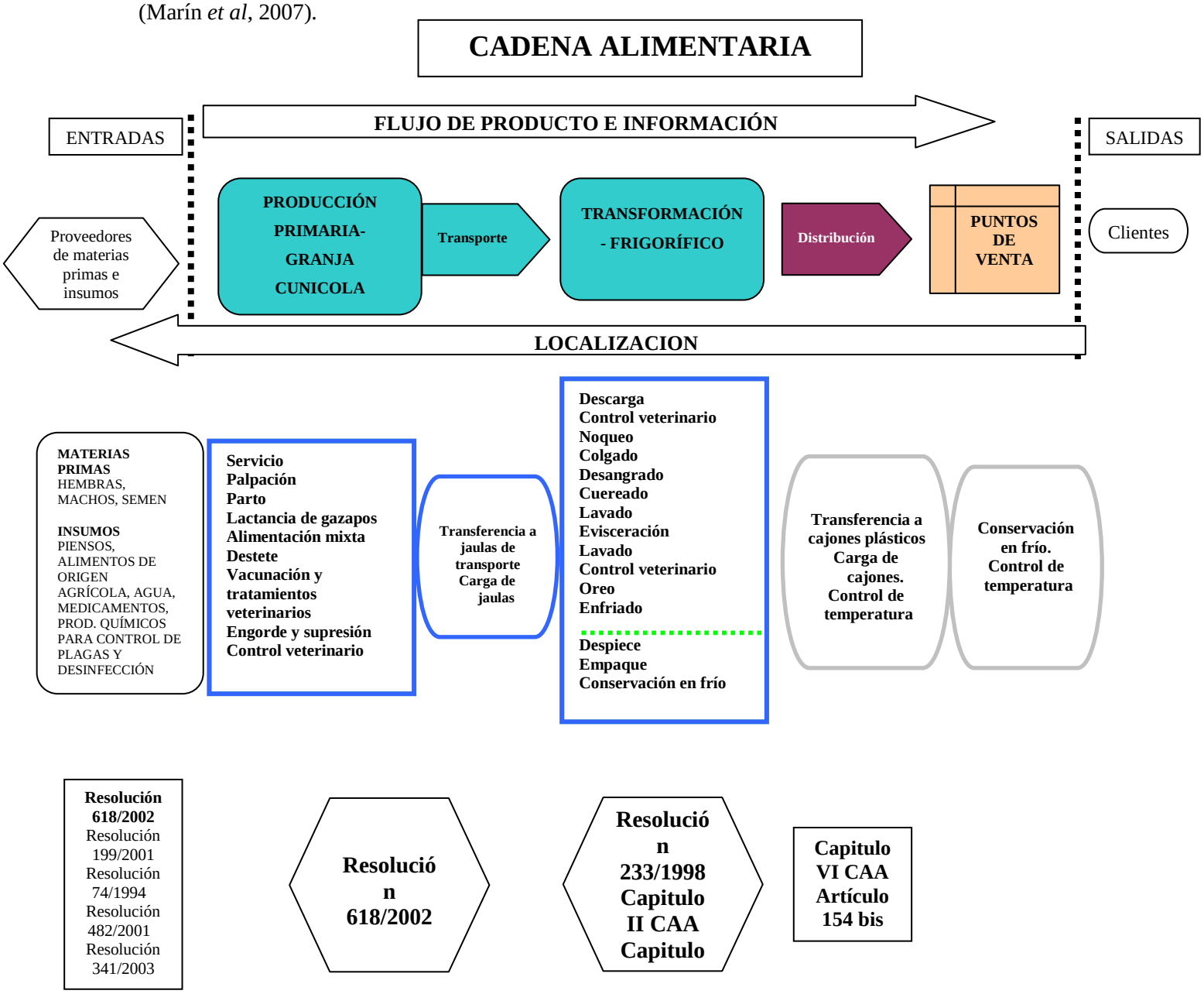


Figura 2. Cadena de valor para la producción de carne de conejo: actores que intervienen en la gestión de

Integrando lo anteriormente expuesto, la cadena alimentaria, contemplando las operaciones propias de cada eslabón y considerando los requisitos reglamentarios, quedó definida de acuerdo a lo representado en la **Figura 2**.

Para el diseño del modelo documental integrado para la gestión de la inocuidad y la trazabilidad se contemplaron los requisitos legales y normativos resumidos en la **Tabla 1**, considerando una lógica de integración basada en la identificación de los comunes denominadores de gestión de la inocuidad tomando como referencia los capítulos de la ISO 22000:2005 y dado el alcance abarcativo del concepto de trazabilidad según ISO 22005:2007 integrados gráficamente de acuerdo a lo señalado en la **Figura 3** y representado en la **Figura 4**. Un modelo documental integrado para las medidas de control de la inocuidad exigidas en el capitulo 7 de la ISO 22000 se expone en la **Tabla 2**.

Tabla 1. Comparación entre requisitos reglamentarios y normativos

REQUISITOS NORMATIVOS		**LEGISLACIÓN ARGENTINA**	**LEGISLACIÓN EUROPEA**
BPA- GLOBALGAP		----------	REG. 178/02
BPC	***CAC/RCP 54/2004 CAC/RCP 58/2005***	Res. 618/02 (Res. 199/01,74/94, 482/01, 341/03)	REG. 852/04 Anexo 1
BPV			
BPM		Res. 233/98 Capitulo XXXI, Capitulo II CAA	REG. 852/04 Anexo 2
POES		Res. 233/98 Capitulo XXXI, Capitulo II CAA	REG. 852/04 Anexo 1 y 2
MIP		Capitulo II CAA	REG. 852/04 Anexo 1
HACCP		Capitulo II CAA Art. 18 bis	REG. 852/04 Cap. II Art. 5
TRAZABILIDAD-ISO 22005:2007		----------	REG. 178/02 Art. 18 REG. 853/04 Anexo 2 Sección 1
GESTIÓN DE LA INOCUIDAD-ISO 22000:2005		----------	----------

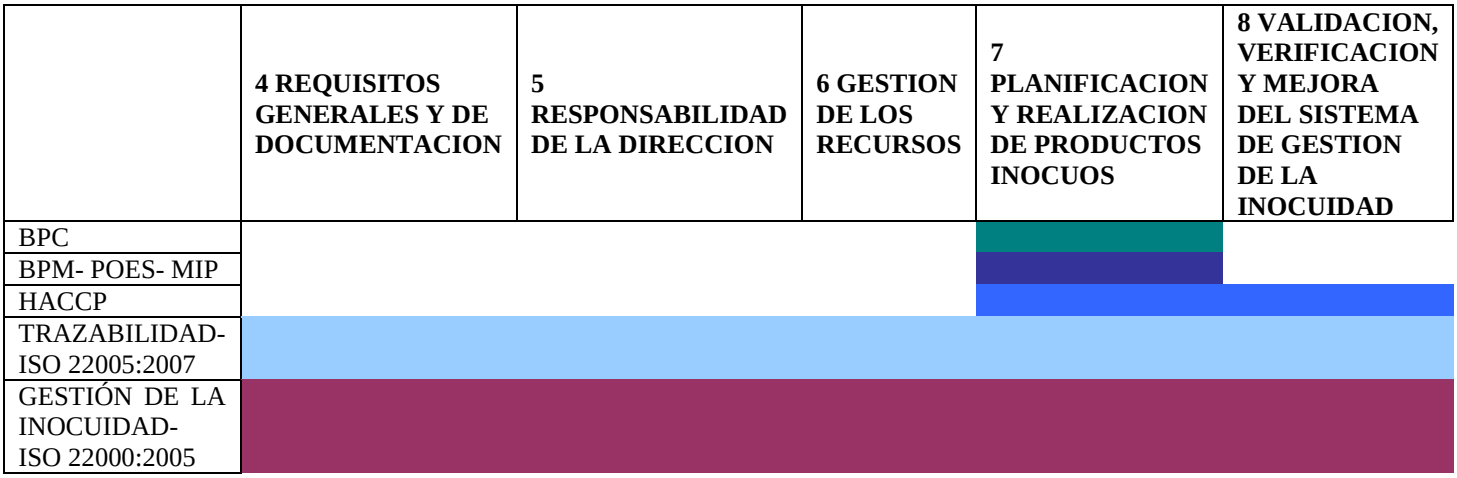


Figura 3. Esquema de integración basada en la identificación de los comunes denominadores de gestión de la inocuidad.

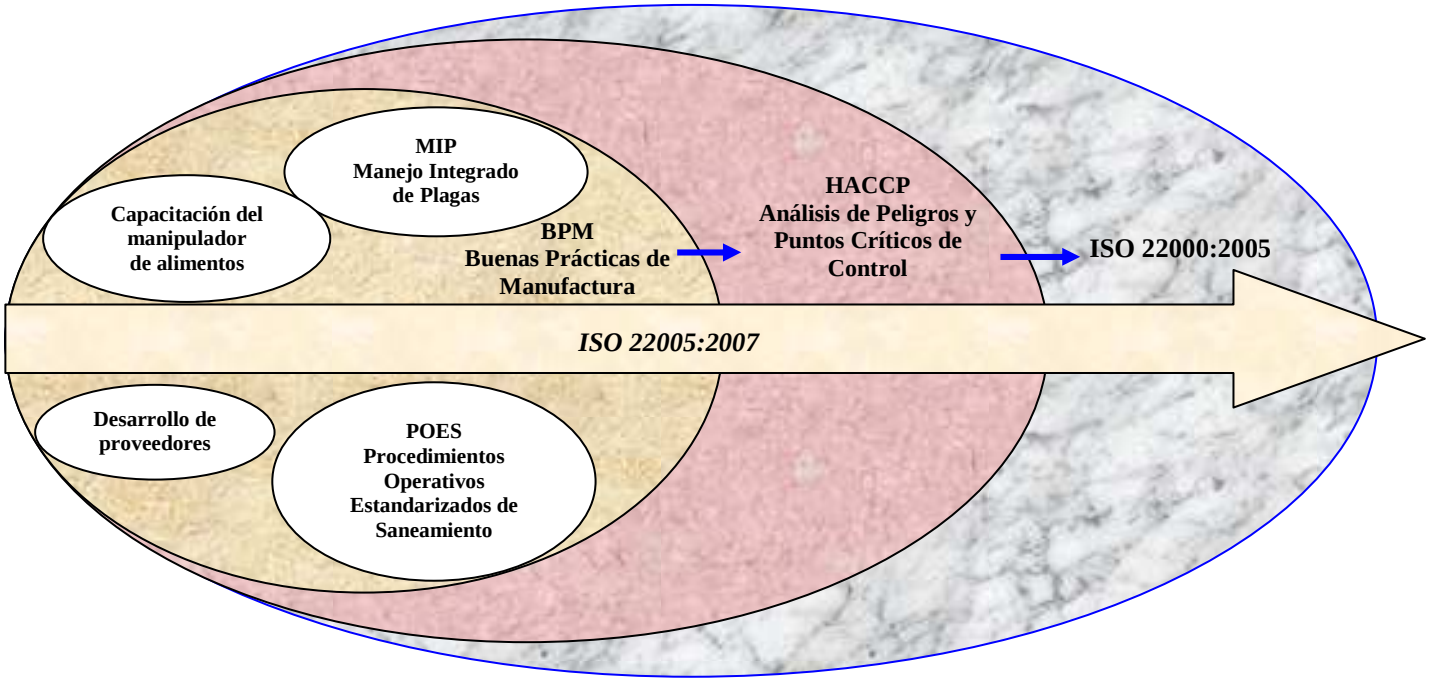


Figura 4. Integración de sistemas de gestión de la inocuidad

Tabla 2. Medidas de control de la inocuidad

Recepción de MP e insumos	PPR	PPR operacionales
Hembras y machos	BPV	Control de recepción (DTA)
Semen	BPV	Control de T, datos legales
Piensos	BPM	Control de albarán
Alimentos de origen agrícola	BPA	Control de albarán
Agua	BPM	Control microbiológico
Medicamentos	BPM	Control de T, datos legales
Prod. químicos para control de plagas y desinfección	BPM	Control de datos legales, ficha de seguridad.

Operaciones en Granja	PPR				PPR operacionales
Servicio	BPV				
Palpación	BPV				
Parto	BPV				
Lactancia de gazapos	BPC				
Alimentación mixta	BPC	**P O E S**	**M I P**	**G E S T I Ó N D E R E S I D U O S**	Control de Alimentos Balanceados. Control del agua.
Destete	BPC				
Vacunación y tratamientos veterinarios	BPV				Control de T de almacenamiento. Control de administración de vacunas y medicamentos.
Engorde y supresión	BPC-BPV				Control de retiro de medicamentos
Control veterinario	BPV				Control ante-morten

Operaciones de transporte	PPR			PPR operacionales
Transferencia a jaulas de transporte	BPM	**P O E S**	**M I P**	Control de limpieza de jaulas. Control de densidad de animales.
Carga de jaulas	BPM			Control de estibado de jaulas.

Operaciones en Frigorífico	PPR				PPR operacionales
Descarga	BPM	**P O E S**	**M I P**	**G E S T I Ó N D E R E S I D U O S**	
Control veterinario	BPV				Control ante-morten
Noqueo	BPM				
Colgado	BPM				
Desangrado	BPM				
Cuereado	BPM				
Lavado	BPM				
Evisceración	BPM				Control de evisceración
Lavado	BPM				
Control veterinario	BPV				Control post-morten de vísceras y canal
Oreo	BPM				Control de t de oreo
Enfriado	BPM				Control de t de permanencia y T de cámara
Despiece	BPM				Control de T de sala
Empaque	BPM				
Conservación en frío	BPM				Control de T de cámara

Operación de distribución	PPR		PPR Operacionales
Transferencia a cajones plásticos	BPM	**P O E S**	Control de limpieza de cajones
Carga de cajones	BPM		Control de estibado de cajones
Control de temperatura	BPM		Control de T de transporte

Operaciones en puntos de ventas	PPR	PPR Operacional
Conservación en frío.	BPM	Control de T de heladeras
Control de temperatura	BPM	Control de T de producto

Para cumplimentar tanto los requisitos legales como con los normativos el establecimiento está obligado a presentar evidencias a través de un sistema documentado de calidad e inocuidad que cumpla como mínimo con los siguientes requisitos:
- Identificación y trazabilidad.
- Productos y procesos inocuos: higiene en la elaboración. Procedimientos de ensayos.
- Higiene del establecimiento y del personal.
- Especificaciones de producto.
- Manejo integrado de plagas.
- Criterios de calidad. Parámetros para la liberación del producto.

- Acciones correctivas y preventivas.
- Gestión de crisis. Planes de contingencia.
- Especificaciones del sistema y las relaciones con los proveedores.
- Tratamiento de los residuos.
- Documentación y registros

De esta manera se arribó al modelo referencial integrado para la gestión de la inocuidad en la producción de carne de conejo para establecer el grado de cumplimiento de cada eslabón en particular y de toda la cadena de valor del producto en concordancia con los requisitos legales y normativos del mercado interno y de exportación se describe en la **tabla 3**.

Tabla 3. Herramienta para la auditoria y seguimiento de la gestión de la inocuidad

	REQUISITOS	**DOCUMENTACIÓN ESTANDAR**	**EVIDENCIA DOCUMENTAL**	**C/NC**	**Observaciones**
Identificación y trazabilidad.	Flujo del producto	Requisitos en relación al flujo de producto y la identificación	Base de datos, registros, flujograma		
	Rotulado	Requisitos en relación al flujo de producto y identificación	Certificados de las materias primas e insumos(remitos, inspección de ingreso) y certificados de productos de salida		
	Aseguramiento de Origen	Especificaciones	Registro de recepción de MP, Auditorias de trazabilidad		
	Definición de lotes	Tamaño, vencimiento	Identificación de los lotes, Certificados de las materias primas e insumos(remitos, inspección de ingreso) y certificados de productos de salida		
Especificaciones y relación con los proveedores	Especificaciones	Especificaciones del cliente, especificaciones del producto final	Idem		
	Compras	Habilitación del proveedor	Contratos, evaluación de proveedores		
	Empaque	Especificaciones	Análisis de resultados		
Inocuidad del producto y del proceso	Materias primas	Procedimientos e instructivos de trabajo	Registros de recepción de MP		
	Ensayos de productos intermedio y final	Procedimientos de ensayos	Resultados de los ensayos, evidencia documental (certificados de calibraciones, etc)		
	Control de temperatura	Equipos para el control de temperatura, alarmas	Registros de temperatura		
	Áreas	Separación de áreas limpias y sucias	Planos de la planta y flujo de MP y personal		
	Proceso	Procedimientos e instructivos de trabajo	Registros de producción		
	Producto final	Procedimientos e instructivos de trabajo	Registro de expedición		
	Transporte	Contratos, instrucciones	Registro de expedición		
Higiene del establecimiento y del personal	Limpieza y desinfección	Hoja de seguridad de productos, procedimientos e instructivos de trabajo, plan de limpieza y	Registros de saneamiento, ensayos microbiológicos		

		desinfección			
	Manipulación y almacenamiento de productos	Procedimientos e instructivos de trabajo	Registros de temperatura, registros de entrada y salida		
	Personal	Carnet sanitario, Procedimientos e instructivos de trabajo	Registros de capacitación		
Manejo integrado de plagas		Contratos con empresas desinfectantes, MIP.	Plan de prevención de plagas, Plano de trampas		
Especificaciones de producto.	Rotulado	Lista de ingredientes, especificaciones	Registro de análisis de composición		
	Alérgenos/OGM	Especificacion de materia prima	Registro de análisis de composición		
Gestión de calidad.	Compromiso de la dirección	Política, objetivos	Política, objetivos, registro de revisión por la dirección		
	Medidas de mejora	Sistema de gestión de la calidad	Revisión del sistema		
	Capacitación	Plan de capacitación	Registros de capacitación, instrucciones en los puestos de trabajo, calificaciones en las capacitaciones		
	Auditoria interna	Plan de auditoria	Registro de hallazgos de auditoria		
	Reclamos	Procedimientos para el manejo de reclamos	Registro de reclamos, Registro de no conformidades		
	HACCP	Principios del HACCP	Registros y evidencia documental		
	Responsabilidades	Descripción de puestos de trabajo	Organigrama		
	Acciones correctivas	Procedimiento de Acciones correctivas	Registros de Acciones correctivas tomadas. Evidencia documental		
	Acciones preventivas	Procedimiento de Acciones preventivas	Registros de Acciones preventivas.		
Criterios de calidad	Liberación del producto	Especificaciones	Registro de inspección final		
Gestión de crisis	Organización de la gestión de crisis	Plan de contingencia, procedimientos e instructivos	Persona de contacto, responsable		
	Retiro de producto	Especificaciones, procedimientos e instructivos	Registro de retiro de productos		
Residuos		Legislación vigente	Registro de tratamiento de residuos orgánicos, destino de los residuos de la faena, Registro de incineración		

CONCLUSIONES

Esta propuesta de modelo referencial integrado para la gestión de la inocuidad tiene la finalidad de sensibilizar y fomentar, entre los distintos actores intervinientes en la cadena de valor de la carne de conejo para consumo humano, la aplicación y seguimiento de sistemas de reducción de riesgos de contaminación física, química o microbiológica, a fin de lograr un alimento inocuo, y a su vez, motivarlos a desarrollar estrategias para la ampliación del mercado nacional y de exportación.

Por otra parte, la herramienta para las auditorias desarrollada es sencilla y dinámica, permite ser

utilizada en cualquiera de los eslabones de la cadena y proporciona mayor confiabilidad y orden en la cadena de valor de la carne de conejo en el mercado local y de exportación.
Por último se espera que tanto el modelo planteado como la ficha para las auditorias puedan ser extrapolados a otras cadenas de producción de carne de animales pequeños con características similares.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Codex Alimentarius. Food Hygiene Basis Texts. Food and Agricultural Organization of the United Nations – World Health Organization. Rome, 1997

Código Alimentario Argentino (Ley n° 18284/69, Decreto N° 2126/71).

Código de prácticas de higiene para la carne del Codex *CAC/RCP 58/2005***.**

Decreto PEN 815/99. Establecimiento del Sistema Nacional de Control Alimentario.

Decreto Nº 4238/68. Reglamento de Inspección de Productos, subproductos y derivados de origen animal.

Dirección Nacional de Alimentos. www.alimentosargentinos.gov.ar

FAO/WHO. 2005. *Building effective food safety systems*. Proceedings of the 2nd FAO/WHO

Global Forum of Food Safety Regulators. Bangkok, Thailand, 12-14 October 2004
(available at: http://www.fao.org/docrep/meeting/008/y5871e/y5871e00.htm).

ISO 22000:2005 Sistemas de gestión de inocuidad alimentaria – Requisitos (*Food safety management systems – Requirements).*

ISO 22005:2007 Trazabilidad en la cadena alimentaria. Principios generales y requisitos básicos para el diseño y la implementación del sistema.

Marín M.A; Miropolsky A.G y Faillaci S.M. Trazabilidad en carne de conejo. XXVII Jornadas IRAM-Universidades. Octubre 2007. Organización Mundial de Comercio. www.wto.org

REGLAMENTO (CE) Nº 178/2002 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 28 de enero de 2002 por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria.

REGLAMENTO (CE) Nº 852/2004 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 29 de abril de 2004 relativo a la higiene de los productos alimenticios

REGLAMENTO (CE) Nº 853/2004 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 29 de abril de 2004 por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal.

REGLAMENTO (CE) Nº 1441/2007 DE LA COMISIÓN de 5 de diciembre de 2007 que modifica el Reglamento (CE) Nº 2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a Los productos alimenticios.

REGLAMENTO (CEE) Nº 2377/1990 DEL CONSEJO de 26 de junio de 1990 por el que se establece un procedimiento comunitario de fijación de los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal.
REGLAMENTO (CE) Nº 1935/2004 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO, de 27 de octubre de 2004, sobre los materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimento.

Reglamento Técnico MERCOSUR Nº 80/96. Condiciones Higiénico-Sanitarias para Establecimientos Elaboradores/Industrializadores de Alimentos.

Resolución Grupo Mercado Común Nº 31/2006. Rotulado Nutricional de Alimentos Envasados (Complementación de las Resoluciones GMC Nº 46/2003 y 47/2003).

Resolución Nº 618/2002. Medidas de bioseguridad e higiene a las que deberán ajustarse todos los establecimientos de producción cunícola, destinados a la reproducción y/o engorde de conejos para consumo humano. Requisitos para la habilitación. Condiciones generales y operativas. Instalaciones.

SAGPyA 2008. Dirección de Ganadería, Área de Cunicultura.(www.sagpya.mecon.gov.ar)

Producción de poligalacturonasa por *Pichia anomala* aislada en la provincia de Misiones

Production of polygalacturonase by *Pichia anomala* isolated in the province of Misiones

Martos MA (1), Heck M (1), Zubreski ER (1), Hours RA (2)

(1) FCEQyN. UNAM. Posadas. Misiones.
(2) CINDEFI -UNLP, CCT-La Plata, CONICET
Félix de Azara 1552. CP 3300. Posadas. Misiones. Argentina
amartos@fceqyn.unam.edu.ar

RESUMEN

Las enzimas pécticas microbianas son de interés en la industria de alimentos principalmente por su uso en el procesamiento de frutas y vegetales (elaboración de vinos, extracción y clarificación de jugos de frutas, extracción de aceites vegetales, maceración de vegetales, etc.). Las pectinasas constituyen un complejo sistema enzimático que incluye: pectinesterasas (PE), poligalacturonasas (PG) y pectinliasas (PL). El objetivo del presente trabajo fue estudiar la cinética de producción de PG por *Pichia anomala*, levadura aislada en la provincia de Misiones, en medios de cultivos con diferentes concentraciones de la fuente de carbono y energía (FCE) y de la fuente de nitrógeno.

Los cultivos se realizaron en Erlenmeyers de 500 ml conteniendo 95 ml de un medio compuesto por 5 ó 10 g/l de glucosa; 0, 5, 10 ó 20 g/l de pectina de citrus y 6,7 ó 13,4 g/l de Yeast Nitrogen Base (YNB). Los mismos se incubaron a 30 °C, con agitación (150 rpm). Se tomaron muestras cada 12 h hasta los 3 días. La biomasa se separó por centrifugación y el sobrenadante se mantuvo a -18 °C hasta su utilización para la medida de la actividad PG (por determinación de grupos reductores liberados a partir de ácido poligalacturónico, mediante el método DNS) y glucosa residual (mediante kit enzimático).

En los medios conteniendo 5 g/l de glucosa como única FCE, la producción de PG fue despreciable. Al adicionar 5 ó 10 g/l de pectina, la enzima se expresó alcanzando valores de 60 UE/ml y 99 UE/ml, respectivamente, a las 30 h de cultivo, pero no se incrementó con 20 g/l de pectina. El incremento en la concentración de glucosa o de YNB resultó en un aumento de la actividad enzimática. Se obtuvieron valores de actividad PG de 168 UE/ml y 145 UE/ml en medios con 10 g/l de glucosa y 13,4 g/l de YNB, respectivamente. La mayor producción de biomasa se obtuvo entre las 24 y 30 h de cultivo en todas las experiencias, tiempo a partir del cual el microorganismo entró en fase estacionaria. Al aumentar la concentración de pectina no se observó un aumento en la cantidad de biomasa, esto indicaría que el microorganismo no es capaz de utilizar pectina como FCE pero si la necesita como inductor. La máxima producción de PG se obtuvo durante las primeras 24-30 h de cultivo (crecimiento exponencial). El pH disminuyó en el transcurso de las fermentaciones en todos los medios estudiados (probablemente los ácidos orgánicos producidos no fueron metabolizados por el microorganismo). La glucosa fue rápidamente metabolizada ya que luego de 24-30 h se obtuvieron valores despreciables en todos los medios ensayados, coincidiendo con el máximo crecimiento microbiano.

Pichia anomala es capaz de producir PG en medios de cultivo con glucosa, pectina e YNB. La producción de PG se realizó durante la fase de crecimiento exponencial, no es reprimida por glucosa y es inducida por pectina.

ABSTRACT

Microbial pectinases are very important in food industries mainly for their use in fruit and vegetable processing (winemaking, extraction and clarification of fruit juices, vegetable oil extraction, maceration of vegetables, etc.). Pectinases constitute a complex pool of enzymes that include: pectinesterases (PE), polygalacturonases (PG) and pectinlyases (PL). The objective of the present work was to study the kinetics of PG production by *Pichia anomala*, a wild yeast isolated in the province of Misiones, in culture media with different concentrations of carbon and energy source (CES) and nitrogen source.

Cultures were grown in 500 ml-*Erlenmeyer* flasks with 95 ml of a medium containing 5 or 10 g/l glucose; 0, 5, 10 or 20 g/l citrus pectin and 6.7 or 13.4 g/l Yeast Nitrogen Base (YNB), at 30 °C, in a rotary shaker (150 rpm). Samples were taken every 12 h up to 3 days. Biomass was separated by centrifugation and the supernatant was kept at -18 °C until used for PG assay (by measuring the reducing groups released from polygalacturonic acid by DNS method) and residual glucose (by enzymatic kit).
In culture media containing 5 g/l glucose as a sole CES, PG production was negligible. The enzyme was expressed by addition of 5 or 10 g/l of pectin, reaching values of 60 EU/ml and 99 EU/ml, respectively, at 30 h of cultivation, but enzyme activity did not increase with 20 g/l of pectin. The increase in the concentration of glucose or YNB resulted in an increase in enzyme activity. PG activity values of 168 EU/ml and 145 EU/ml were found in media with 10 g/l glucose and 13.4 g/l of YNB, respectively. The highest biomass production was obtained between 24 and 30 h of culture in all experiments, time at which the microorganism reached the stationary phase. Higher concentration of pectin did not result in an increase in biomass concentration; this would indicate that the microorganism is not capable of using pectin as CES but it is necessary as enzyme inducer. Maximum PG production was obtained during the first 24-30 h of culture (exponential growth). pH decreased during fermentation in all media studied (probably organic acids produced were not metabolized by the microorganism). Glucose was rapidly metabolized; negligible values were found in all media tested after 24-30 h of culture, coinciding with the maximum of microbial growth.
Pichia anomala is capable of producing PG in culture media containing glucose, pectin and YNB. PG production takes place during the exponential growth phase; its production is not repressed by glucose and is induced by pectin.

PALABRAS CLAVE: *pectinasas, Pichia anomala, poligalacturonasa*.

KEYWORDS: *pectinases, Pichia anomala, polygalacturonase*.

INTRODUCCIÓN

Las sustancias pécticas, presentes en la lámina media y en la pared celular primaria de plantas superiores, están formadas por unidades de ácido D-galacturónico unidas por enlaces glicosídicos α-1,4, con los grupos carbonilos parcialmente esterificados con metanol. Las enzimas que hidrolizan sustancias pécticas se conocen como enzimas pécticas o pectinasas. Constituyen un complejo sistema enzimático que incluye: pectinesterasas (PE), poligalacturonasas (PG) y pectinliasas (PL). Las PE hidrolizan los esteres metílicos de moléculas de pectina, liberando metanol. Las PL y PG son enzimas depolimerizantes, degradan enlaces glicosídicos ya sea por un mecanismo de hidrólisis (PG) o por un mecanismo de β-eliminación (PL) (Jayani *et al*. 2005, Favela-Torres *et al*. 2006, Tari *et al*. 2007).
Las pectinasas microbianas son de interés comercial ya que son utilizadas en el procesamiento industrial de frutas en las etapas de extracción y clarificación, en la maceración de tejidos vegetales (Kashyap *et al*. 2000, Ranveer *et al*. 2005). Estos últimos tratamientos son de interés en la producción de néctares de frutas y en la elaboración de purés vegetales (papa, zanahoria, etc.) (Nakamura *et al*. 1995). Teniendo en cuenta que el costo del medio de fermentación es uno de los principales factores determinantes de la producción de enzimas pécticas, es importante formular medios de cultivos de bajo costo y que al mismo tiempo provean los requerimientos nutricionales necesarios para el crecimiento adecuado del microorganismo y la producción de las enzimas extracelulares (Nighojkar *et al*. 2006). Las pectinasas son enzimas generalmente inducibles y por lo tanto la presencia de pectina es necesaria en el medio de fermentación (Schwan *et al*. 1997, Malvessi y Silveira 2004, Hellí *et al*. 2001).
Pichia anomala, una levadura aislada en la Cátedra de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales (UNaM), tiene la capacidad de crecer en medio líquido con glucosa y pectina de citrus como fuentes de carbono y energía (FCE) y producir enzimas extracelulares con actividad pectinolítica. En el presente trabajo se estudió la influencia de la FCE y de la fuente de nitrógeno sobre la producción de PG, a los efectos de encontrar las mejores condiciones para obtener extractos enzimáticos con alta actividad PG.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismo

Pichia anomala, aislada en la Cátedra de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales (UNaM) a partir de frutas cítricas en descomposición.

Medios de cultivos

Medio de conservación. Extracto de levadura, 5 g/l; triptona, 5 g/l; glucosa, 10 g/l; agar, 18 g/l, pH: 5.
Medio de fermentación (g/l). Yeast Nitrogen Base (YNB, Difco), 6,7 ó 13.4; glucosa 5 ó 10; pectina de citrus 0, 2,5, 5, 10 ó 20.
Todos los componentes del medio fueron esterilizados a 1 atm, 15 min, excepto en el caso de la solución de YNB, la que se esterilizó en forma separada por filtración a través de un filtro de celulosa de 0,45 µm (Blanco *et al*. 1999).

Producción de enzimas pécticas

Inóculo. A partir de cultivos jóvenes de la levadura (24 h), desarrollados en estrías de medio de conservación a 30 ºC, se preparó una suspensión de células en Erlenmeyers que contenían 30 ml de agua destilada estéril, a partir de la cual se realizaron diluciones sucesivas hasta obtener una suspensión celular con un valor de A_{620} de alrededor de 0,96, la cuál se tomó como inóculo para la fermentación.
Fermentación. Se inocularon Erlenmeyers de 500 ml conteniendo 95 ml del medio de fermentación correspondiente con 5 ml del inóculo proveniente de una estría joven de la levadura en estudio. Los mismos se incubaron a 30 °C, con agitación (150 rpm). El cultivo se muestreó cada 12 h aproximadamente, hasta los 3 días. Las muestras fueron centrifugadas para remover las células de levadura. El sobrenadante se mantuvo a – 18 °C hasta su utilización. Todas las experiencias se realizaron por triplicado.

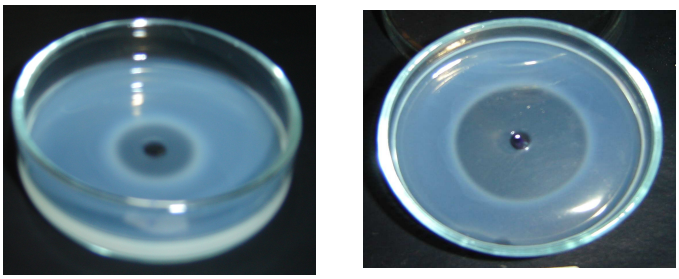
Determinaciones analíticas

Determinación de la actividad pectinolítica del extracto enzimático por el método del hoyo (cup plate assay). Se realizaron hoyos de 5 × 4 mm, en placas que contenían ácido poligalacturónico (81325 - Fluka) al 1 % en buffer acetato de sodio-ácido acético (AcB, 0,2 M, pH: 5,0) y agar (1,8 %). A cada hoyo se le agregó 45 µl del filtrado enzimático. Las cajas se incubaron a 35 ºC hasta 4 d y se inundaron con HCl (5 N) como revelador. La actividad pectinolítica se determinó por medida del diámetro de los halos de hidrólisis formados (Souza *et al*. 2003).
Determinación de la actividad poligalacturonasa (PG). La actividad PG se determinó mezclando 2,9 ml de una solución de ácido poligalacturónico (P-3889, Sigma) al 0,2 % en AcB (0,2 M, pH 4,5), con 0,1 ml del filtrado enzimático diluido apropiadamente. Las muestras (por duplicado) se incubaron a 37 °C durante 10 min y se determinaron los grupos reductores liberados por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), usando ácido galacturónico como referencia (Miller 1959). Una unidad enzimática (UE) de PG se define como la cantidad de enzima que libera 1 µmol de ácido galacturónico por min en las condiciones de ensayo.
Biomasa. El crecimiento microbiano ($g_{celula\ seca}$/l) se determinó por mediciones de densidad óptica (DO_{620}), utilizando una curva de calibración entre peso seco y densidad óptica.
Glucosa residual. Se utilizó el método de glucosa oxidasa-peroxidasa (Glicemia, Wiener, Argentina) (Contreras Esquivel *et al.* 1999).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Pichia anomala fue capaz de producir enzimas pécticas en el medio líquido utilizado. La actividad pectinolítica del extracto enzimático se evidenció por la presencia de los halos de hidrólisis desarrollados en placas conteniendo ácido poligalacturónico, luego de haber sido incubadas durante 24 h y 48 h (**Figura 1**).
Los resultados de las experiencias para evaluar el efecto de la concentración de los diferentes sustratos sobre la producción de PG y biomasa se presentan en las **Figuras 2** y **3**, respectivamente.
Los resultados de las experiencias (**Figura 2**) demuestran que en medios conteniendo 5 g/l de glucosa como única FCE, la producción de PG fue despreciable. Al adicionar 5 ó 10 g/l de pectina, la enzima se expresó alcanzando valores de 60 UE/ml y 99 UE/ml, respectivamente, a las 30 h de cultivo. Estos resultados indican la necesidad de un inductor (pectina) para estimular la producción PG por la levadura en estudio. Con 20 g/l de pectina (medio 4) no hubo un aumento con respecto al medio con 10 g/l, lo que pudo deberse a una limitación de algún otro sustrato en los medios de cultivos. El

incremento en la concentración de glucosa (medio 5) o de YNB (medio 6) resultó en un aumento en la actividad enzimática. Se obtuvieron valores de actividad PG de 168 UE/ml a las 30 h de cultivo y de 145 UE/ml a las 54 h en medios con 10 g/l de glucosa y 13,4 g/l de YNB respectivamente.



A **B**

Figura 1: Halos de hidrólisis sobre placas con ácido poligalacturónico producidos por los extractos enzimáticos de *P. anomala*, a diferentes tiempos de incubación (**A**: 24 h y **B**: 48 h).

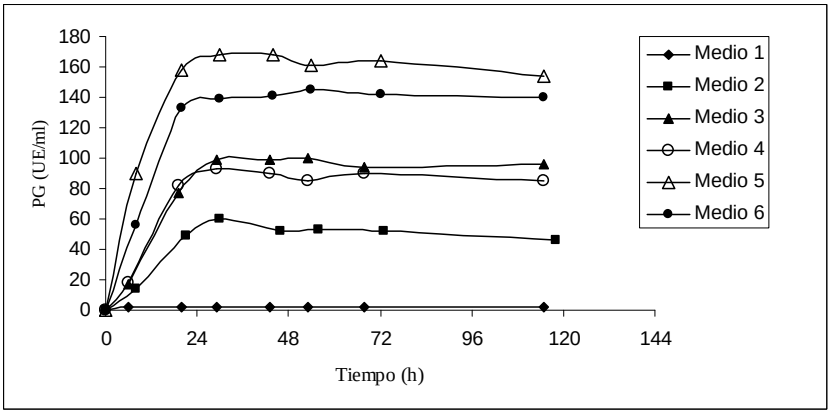


Figura 2: Producción de poligalacturonasa por *P. anomala* en diferentes medios de cultivo:
Medio 1 (g/l): YNB 6,7; glucosa 5; pectina 0. **Medio 2** (g/l): YNB 6,7; glucosa 5; pectina 5. **Medio 3** (g/l): YNB 6,7; glucosa 5; pectina 10. **Medio 4** (g/l): YNB 6,7; glucosa 5; pectina 20. **Medio 5** (g/l): YNB 6,7; glucosa 10; pectina 10. **Medio 6** (g/l): YNB 13,4; glucosa 5; pectina 10.

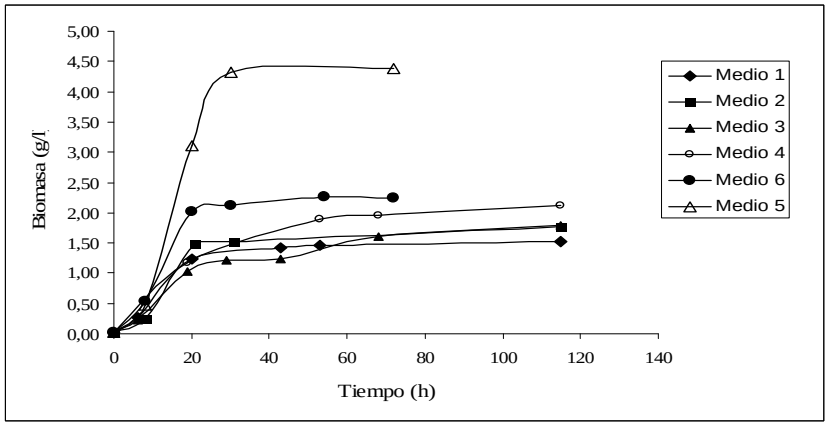


Figura 3: Producción biomasa en función del tiempo, durante el cultivo de *P. anomala* en los diferentes medios de cultivo. Los símbolos son los mismos que los que se describieron en la Fig. 2.

En la **Figura 3** se observa que la mayor producción de biomasa se obtuvo entre las 24 y 30 h de cultivo en todas las experiencias, tiempo a partir del cual el microorganismo entró en fase estacionaria.

La biomasa producida fue similar para los medios que contenían 5 g/l de glucosa (medios 1 al 4). Al aumentar tanto la fuente de nitrógeno (YNB) como la glucosa, la cantidad de biomasa aumentó, obteniéndose los mayores valores de 4,38 g/l para el medio 5 que contenía 10 g/l de glucosa. Al aumentar la concentración de pectina no se observó un aumento en la cantidad de biomasa, esto indicaría que el microorganismo no es capaz de utilizar pectina como FCE pero si la necesita como inductor de la síntesis enzimática. La máxima producción de PG se obtuvo durante las primeras 24-30 h de cultivo, coincidiendo con la fase de crecimiento exponencial.
Los valores de pH y glucosa residual obtenidos en el transcurso de las diferentes fermentaciones realizadas se presentan en las **Figuras 4** y **5**, respectivamente.

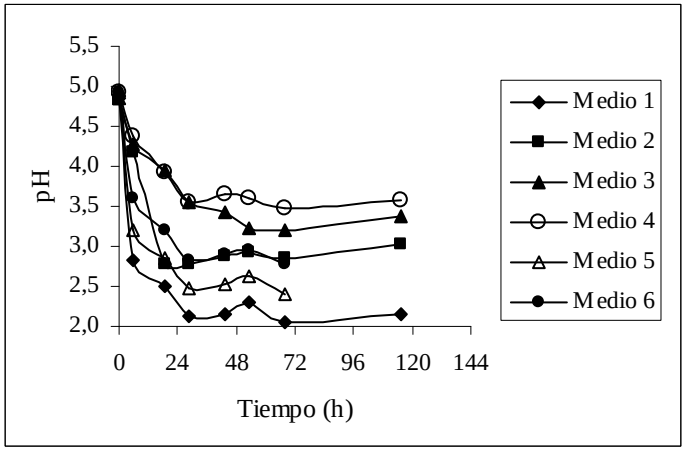


Figura 4. Variación del pH del medio en función del tiempo, durante le cultivo de *P. anomala* en los diferentes medios de cultivo. Los símbolos son los mismos que los que se describieron en la Fig. 2.

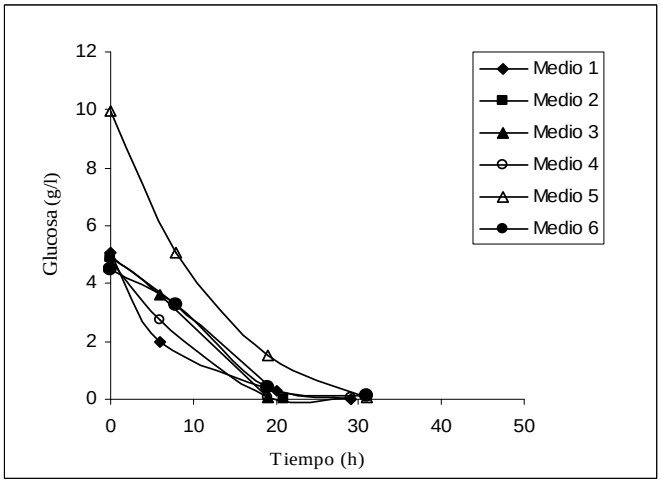


Figura 5. Glucosa residual en función del tiempo, durante el cultivo de *P. anomala* en los diferentes medios de cultivo. Los símbolos son los mismos que los que se describieron en la Fig. 2.

El pH disminuyó en el transcurso de las fermentaciones en todos los medios estudiados, alcanzando valores entre 2,5 y 3,5, a las 24 h de cultivo (**Figura 4**). Estos valores de pH no afectan la estabilidad de PG ya que en estudios previos se determinó que la misma es estable en un rango de pH entre 2,5 a 5,5. De la evolución de los valores de pH en el transcurso de las fermentaciones, se consideró que los ácidos orgánicos producidos no fueron metabolizados por el microorganismo en estudio.
La glucosa (**Figura 5**) fue rápidamente metabolizada por la levadura. Luego de 24 h aproximadamente se obtuvieron valores despreciables en todos los medio ensayados, esto coincide con el mayor crecimiento microbiano.
Blanco *et al.* (1999) informaron que la producción de pectinasas es una capacidad constitutiva en la mayoría de las levaduras porque no se requiere pectina, ácido poligalacturónico o ácido galacturónico

para inducir la síntesis de dichas enzimas. Schwan *et al.* (1997) informaron que la síntesis de PG por *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces thermotolerans*, *Saccharomyces cerevisiae* var. *chevalieri* y *Candida rugopelliculosa* no aumentó con el agregado de pectina o ácido poligalacturónico al medio de cultivo que contenía glucosa. Moyo *et al.* (2003) informaron que la producción de pectinasas por *Kluveromyces wickerhamii* fue constitutiva, considerando que la misma fue producida en ausencia de pectina. Sin embargo, la capacidad pectinolítica de algunas especies de levaduras, tales como *Cryptococcus albidus* y *Geotrichum lactis* (Blanco *et al.* 1999) han sido consideradas como inducibles. Este último parecería ser el caso de *Pichia anomala*.

CONCLUSIONES

Pichia anomala es capaz de producir enzimas pécticas en cultivo sumergido utilizando medios conteniendo glucosa, pectina y YNB. Los mayores valores se obtuvieron con los filtrados enzimáticos provenientes de los cultivos realizados en los medios que contenían glucosa, 10 g/l, adicionados con pectina de citrus, 10 g/l e YNB, 6,7 g/l. En este último medio la actividad PG fue de 168 UE/ml. Dicha actividad pectinolítica no fue reprimida por glucosa y fue inducida por pectina. La producción de PG se realizó durante la fase de crecimiento exponencial.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Blanco P, Sieiro C, Villa TG. 1999. Production of pectic enzymes in yeasts. Mini Review. FEMS Microbiol. Lett.., 175: 1-9.

Contreras Esquivel JC, Hours RA, Voget CE, Mignone CF. 1999. *Aspergillus kawachii* produces an acidic pectin releasing enzyme activity. J. Biosc. Bioeng., 88: 48-52.

Favela-Torres E, Volke-Sepulveda T, Viniegra-Gonzalez G. 2006. Production of hydrolytic depolymerising pectinases - A review. Food Technol. Biotechnol., 44: 221-227.

Hellí P, Ros JM, Laencina J. 2001. Changes in high and low molecular weight carbohydrates during *Rhizopus nigricans* cultivation on lemon peel. Carbohydr. Polym., 45: 169-174.

Jayani RS, Shivalika S, Reena G. 2005. Microbial pectinolytic enzymes: A review. Process Biochem., 40: 2931–2944.

Kashyap DR, Vohra PK, Chopra S, Tewari R. 2000. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. Bioresource Technol., 77: 215-227.

Malvessi E, Silveira MM. 2004. Influence of medium composition and pH on the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. Braz. Arch. Biol. Technol., 47: 693-702.

Miller G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem., 31: 426 –428.

Moyo S, Gashe BA, Collison EK, Mpuchane S. 2003. Optimizing growth conditions for the pectinolytic activity of *Kluyveromyces wickerhamii* by using response surface methodology. Int. J. Food Microbiol., 85: 87-100.

Nakamura T, Hours RA, Sakai T. 1995. Enzymatic maceration of vegetables with protopectinases. J. Food Sci., 60: 468-472.

Nighojkar S, Phanse Y, Sinha D, Nighojkar A, Kumar A. 2006. Production of polygalacturonase by immobilized cells of *Aspergillus niger* using orange peel as inducer. Process Biochem., 41: 1136-1140.

Ranveer SJ, Shivalika S, Reena G. 2005. Microbial pectinolytic enzymes: A review. Process Biochem., 40: 2931–2944.

Schwan RF, Cooper RM, Wheals AE. 1997. Endopolygalacturonase secretion by *Kluyveromyces marxianus* and other cocoa pulp-degrading yeasts. Enzyme Microb. Technol. 21: 234-244.

Souza JVB, Silva E S, Maia MLS, Teixeira MF. 2003. Screening of fungal strains for pectinolytic activity: endopolygalacturonase production by *Peacilomyces clavisporus* 2A.UMIDA.1. Process Biochem., 39: 455-458.

Tari C, Gögus N, Tokatli F. 2007. Optimization of biomass, pellet size and polygalacturonase production by *Aspergillu sojae* ATCC 20235 using response surface methodology. Enzyme Microb. Technol., 40: 1108-1116.

Identificación rápida de cepas del género *Brucella* mediante colony-PCR.

Fast identification of *Brucella* strains by colony-PCR.

Morales LL [(1)], Chávez BE [(2)], Castañeda RE [(1)]

(1) Facultad de Ciencias Químicas. BUAP, México. (2) Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México. lamoral@siu.buap.mx

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue la implementación de la técnica colony-PCR para la confirmación de bacterias del género *Brucella*. La brucelosis es la zoonosis bacteriana de mayor importancia mundial, su presencia en los países ocasiona serias consecuencias económicas al mercado internacional de ganado infectado y los productos que de ellos derivan, además del daño a la salud humana. El control y la erradicación de la brucelosis es difícil y tiene implicaciones importantes en salud pública en el continente Latino Americano. Uno de los problemas en el diagnóstico microbiológico es el aislamiento poco exitoso de *Brucella* (*B.*) en el cultivo de muestras de sangre de humanos, animales y productos lácteos además de que la identificación y tipificación de las cepas de este género es en muchas ocasiones complicada por ser una bacteria de crecimiento lento y fastidioso, se requiere realizar diversas pruebas como aglutinación con sueros monoespecíficos, crecimiento en colorantes como tionina y fucsina, lo cual implica largos periodos de tiempo para confirmar el género y la especie. Es por ello, que la implementación de técnicas moleculares más sensibles como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación del material genético de este género ha cobrado gran importancia hoy en día. Las cepas de *Brucella* utilizadas en este trabajo fueron previamente obtenidas, identificadas y preservadas por el Laboratorio de Patogenicidad Microbiana del Centro de Investigaciones Microbiológicas del ICUAP, de la BUAP. Se utilizaron 10 cepas de las tres especies *B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis* como controles positivos, 10 cepas de campo aisladas de leche y órganos de animales con brucelosis, y como controles negativos se emplearon otras bacterias Gram-negativas como *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* serovar Typhi. El DNA molde utilizado para la amplificación fue la secuencia del gen *ugpB*, en base a que la proteína SP41 producida por este gen en las 3 especies de mayor importancia sanitaria del género *Brucella*, muestra homología del 99% en su secuencia aminoacídica, la cual también es producida por otros Gram-negativos, pero con menor homología. Las colonias se colocaron en la mezcla de reacción del kit de PCR, sin realizar el proceso de extracción de DNA. Se logró confirmar la identidad del 100% de las bacterias del género *Brucella* analizadas en este trabajo, mediante la amplificación del fragmento de 1,302 pb del gen *ugpB*, mediante colony-PCR, mientras que los controles de *E. coli* y *Salmonella enterica* serovar Typhi, no amplificaron el gen *ugpB*. En esta investigación el colony-PCR no fue una técnica alternativa al serodiagnóstico, puesto que las muestras de humanos, leches y animales fueron previamente diagnosticados por éstos métodos. El colony PCR mostró ser una técnica molecular confirmativa rápida de cepas del género *Brucella*.

ABSTRACT

The aim of the present study was to implement the technique colony-PCR for the confirmation of bacteria of genus *Brucella*. Brucellosis is a major bacterial zoonosis of global importance, the presence of this disease in countries causes serious economic consequences for international trade of infected livestock and their animal products, besides of damage to health human. The control and eradication of brucellosis is difficult and have important public health implications in Latin America. One of the problems in microbiological diagnosis is to detect the presence of *Brucella (B.)* in samples of blood from human, animals or dairy products. The typification of this bacteria could be very difficult because of their growth is low and fastidious, and requires confirmation through agglutination with monospecific sera, growth on dyes thionin and basic fuchsin, which implies long period of time. Because of these reasons, the implementation of more sensitive molecular technologies like polymerase chain reaction (PCR) to amplify DNA from *Brucella* has received great importance nowadays. The *Brucella* strains for this work were obtained previously, identified and preserved by

Laboratory of Bacterial Pathogenicity from Center of Microbiological Investigations of ICUAP, BUAP. Ten strains of three species *B. melitensis, B. abortus* y *B. suis* were analyzed like positive controls, 10 strains isolated from milk and organ of infected animals infected with brucellosis and negative controls were Gram-negatives *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* serotype Typhi. Target DNA used for amplification was the sequence of *ugpB* gene, on the basis of that the proteinSP41 coded by this gene in 3 species of major sanitary importance show 99% of homology in aminoacidic sequence, which is produced in all species from genus *Brucella* and other Gram-negatives but with less homology . Bacterial colonies were placed directly in mix reaction of PCR kit, without achieving DNA extraction. We were able to identify 100% of bacteria of this genus isolated from animal tissues, milk products, and human blood analyzed in this study, by means of the amplification of 1302-bp DNA fragment from *ugpB* gene, performed by method of colony-PCR, while *E. coli* and *Salmonella enterica* serotype Typhi did not amplify *ugpB* gene. In this investigation, colony-PCR was not an alternative technique for serologic diagnosis, since milk, animal and human samples were diagnosed previously. Colony-PCR showed to be a fast molecular test to confirm the identity of strains from genus *Brucella.*

PALABRAS CLAVE: *brucelosis en animales y alimentos, colony-PCR.*

KEYWORDS: *Brucellosis in animals and milk products, colony-PCR.*

INTRODUCCIÓN

Las bacterias del género *Brucella* spp son microorganismos Gram-negativos, anaerobios facultativos que ocasionan la brucelosis, una de las 5 zoonosis de mayor distribución mundial, su presencia genera barreras de comercialización en el ganado infectado y los productos alimenticios que de ellos derivan, ocasiona daño a la salud humana y afecta el desarrollo socioeconómico tanto de la industria ganadera como de la población que posee ganado de traspatio, sector vulnerable en muchas poblaciones en vías de desarrollo (Pappas 2005).

Diferentes referencias han señalado que América Latina es un reservorio importante de brucelosis en nuestro continente (Pappas 2006). Esta enfermedad es de difícil control y erradicación, uno de los problemas en su diagnóstico es detectar su presencia tanto en animales como en productos lácteos y derivados para el consumo humano. El diagnóstico definitivo de la brucelosis requiere del aislamiento de *Brucella* spp a partir de tejidos, líquidos corporales y leche (NOM-041-ZOO-1995), se considera un animal positivo ante la presencia del microorganismo, a lo que se le ha llamado la “prueba de oro”, la cual se presenta aún en ausencia de anticuerpos. Sin embargo, esta prueba puede mostrar dificultades debido al crecimiento lento y fastidioso de la bacteria lo que obstaculiza el diagnóstico, además de que representa un riesgo latente de infección para los laboratoristas (Sola 1995).

Aunque comúnmente se han empleado diversas pruebas serológicas en el diagnóstico de diferentes muestras, no siempre significan un caso activo de brucelosis, además pueden dar resultados falsos debido a que presentan reacciones cruzadas con otros microorganismos Gram-negativos, lo que genera gran confusión en el diagnóstico de la enfermedad, es por ello que el desarrollo de técnicas moleculares más sensibles como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación del material genético de bacterias del género *Brucella* ha cobrado gran importancia hoy en día (Navarro 2004), pudiendo aplicarse en el monitoreo seguido al tratamiento y la detección temprana de reincidencias, lo que contribuiría al establecimiento de tratamientos oportunos y adecuados, así como al monitoreo del progreso de estados crónicos que pueden comprometer la salud del huésped debido a que las bacterias del género *Brucella* son intracelulares y puede infectar potencialmente a cualquier órgano (Mantur 2007, Cutler 2005).

La técnica de colony-PCR tiene la ventaja de que no requiere el aislamiento de DNA, lo que resulta en una mayor rapidez en su realización, por lo que su implementación en laboratorios de diagnóstico no requiere personal especializado, además de que solo necesita una pequeña muestra bacteriana y se evita la manipulación de esta bacteria que es altamente infecciosa.

MATERIAL Y MÉTODOS

Especímenes de referencia y de campo de *Brucella* spp

Las cepas de *Brucella melitensis, B. abortus* y *B. suis* empleadas en este estudio se obtuvieron del cepario del Laboratorio de Patogenicidad Microbiana del Centro de Investigaciones Microbiológicas de la BUAP. Se emplearon 10 cepas de referencia del género *Brucella*, 18 cepas de campo aisladas de leche, animales con brucelosis y humanos con brucelosis, además 2 cepas como controles negativos indicadas más adelante. Las cepas ya habían sido identificadas previamente mediante pruebas serológicas y bioquímicas y forman parte del cepario del Laboratorio de Patogenicidad Microbiana del ICUAP (**Tabla 1**). Las cepas fueron descongeladas lentamente de –70 ºC, manteniéndolas en hielo durante 1 hora, después fueron sembradas en agar BRUCELLABUAP mediante estría cruzada incubándolas a 37 ºC, en tensión de CO_2 al 5% durante 48 horas. Una vez que creció el cultivo, se tomó una colonia que se colocó directamente en el tubo de PCR, junto con la mezcla de reacción descrita más adelante, para su posterior amplificación. Las cepas de *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* serovariedad Typhi se sembraron en agar MacConkey por estría cruzada y se incubaron a 37 ºC durante 24 horas. La identidad de las cepas de *Brucella* spp., *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* serovariedad Typhi fue confirmada mediante pruebas bioquímicas de laboratorio (MIO, TSI, LIA, Urea, VP, RM, Citrato), las cuales se inocularon e incubaron a 37 ºC durante 24 horas (Martínez 1989). Las pruebas complementarias confirmatorias realizadas para las cepas de referencia de *Brucella* spp. fueron de seroaglutinación y crecimiento en medios de cultivo adicionados con Fuscina 1:50 000, Safranina 1:10 000, Tionina 1:50,000 y 1:25,000, posteriormente se incubaron a 37 ºC con tensión de CO_2 al 5% durante 48 horas (INDRE 1991).

Tabla 1. Cepas de referencia y de campo empleadas en este estudio.

Cepas de campo		
Especie	Cepa	Fuente
B. melitensis	A02	Aislada de perra boxer Puebla
B. melitensis	LEO1	Aislada de leche de cabra del rancho de Tepeyahualco Puebla
B. melitensis	LEO2	Aislada de leche de cabra del rancho de Tepeyahualco Puebla
B. melitensis	LEO3	Aislada de leche de cabra del rancho de Tepeyahualco Puebla
B. melitensis	H	Aislada de hígado de cabra del rancho de Tepeyahualco Puebla
B. melitensis	R	Aislada de riñón de cabra del rancho de Tepeyahualco Puebla
B abortus	A01	Aislada de feto bovino abortado
B abortus	A04	Aislada de leche de vaca Sonora
B abortus	A05	Aislada de leche de vaca Puebla
B abortus	A06	Aislada de leche de vaca Chipilo Puebla
Cepas de referencia		
B. melitensis	M16	INDRE (Instituto Nacional de Referencia y Epidemiológico México
B. suis	1330	INSERM Marsella Francia
B. suis	Bs1	Francia
B. suis	Bs2	México
B. suis	Bs3	INDRE
B. abortus	S19	INDRE México
B. abortus	544	INSERM Marsella Francia
B. abortus	2308	INDRE México
B. abortus	45/20	INDRE México
B. abortus	R13	INSERM Marsella Francia
Controles negativos		
Escherichia coli	O157:H7	ICUAP
Salmonella entérica serovariedad Typhi	CT18	ICUAP

Técnica colony-PCR

La técnica de PCR se realizó empleando una mezcla de reacción comercial conteniendo 1 U de DNA polimerasa BIOTAQ, 1 mM de dNTP (dATP, dGTP, dCTP, and dTTP), 62.5 mM de Tris-HCl (pH

8.8 a 25 °C), 1.5 mM de $MgCl_2$, 16 mM $(NH_4)_2SO_4$, 0.01% de Tween 20, 0.5-1 µl de iniciadores que se obtuvieron a partir de la secuencia del gen *ugpB* (NC_006933) que codifica la proteína SP41 de *Brucella abortus* S19 (YP_223349.1). La secuencia de los iniciadores fue 5'-CGCCTCGAAGATTATTGAGCTGCGGCGATTGC-3' y 5'-CGCGTCGACTGTTCACCGTCTGATCACG-3'. La mezcla de reacción se sometió al proceso de amplificación en un termociclador (Mastercycler personal), el programa consistió en la desnaturalización inicial a 94ºC por 5 minutos, seguido de 32 ciclos de 94 ºC por 45 segundos, temperatura de apareamiento de 56 ºC por 45 segundos y extensión de 72 ºC durante 2 minutos, el programa finalizó con un ciclo para la extensión final a 72 ºC por 10 minutos.
Se consideró positiva aquella muestra a partir de la cual se obtuvo el producto amplificado de DNA con el peso molecular esperado de 1302 pb, el producto se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, a 80 volts durante 1 hora 20 minutos. Para identificar correctamente los productos de PCR se utilizó el marcador de peso molecular de 1 kb (Plus DNA Ladder 1 mg/ml, GIBCO BRL Markers and Standards). Los productos de electroforesis fueron visualizados mediante tinción en una solución acuosa de bromuro de etidio a una concentración de 5 mg/ml durante 5 minutos, posteriormente el gel se visualizó en un transiluminador (SYNGENE) por acción de la luz ultravioleta, la imagen fue capturada y guardada (Analizador de imagenes Gene Snap). Todas las PCRs se realizaron por triplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Amplificación del fragmento de 1302 pb del gen *ugp*B por la técnica de PCR

Optimización de la técnica de PCR. La amplificación del fragmento de 1302 pb del gen *ugpB* de bacterias del género *Brucella* requirió estandarizar la técnica de PCR. Los parámetros que se estandarizaron fueron la toma de la muestra bacteriana y la concentración de iniciador. Inicialmente se determinó la concentración adecuada de iniciador, para lo cual se emplearon dos concentraciones C_1 = 0.5 µM y C_2 = 1 µM. Los resultados mostraron que el producto se amplificó adecuadamente empleando la concentración 1 µM de iniciadores (**Figura 1**, carril 3).

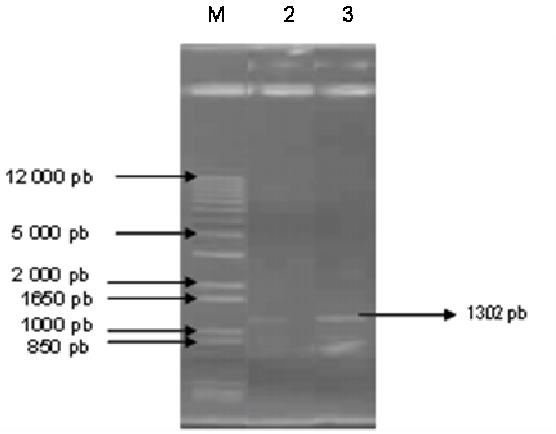


Figura 1. Productos de PCR amplificados empleando diferentes concentraciones de iniciadores. Se emplearon bacterias de la cepa de *B. abortus S19* para amplificar el fragmento de 1302 pb de la proteína SP41. Línea 1: Marcador de peso molecular (M), línea 2: 0.5 µM de iniciador, línea 3: 1 µM de iniciadores.

Para estandarizar la cantidad de bacteria empleada en la técnica de PCR realizada en este estudio, se emplearon tres muestras bacterianas con diferente densidad bacteriana las cuales mostraron las siguientes densidades ópticas (OD) a 600 nm de longitud, la muestra A presentó una OD= 0.124, la muestra B una OD= 0.156 y la muestra C una OD= 0.269. Los resultados revelaron que la muestra bacteriana adecuada para amplificar el fragmento de 1302 pb del gen *ugpB* correspondía a la muestra B (**Figura 2**).
La estandarización de la cantidad de bacteria y concentración de iniciadores fueron suficientes para amplificar al fragmento correspondiente al gen *ugpB* de la cepa *B. abortus* S19, por lo que a continuación se determinó si era posible emplear esta técnica para amplificar el fragmento de 1302 pb a partir de cepas de referencia y de campo del género *Brucella.*

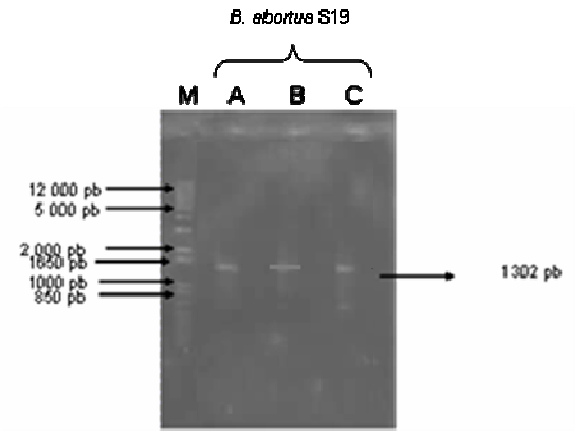


Figura 2. Producto de PCR amplificado empleando muestras bacterianas con diferente densidad óptica de *B. abortus* S19. M: marcador de peso molecular, A: *B. abortus* S19, OD=0.124, B: *B. abortus* S19, OD=0.156 y C: *B. abortus* S19, OD=269. λ=600 nm de longitud.

Amplificación del fragmento de 1302 pb del gen *ugpB* por la técnica de PCR en cepas de referencia de bacterias del género *Brucella*

Después de haber confirmado la identidad de las cepas de referencia (**Tabla 1**), se determinó si la técnica de PCR propuesta en este estudio era suficiente para amplificar el fragmento de 1302 pb del gen *ugpB* en estas cepas. Como lo muestran los resultados en la **Figura 3**, la técnica empleada es capaz de amplificar el fragmento deseado a partir de las cepas de referencia *Brucella melitensis* M16, *Brucella suis* 1330, *Brucella abortus* S19, *Brucella abortus* 544, *Brucella abortus* 2308, *Brucella abortus* 45/20 y *Brucella abortus* R13, cabe mencionar que estas especies del género *Brucella* son las de mayor importancia en la salud animal y humana a nivel mundial, por lo que es importante desarrollar una técnica molecular rápida y eficiente para confirmar la identidad de la bacteria. No se detectó la amplificación del fragmento a partir de la bacteria Gram-negativa *Salmonella enterica* serovar Typhi (**Figura 3**, línea 9).

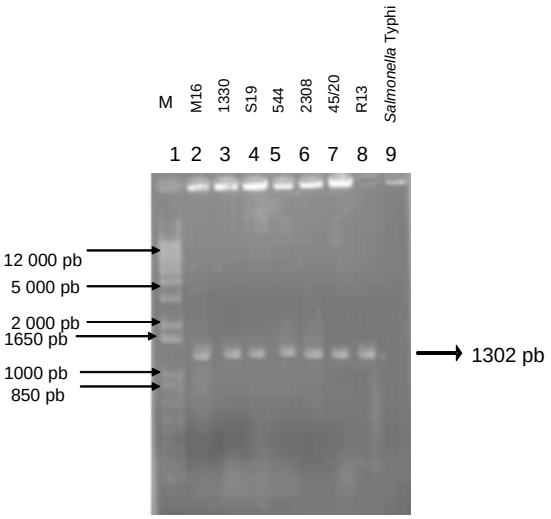


Figura 3. Productos de PCR amplificados a partir de cepas de referencia del género *Brucella***.** Línea 1: M; 2: *B. melitensis* M16; 3: *B. suis* 1330; 4: *B. abortus* S19; 5: *B. abortus* 544; 6: *B. abortus* 2308; 7: *B. abortus* 45/20; 8: *B. abortus* R13; 9: *Salmonella* entérica serovariedad Typhi.

Amplificación del fragmento de 1302 pb del gen *ugpB* por la técnica de PCR en cepas de campo de bacterias del género *Brucella*

Cepas de campo *B. melitensis* aisladas de diferentes muestras fueron empleadas para determinar si era posible amplificar el fragmento deseado mediante esta técnica. La **Figura 4** muestra que es posible amplificar el fragmento de 1302 pb que corresponde al gen *ugpB*, a partir de *B. melitensis* aislada de

suero de perro infectado del cual se aisló la cepa A02 (**Figura 4A**). En ningún ensayo realizado amplificó el fragmento de 1302 pb, a partir de las bacteria de *E. coli* ó *Salmonella enterica* serovar Typhi (**Figuras 4A** y **4B**, carril 7, y 4 y 5, respectivamente). La técnica de PCR empleada en este estudio mostró ser eficiente para amplificar el fragmento a partir de cepas aisladas de diferentes animales con brucelosis de los que se obtuvo leche de cabra de donde se aislaron las cepas de *B. melitensis* LEO1, LEO2, LEO3 (**Figura 4A**), así como a partir de las cepas llamadas H y R aisladas de hígado y riñón de cabras brucelosas (**Figura 4B**).

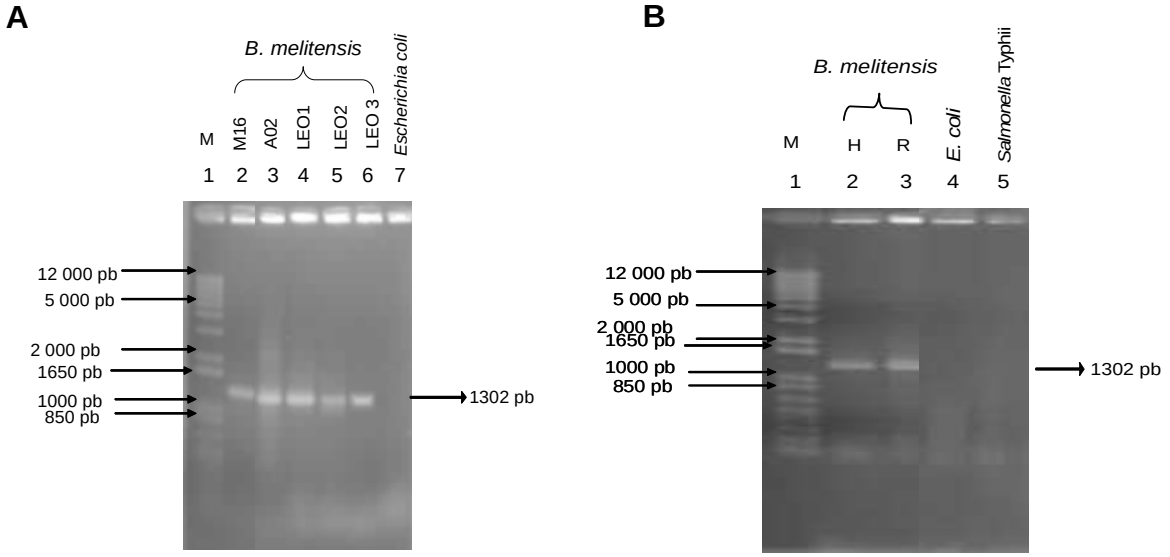


Figura 4. Productos de PCR amplificados de cepas de campo de *B. melitensis*. **A.** Amplificación del fragmento de 1302 pb de cepas aisladas de leche de animales con brucelosis. Línea 1: M; 2: *B. melitensis* M16 (control positivo); 3: A02; 4: LEO1; 5: LEO2; 6: LEO3; 7: *E. coli*. **B.** Amplificación del fragmento de 1302 pb de cepas de animales con brucelosis Línea 1: M; 2: H; 3: R; 4: *E. coli*; 5: *Salmonella* entérica serovariedad Typhi.

La técnica de PCR realizada también mostró ser eficiente para amplificar el fragmento deseado de cepas de campo de *B. abortus* A01 aislada de feto bovino, *B. abortus* A04, *B. abortus* A05 y *B. abortus* A06 aisladas de leche de vacas brucelosas (**Figura 5**).

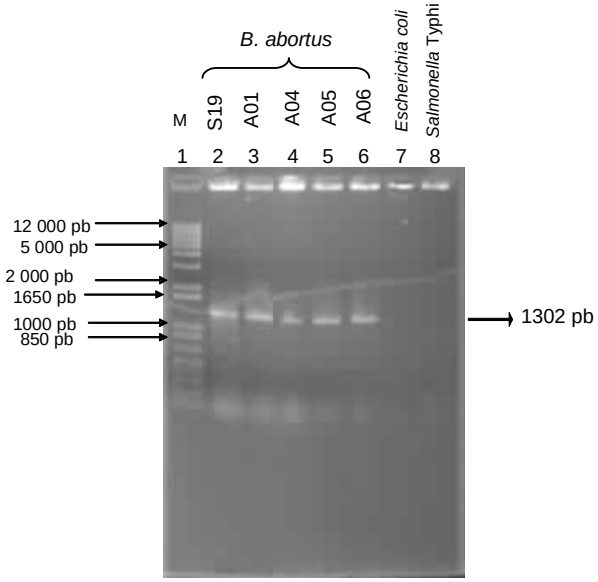


Figura 5. Productos de PCR amplificados de cepas de campo de *B. abortus*. Línea 1: M; 2: *B. abortus* S19 (control positivo); 3: A01; 4: A04; 5: A05; 6: A06; 7: *E. coli* (control negativo); 8: *Salmonella* entérica serovariedad Typhi (Control negativo).

La técnica de PCR también mostró ser útil para amplificar el fragmento de 1302 pb del gen *ugpB*, a partir de cepas de referencia de *B. suis* 1, *B. suis* 2 y *B. suis* 3 obtenidas por el cepario del laboratorio de Microbiología del ICUAP como lo muestra la **Figura 6**.

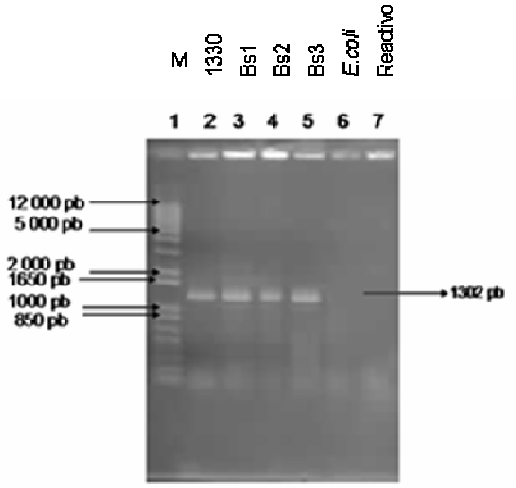


Figura 6. Productos de PCR amplificados de cepas de referencia de *Brucella suis*. Línea 1: M; 2: *B. suis* 1330 (control positivo); 3:Bs1; 4: Bs2; 5: Bs3; 6: *E. coli* (control negativo); 7: Control de pureza de reactivos de mezcla de reacción, *B. suis*.

En todos los ensayos de amplificación se emplearon también cepas de *E. coli* y *Salmonella enterica* serovarTyphi, en ningún caso se amplificó el fragmento buscado, por lo que la técnica mostró tener especificidad por amplificar el fragmento solo en las bacterias del género *Brucella* estudiadas en este trabajo, dato que fue corroborado con un alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídicas de los genes *ugpB* de las bacterias empleadas, mediante el programa ClustalW (Higgins 1994) (no mostrado), que mostró que existe menor homología con respecto al gen de las bacterias que no pertenecen a este género, por lo que la metodología fue adecuada para confirmar la identidad de género de estas bacterias.

La ventaja de emplear esta técnica con respecto a otras técnicas de PCR (Lavaroni 2004, Martínez 2007, Navarro 2004, Romero 1994, Mitka 2007), radica en su rapidez debido a que no es necesario purificar DNA, pues la bacteria es incorporada directamente en la mezcla de reacción. Aunque varias técnicas de PCR han sido establecidas para la identificación de microorganismos, el desafío ahora radica en simplificar las técnicas para ser empleadas tanto para fines de investigación como para laboratorios de diagnóstico, aún para la detección temprana de reincidencias (Navarro 2004). La técnica realizada por este grupo de trabajo, podría ser de gran utilidad en la confirmación del diagnóstico, que como es bien sabido, comúnmente es confuso debido a la sintomatología clínica tan diversa que presenta la brucelosis en sus hospederos, lo que complica la confirmación de casos positivos no solo en ganado vacuno, porcino y bovino, sino en alimentos derivados de ellos, principalmente leche no pasteurizada y los productos que de ésta se obtienen, consumidos comúnmente sobre todo en el mercado de productos artesanales, práctica muy arraigada predominante en países en vías de desarrollo.

CONCLUSIONES

Si bien, desde la década de los 90´s se han desarrollado varias técnicas de PCR para la detección de bacterias del género *Brucella* (Fekete 1990, Leal 2000, Morata 2003), hasta la fecha no se han logrado adaptar al trabajo rutinario debido a diversos factores que se presentan en su realización, como la variación en la sensibilidad y especificidad de la PCR para *Brucella* entre los diferentes laboratorios, la estandarización de la preparación de la muestra, elección de genes molde, diversos métodos de detección, que eventualmente pueden exponer a los laboratoristas a un mayor riesgo para adquirir la enfermedad al manipular las cepas bacterianas por más tiempo, además la realización de las técnicas de PCR, normalmente requiere habilidad para realizar el aislamiento de DNA con una pureza

adecuada, lo que implica un mayor tiempo para obtener el resultado final. La técnica de colony-PCR utilizada en este trabajo es una buena alternativa para la confirmación de cepas de *Brucella* de referencia y de campo, por ser eficiente y rápida y evitar el proceso de purificación de DNA, lo que contribuye al desarrollo de técnicas simplificadas para su aplicación futura en laboratorios de diagnóstico, lo que ayudaría a la detección directa a partir de colonias sospechosas y así optimizar el arduo trabajo de laboratorio que implica no solo su identificación, sino su aislamiento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Cutler SJ, Whatmore AM, Commander NJ. 2005. Brucellosis-new aspects of an old disease. Journal of Applied Microbiology, 98:1270-1281.

Fekete A, Bankle JA, Halling SM, Sanborn MR. 1990. Preliminary development of a diagnostic test for *Brucella* using polymerase chain reaction. J. Appl. Bacteriol, 69, 216-227.

Higgins D., Thompson J., Gibson T.Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res, 22: 4673-4680.

INDRE, Brucelosis. Publicación Técnica del INDRE. Subsecretaría de Coordinación y Desarrollo, México Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos Secretaría de Salud, 1991., 6.

Lavaroni O, Aguirre V, Vanzini C, Lugaresi S, Echaide T. 2004. Evaluación de la reacción en cadena de la polimerasa para el diagnóstico de la brucelosis en un rebaño lechero infectado con *Brucella* spp. Facultad de Ciencias Veterinarias Cátedra de Inmunología Revista Argentina de Microbiología, 36:101-106.

Leal DS, Martínez IO, Garcia J, Lopez A, Martinez JP. 2000. Use of polymerase chain reaction to detect *Brucella abortus* biovar 1 in infected goats. Vet. Microbiol, 75, 91-97.

Mantur BG., Amarnath, SK, Shinde RS. 2007. Review of clinical and laboratory features of human brucellosis. Indian Journal of Medical Microbiology, 25(3):188-202.

Martínez BM. 1989. Manual de técnica y procedimientos para el estudio de Brucelosis. Series: manuales técnicos. México, D. F., pag. 7-24.

Martínez MOL, Hernández CR, Santillán FMA, Díaz AE, Suárez GF, De la Garza GM. 2007. Identificación de un fragmento de 3 kb del gen *aid*a-i en B*rucella ovis.* INIFAP CENID-MICROBIOLOGIA CINVESTAV-IPN FMVZ-UNAM Vº Congreso de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos Mendoza Argentina.

Mitka S, Anetakis C, Souliou E, Diza E, Kansouzidou A. 2007. Evaluation of Different PCR Assays for Early Detection of Acute and Relapsing Brucellosis in Humans in Comparison with Conventional Methods. Journal of Clinical Microbiology, 45(4), 1211–1218.

Morata P, Queipo MI, Reguera JM, Garcia MA, Cardenas A, Colmenero JD. 2003. Development and evaluation of a PCR-enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of human brucellosis. J. Clin. Microbiol, 41, 144-148.

Navarro E, Casao MA, Solera J. 2004. Diagnosis of human brucellosis using PCR. Expert Rev Mol Diagn, 115-123.

NOM-041-ZOO-1995. Norma Oficial Mexicana para la Campaña Nacional para el control y erradicación de la brucelosis en los animales. SAGAR. Diario Oficial de la Federación. México, D. F. 1995.

Pappas G, Akritidis N, Bosilkovski M, Tsianos E. 2005. Brucellosis. N Engl J Med, 352:2325–2336.

Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N, Christou L, Tsianos EV. 2006. The new global map of human brucellosis. Lancet Infect Dis, 6: 91–99.

Romero C, Gamazo C, Pardo M, López-Gon I. 1994. Specific Detection of *Brucella* DNA by PCR. Departamento de Microbiology Universidad de Navarra 31080 Pamplona Spain Journal of Clinical Microbiology, 33 (3):615–17.

Sola LD, Martínez IO, López A, Martínez JP. 1995. Single step PCR for detection of *Brucella* spp from blood and milk of infected animals. J. Clin. Microbiol., 33 (13): 3087-3090.

Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima de nisina sobre flora alterante aislada de productos cárnicos cocidos

Determination of nisin minimal inhibitory concentration on the spoilage flora isolated from meat cooked products

Palavecino N (1), Castro M (2), Garro OA (2), Campos C (3)

(1). Becario CONICET (2). Universidad Nacional del Nordeste; CONICET (3). Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Int. Güiraldes 2160, Ciudad Universitaria, CP 1428, Argentina- CONICET
carmen@di.fcen.uba.ar

RESUMEN
Las bacterias ácido lácticas (BAL) y *Brochothrix thermosphacta* han sido identificadas como responsables de la alteración de carnes procesadas envasadas al vacío y almacenadas a temperaturas de refrigeración. El uso de antimicrobianos naturales, como las bacteriocinas, representa una alternativa para controlar el crecimiento de esta flora. La nisina, es una bacteriocina producida por *Lactococcus lactis* subespecie *lactis*, reconocida generalmente como segura (GRAS), y se utiliza como preservador de algunos alimentos en varios países. En el presente trabajo se evaluó la sensibilidad a nisina de la flora alterante aislada de embutidos cárnicos cocidos elaborados en la provincia del Chaco, utilizando la técnica de difusión en agar y, se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) del biopreservador para las cepas aisladas por el método de la dilución crítica. Todas las cepas alterantes ensayadas fueron sensibles a nisina. Los valores de CIM obtenidos señalan que este biopreservador podría ser utilizado en la industria cárnica local favoreciendo a la conservación de estos productos.

ABSTRACT
Lactic acid bacteria (LAB) and *Brochothrix thermosphacta* have been identified as responsible for the spoilage of vaccum-packed processed meat products stored under refrigeration temperatures. The use of natural antimicrobial substances, such as bacteriocins, represents an alternative to control the growth of this undesirable flora. Nisin, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, generally recognized as safe (GRAS), is being used in many countries to preserve several types of food. In the present work, firstly, spoilage microflora was isolated from cooked meat products manufactured in the province of Chaco (Argentina), then, the sensitivity of this microflora to nisin was evaluated and lastly, the minimum inhibitory concentration (MIC) of the bacteriocin was determined for each one of the isolated strains using the critical dilution method. All the spoilage strains showed sensitivity to nisin. The MIC values found underline the promising use of nisin for the preservation of these local meat products.

PALABRAS CLAVE: *Nisina, Brochothrix thermosphacta, bacterias ácido-lácticas, productos cárnicos cocidos.*

KEYWORDS: *Nisin, Brochothrix thermosphacta, lactic acid bacteria, cooked meat products.*

INTRODUCCIÓN
Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos sintetizados ribosomalmente por diferentes grupos de bacterias. Las bacteriocinas producidas por BAL ofrecen potenciales aplicaciones en la preservación de alimentos y su uso en la industria alimenticia puede ayudar a reducir la adición de preservadores químicos así como también la intensidad de los tratamientos térmicos, dando como resultado alimentos más naturales, con mejores propiedades sensoriales y mayor valor nutricional. Esto puede ser una alternativa para satisfacer las crecientes demandas de los consumidores por alimentos más seguros, sanos, listos para consumir y mínimamente procesados, a la vez que permitiría el desarrollo de productos alimenticios menos ácidos o con menor contenido de sal que los ya existentes en el mercado

(Gálvez *et al.* 2007). Dentro de las nuevas tendencias en la industria alimenticia, una opción interesante es la bioconservación, que en la industria cárnica involucra la utilización de cultivos protectores o sustancias producidas por algunas bacterias como la bacteriocinas. Dentro del grupo de las bacteriocinas, la nisina es la única bacteriocina admitida por la legislación para la preservación de alimentos. Este agente antimicrobiano producido por *Lactococcus lactis* es un pequeño péptido efectivo contra un gran grupo de bacterias gram- positivas, así como sobre sus esporas.

Los embutidos cocidos son productos cárnicos de consumo frecuente en nuestra población. La provincia del Chaco cuenta con cuatro establecimientos habilitados por la dirección de Bromatología provincial para la elaboración y comercialización de productos cárnicos. Los procesados cocidos están representados por salchichas tipo Viena, paleta de cerdo cocida, mortadelas de diferentes tipos y Cracovia, entre otros; y poseen carácter artesanal, ya que se elaboran manteniendo las recetas y algunas técnicas tradicionales de los primeros pobladores (inmigrantes de Europa Oriental, España e Italia), lo que les confiere características particulares.

Si bien los productos cárnicos cocidos y curados son productos que se calientan a una temperatura de 65-75ºC, por lo que la mayoría de las células vegetativas no sobrevive, se produce una recontaminación después del calentamiento que limitará su vida útil (Borch *et al.* 1996). El manejo del producto luego de la cocción recontamina estos productos con aproximadamente 0,5-2 log ufc/g de bacterias totales, principalmente BAL. Cuando se almacenan estos productos anaeróbicamente y bajo refrigeración, tal el caso de envasado al vacío o bajo atmósfera modificada (MAP, modified atmosphere packaging), las BAL dominarán el proceso de deterioro. La actividad metabólica de las BAL resulta en la aparición de sabores rancios, acidez, off-flavors, off-odours, exudados lechosos, limo, hinchamiento del envase por la producción de gas y cambios de color (enverdecimiento) (Samelis *et al.* 2000).

En emulsiones cárnicas cocidas y curadas elaboradas en la zona la flora alterante queda determinada en parte por la permeabilidad al oxígeno del envase que se utilice. En trabajos previos, se ha determinado que la flora alterante está compuesta por bacterias lácticas y *B. thermosphacta* cuando las muestras son envasadas en films con permeabilidad al oxígeno de 19 ($cm^3/m^2/24h/1atm$ –75% HR). En envases con mayor permeabilidad al oxígeno (70 y 150 $cm^3/m^2/24h/1atm$ –75% HR) ambas especies son capaces de crecer pero, el crecimiento de *B. thermosphacta* es inhibido después de cierto tiempo y las bacterias lácticas se convierten en el único grupo dominante y responsable de la alteración del producto (Cayré *et al.* 2003, Cayré *et al.* 2005, Cayré 2006). *B. thermosphacta* contribuye al detrimento de la calidad del producto produciendo pequeñas cantidades de ácidos grasos de cadena corta causantes de "off- odors" (Pin *et al.* 2002).

En este contexto el crecimiento de bacterias lácticas y *B. thermosphacta* sobre productos cárnicos envasados al vacío y almacenados a temperatura de refrigeración podría controlarse con el agregado de bacteriocinas de bacterias lácticas, tales como nisina. Por consiguiente, los objetivos de este trabajo fueron evaluar la sensibilidad a nisina de la flora alterante aislada de embutidos cocidos elaborados en la provincia del Chaco y, además, determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) del biopreservador para las cepas aisladas**.**

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo

Los productos ensayados fueron: salchichas tipo Viena, Cracovia, chorizo ahumado y distintos tipos de mortadela, elaborados con técnicas tradicionales en establecimientos ubicados en distintos puntos de la provincia. Estos productos se tomaron del mercado listos para consumir, se envasaron al vacío en films de baja permeabilidad al oxígeno (19 $cm^3.m^{-2}.24\ h^{-1}.atm^{-1}$ a 25ºC y 75% HR, Maraflex®, Envaril SAIC, Argentina) y se almacenaron a 8ºC hasta su alteración (60 días).

Aislamiento de la flora alterante

Se utilizaron alícuotas de los productos alterados para preparar diluciones seriadas que luego se sembraron en agar MRS (de Man, Rogosa y Sharpe) y en agar STAA (estreptomicina, acetato de talio, actidiona); selectivos para BAL y *B. thermosphacta*, respectivamente. Las placas se incubaron a 30ºC durante 72 h (BAL) y a 25ºC durante 48 h (*B. thermosphacta*), en condiciones aeróbicas. Las colonias seleccionadas de cada placa se purificaron mediante tres repiques sucesivos sobre el mismo medio para las BAL y sobre Infusión Cerebro Corazón (BHI) para *Brochotorix.* Posteriormente los aislados se caracterizaron parcialmente de acuerdo a su morfología, tinción de Gram y pruebas de catalasa y

oxidasa. Además se evaluaron: i) la formación de gas a partir de glucosa, en All Purpose Tween (APT) caldo suplementado con 1% de D-glucosa y 0,5% de acetato de sodio de acuerdo con lo propuesto por Sperber y Swan (1976), y ii) la producción de exopolisacáridos sobre agar MRS modificado, en el cual se sustituye la glucosa por sacarosa (Hastings *et al.* 2000).

Sensibilidad a nisina

La actividad de nisina frente a los microorganismos contaminantes se determinó en placa utilizando el método de difusión en agar (Schillinger y Lücke 1989). Sobre placas con agar blando (0,1 % de agar) inoculado con un cultivo activo (~10^7 UFC/ml) del microorganismo alterante a investigar, se realizaron pocillos de 5 mm de diámetro y se colocó dentro de estas cavidades 20 µl de una solución concentrada (10000 ppm) de bacteriocina. La actividad de nisina en el producto usado, Nisaplin®, reportada por el fabricante (Aplin y Barret, Estados Unidos), es de $1x10^6$ UI/g. El diluyente empleado para preparar la solución se preparó con 0,02 N HCl y 0,75% NaCl (Rogers y Montville 1991). Las placas se incubaron bajo condiciones óptimas para el crecimiento de los alterantes durante: 24 h (BAL) y 48 h (*B. thermosphacta).* La presencia de un "halo" de inhibición alrededor de las cavidades se consideró como resultado positivo, es decir como indicativo de la sensibilidad de la cepa en estudio a la nisina.

Determinación de la concentración inhibitoria mínima

La concentración inhibitoria mínima (CIM), definida como la dilución más baja en la cual se observa inhibición del crecimiento microbiano, se determinó por el método de la dilución crítica en placas. Para ello, sobre placas de agar blando inoculadas con el microorganismo alterante a evaluar, se realizaron pocillos de 5 mm de diámetro y se colocó en cada uno de ellos 20 µl una dilución de nisina correspondiente a la siguiente serie de concentraciones: 2500, 1250, 312, 78, 39, 20, 10 y 5 ppm. Las placas se incubaron bajo condiciones óptimas para cada alterante a evaluar, al igual que en el paso anterior. Se tomó la CIM como la concentración más baja de nisina a la que se observó halo de inhibición.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El control del crecimiento de bacterias alterantes, como BAL y *B. thermosphacta,* en carnes procesadas se dificulta ya que estos microorganismos son psicrotróficos, microaerofílicos y resistentes a nitritos, diferentes concentraciones de sal y al proceso de ahumado. El uso de nisina representa una opción para la extensión de la vida útil de productos cárnicos cocidos, ya que se ha probado su efectividad en los mismos. En la revisión de Cleveland y colaboradores (2001) se reporta el sinergismo entre nisina y nitritos comúnmente utilizados en productos cárnicos, así como también el uso combinado del antimicrobiano con otros preservadores, tales como agentes quelantes y surfactantes, para inhibir el desarrollo de microorganismos Gram (+) y (-) en estos sistemas alimenticios.

Las cepas consideradas en este estudio se seleccionaron a partir de productos cárnicos cocidos producidos artesanalmente en la provincia del Chaco. De acuerdo a la caracterización realizada, sobre la flora alterante de estos productos, se determinó la presencia de cuatro cepas correspondientes al género *Brochothrix* y las restantes 32 cepas correspondientes al grupo de BAL. Estos aislamientos de BAL fueron evaluados en cuanto a su capacidad de producción de gas y formación de exopolisacáridos, características que les confieren su calificativo de flora deteriorativa, ya que estas propiedades son indeseables en la medida en que comprometen la calidad higiénico-sanitaria del producto. Seis de estas cepas se mostraron como productoras de gas a partir de glucosa y otras seis produjeron exopolisacáridos a partir de sacarosa. No se presentaron cepas que fueran capaces de albergar estas dos características juntas.

El método de difusión en agar utilizado para determinar la sensibilidad de los distintos aislados a nisina, permitió comprobar la efectividad de este antimicrobiano sobre todas las cepas testeadas.

Los resultados obtenidos con respecto a la determinación de la CIM para las BAL se muestran en la **Figura 1**. Como puede observarse, existe una marcada variabilidad no sólo en los valores de CIM hallados, sino también en la proporción de aislamientos sensibles a una misma concentración de nisina. Esta tendencia es coincidente con la reportada por Gill y Holley (2000) para BAL aisladas de productos cárnicos curados en medio nutritivo.

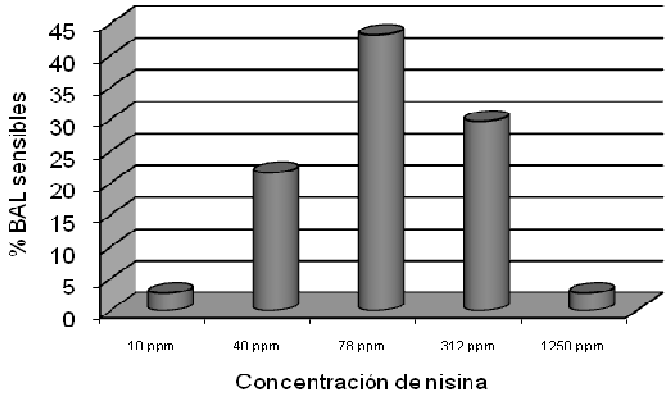


Figura 1. Distribución porcentual de BAL alterantes sensibles a diferentes concentraciones de nisina.

Los aislamientos de *Brochothrix* presentaron una CIM de 78 ppm. Nattress y colaboradores (2001) hallaron que 250 ppm de nisina fueron efectivas para inhibir a *B. thermosphacta* B2 por 12 días a temperatura de refrigeración en caldo ATP.

En general, la nisina ha sido utilizada en la preservación de carnes procesadas con resultados variables y en algunos casos contradictorios. Gibbs y Hurst (1964) no observaron extensión de la vida útil de panceta pausteurizada cuando la misma fue tratada con 2,5 a 12,5 ppm de nisina y concluyeron que la flora alterante del producto (bacterias lácticas) era resistente a la acción de nisina durante el almacenamiento a 20°C. Por el contrario, Jarvis y Burke (1976) usaron 400 ppm de nisina y hallaron un retardo en la alteración de salchichas frescas almacenadas a 5 °C. Resultados similares fueron reportados para otros productos cárnicos (Caseiro *et al.* 1979, Stankiewiez- Berger 1969, Calderon *et al.* 1985).

Se ha sugerido que para que nisina sea efectiva en la preservación de carnes, niveles de 750 UI/g o más deberían ser usados, puesto que las proteínas podrían interactuar con la nisina neutralizando su actividad (Scott y Taylor, 1981a, 1981b) y/o los lípidos y fosfolípidos interferir con su actividad (Henning *et al.* 1986, Jung *et al.* 1992, Rogers y Montville 1994) lo cual podría ser considerado como un problema desde el punto de vista económico.

CONCLUSIONES

La elevada sensibilidad a nisina mostrada por todos los alterantes ensayados sugiere que este preservador podría ser utilizado en la industria cárnica regional favoreciendo la conservación natural de estos productos.

Los valores hallados in vitro son promisorios ya que las bacteriocinas en productos cárnicos son utilizadas como parte de un sistema de barreras múltiples y no como un único factor de preservación (Leistner 2000), con lo cual se espera que concentraciones de nisina no tan elevadas, como para representar un problema de costos, puedan ser utilizadas *in situ* con buenos resultados.

En futuros ensayos se evaluará la efectividad de nisina frente a patógenos alimentarios Gram (+) frecuentemente encontrados en productos cárnicos cocidos, y se prevé la combinación del antimicrobiano con otros preservadores con objeto de disminuir la concentración de la bacteriocina y ampliar el espectro inhibitorio hacia bacterias Gram (-), con lo cual, además de prolongar la vida útil del producto este tendría una mayor calidad higiénico sanitaria. Asimismo se evaluarán distintos factores de preservación y sus interacciones en sistemas cárnicos modelo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Borch E, Kant-Muermans M, Blixt Y., 1996. Bacterial spoilage of meat and cured meat products. Int. J. Food Microbiol. 33, 103-120.

Calderon C, Cllins-Thompson DL and Usborne WR. 1985. Shelf –Life studies of vacuum-Packaged bacon treated whit nisin. *Journal of Food Protection 48*: 330-333.

Caseiro C, Ciampella A, Gennari MA, Barhezizi AM. 1979. Utilization of nisin in cooked sausages and others cured meat products. *Ind .Aliment. 18*: 1-12, 19.

Cayré ME, Vignolo G and Garro O. 2003. Modeling lactic acid bacteria growth in vacuum-packaged cooked meat emulsions stored at different temperatures. *Food Microbiology* 20, 561-566.

Cayré ME. 2006. Efecto de la temperatura y la permeabilidad al oxígeno del envase sobre el crecimiento de alterantes de emulsiones cárnicas. Modelos Predictivos. Tesis Doctoral. Dirección: Dr. Oscar Garro (UNNE), Codirección: Dra. Graciela Vignolo (CERELA). Facultad de Agroindustrias-UNNE.

Cayré ME, Garro O. A, Vignolo G. 2005. Effect of oxygen permeability of packaging film and storage temperature on growth of lactic acid bacteria and *Brochothrix thermosphacta* in cooked meat emulsion. *Food Microbiology* 20, 505-512.

Cleveland J, Montville TJ, Nes IF, Chikindas ML. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology 71,* 1-20.

Gálvez A, Abriouel H, Lucas López R, Ben ON. 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology* 120, 51-70.

Gibbs BM, Hurst A. 1964. Limitations of nisin as a preservative in non dairy foods. In N. Molin (ed) Microbial Inhibitors in food. Almqvist and Wisksell. Stockolmo. 151-165.

Gill AO, Holley RA. 2000. Inhibition on bacterial growth on ham and bologna by lyzosyme, nisin and EDTA. *Food Res. Int.* 33, 83-90.

Henning, S, Metz R, Hammes WP. 1986. New aspects for the application of nisin to food products based on its mode of action. *International Journal of Food Microbiology 3,* 135-141.

Hastings JW, Kunene NF, Geornaras I., von Holy A. 2000. Characterization and Determination of Origin of Lactic Acid Bacteria from a Sorghum-Based Fermented Weaning Food by Analysis of Soluble Proteins and Amplified Fragment Length Polymorphism Fingerprinting. Applied and Environmental Microbiology, Applied and Environmental Microbiology, 66, 1084-1092-

Jarvis B, Burke CS. 1976. Practical and legislativeaspects of the chemical preservation of food. In F.A.Skinat and W.B. Hugo (eds.) Inhibition and inactivation of vegatative microbes. Academic Press, New York. 345-367.

Jung DS, Bodyfelt FW, Daeschel MA. 1992. Influence of fat and emulsifers on the efficacy of nisin in inhibiting *Listeria monocytogenes* in fluid milk. *Journal Dairy Science 75*: 387-393.

Leistner L. 2000. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. Int. J. Food Microbiol., 55, 181-186.

Nattress FM, Yost CK, Baker LP. 2001. Evaluation of the ability of lysozyme and nisin to control meat spoilage bacteria. Int. J. Food Microbiol., 70, 111-119.

Pin C, García de Fernando GD, Ordoñez JA. 2002. Effect of modified atmosphere composition on the metabolism of glucose by *Brochothrix thermosphacta*. Appl. Environ. Microbiol, 68, 4441-4447.

Rogers AM y Montville TJ. 1991. Improved agar diffusion assay for nisin quantification. Food Biotechnology, 5(2), 161-168.

Rogers A M, Montville TJ. 1994. Quantification of factors which influence nisin's inhibition of *Clostridium botulinum* 56A in a model food system. *Journal of Food Science 59*: 663-668, 686.

Samelis J, Kakouri A, Rementzis J. 2000. The spoilage microflora of cured, cooked turkey breasts prepared commercially with or without smoking. *Int. J. Food Microbiol.* 56, 133-143.

Schillinger M, Lucke FK. 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *App. Environ. Microbiol* 59: 1901-1906.

Scott VN and Taylor SL. 1981 *a*. Effect of nisin on outgrowth of *Clostridium botulinum* spores. *Journal of Food Science 46*: 117-120.

Scott VN, Taylor SL. 1981 *b*. Temperature, pH and spore load effectson the ability of nisin to prevent the outgrowth of *Clostridium botulinum* spores. *Journal of Food Science 46*: 121-126

Sperber WH, Swan J. 1976. Hot-loop test for the determination of carbon dioxide production from glucose by lactic acid bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 31, 990-991.

Stankiewiez- Berger H. 1969. Effect of nisin on the lactobacilli that cause greening of the cured meat products. *Acta Microbial. Polónica. 1*: 117-120.

Estudio y comparación de la microflora autóctona de la superficie de naranjas

Study and comparison of the autochthonous microflora of orange peel

Pérez MB (1), Pons GA (1), Saguir FM (1), Manca de Nadra MC (1,2)

(1) Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. UNT.
(2) CERELA, Tucumán-Argentina.
fabianasaguir@fbqf.unt.edu.ar

RESUMEN

El objetivo es investigar y comparar la microflora autóctona de la superficie de naranjas de la provincia de Tucumán obtenidas de diferentes establecimientos y seleccionar las bacterias lácticas presentes para posteriores estudios de interés para su aplicación industrial. Las naranjas se obtienen de un mercado de frutas y verduras frescas y una citrícola antes de la etapa de lavado. Se lavan tres veces con 10 ml de agua destilada estéril, se recoge el agua de lavado y se realizan diluciones sucesivas. 0,1 ml de cada dilución se siembra por duplicado en medios Plate Count Agar (PCA) para recuento de aerobios totales; MRS agar (1,5%), pH 5 y 6,5 adicionado con Pimaricina (1,3 y 10 µg/ml) para inhibir el crecimiento de células eucariota, para bacterias lácticas (MRS-P) y Mac Conkey Agar para bacterias coliformes. Los medios PCA y Mac Conkey se incuban en aerobiosis y MRS-P en microaerofilia durante 10 días a 30ºC. Las colonias se clasifican en base a coloración de Gram y reacción de catalasa. Se seleccionan de medio MRS-P las colonias Gram positivas, catalasa negativas pertenecientes al grupo de bacterias lácticas para su posterior identificación. La mayor carga microbiana corresponde a los primeros lavados de las frutas y varía significativamente según su origen. En medio PCA se obtiene un recuento promedio de 6,34 y 3,28 log ufc/ml para naranjas obtenidas de mercado y citrícola, respectivamente. En las muestras de naranjas provenientes de citrícola, las levaduras constituyen la microflora predominante y no se observa crecimiento microbiano en medio Mac Conkey o MRS-P pH 5,0. En medio MRS-P pH 6,5 el incremento en la concentración del antibiótico inhibe el crecimiento de las células eucariota, pero no se detectan bacterias lácticas. En las muestras de naranjas del mercado en medio PCA se aíslan principalmente colonias blancas correspondientes a cocos dispuestos en racimos irregulares o de a pares Gram positiva, catalasa positiva. La prueba de la coagulasa positiva indicaría que corresponderían a algunas especies del genero *Staphylococcus*, posiblemente *Staphylococcus aureus*. En medio MRS-P pH 6,5 se aíslan en el orden de 10^1 ufc/ml bacterias Gram positivas, catalasa negativas con morfología de bacilos cortos dispuesto de a pares pertenecientes al grupo de las bacterias lácticas. En el medio selectivo Mac Conkey se encuentran colonias rosa fermentadoras de lactosa correspondientes a bacilos cortos Gram negativa, catalasa positiva. En conclusión las naranjas obtenidas de una citrícola presentan una carga y composición microbiana significativamente menor y diferente que las naranjas provenientes de un puesto de frutas del mercado. Estas últimas presentan bacterias con reacciones de Gram y catalasa positivas y del grupo de las bacterias coliformes. Las bacterias lácticas no constituyen la microflora predominante de las superficies de las naranjas en estudio. Se seleccionan las colonias aisladas provenientes de las muestras obtenidas del mercado.

ABSTRACT

The objective of this study was to investigate the indigenous microflora from oranges surface obtained from different origins and to determine the lactic acid bacteria population (LAB), which are of interest to further studies for industrial application. Oranges were obtained from a gondola of supermarket and a citrus juice processing plant before washing. Oranges were washed three times with 10 ml of sterile distilled water and each water washing was collected under sterile conditions. From each water washing 0.1 ml aliquots (diluted if necessary) were inoculated by duplicate in media Plate Count Agar (PCA) for total aerobic count, MRS agar (1.5%) pH 5 and 6.5 added with Pymaricin (1.3 and 10 µg/ml) to inhibit growth of eukaryotic cells, for lactic acid bacteria (MRS-P) and, Mac Conkey agar for coliform bacteria. The PCA and Mac Conkey media were incubated aerobically and MRS-P agar

under microaerofilic conditions during 10 days at 30°C. From MRS-P plates, colonies Gram positive, catalase negative belonging to the group of lactic acid bacteria were selected for subsequent identification. The highest microbial load corresponded to the first sample of water washing and the number changed significantly according to their origins. On PCA media an average count of 6,34 and 3,28 log ufc/ml were obtained for oranges from market and processing plant, respectively. In the last case, the yeasts were the predominant microflora and no microbial growth was observed on Mac Conkey and MRS-P, pH 5.0 media. On MRS-P pH 6.5 plates, the increased of the antibiotic concentration inhibited the eukaryotic cells growth, however LAB were not detected. In samples of oranges obtained from market, white colonies, Gram positive, catalase positive with morphology of irregular cocci arranged in clusters or pairs were isolated from PCA plates. Coagulase positive reaction indicated that they could belong to some species of the genus *Staphylococcus*. LAB were isolated on MRS-P agar, pH 6.5 in the order of 10^1 cfu/ml, and they corresponded to short bacilli morphology arranged in pairs. On Mac Conkey pink colonies, Gram negative, catalase positive were observed. In conclusion orange samples obtained from a citrus juice processing plant shown a microbial load and composition significantly smaller and different than oranges from a fruit market. In the last case bacteria Gram reaction and catalase positive and coliform bacteria were observed. LAB were not the predominant microflora of the orange surfaces analyzed in the present study.

PALABRAS CLAVE: *naranjas, aislamiento e identificación, bacterias lácticas.*

KEYWORDS: *oranges, isolation and identification, lactic acid bacteria.*

INTRODUCCIÓN

El jugo fresco de frutas cítricas es el jugo puro obtenido de la fruta madura que no ha sido sometido a proceso de pasteurización, congelado o concentrado después de la extracción. Aunque su elaboración involucra menos procedimientos que en el caso de los jugos pasteurizados, su precio en el mercado es generalmente mayor. El consumidor valora principalmente su sabor natural y calidad.

La composición química, propiedades físico-químicas y naturaleza de la fruta seleccionan principalmente el tipo de microorganismos presentes (Sajur *et al.* 2007). Sin embargo, su manipulación durante la cosecha, transporte y posterior tratamiento también influyen en el proceso de contaminación posibilitando la incorporación de microorganismos alterantes y/o patógenos. En jugos cítricos se ha demostrado principalmente la presencia de microorganismos acidófilos, especialmente bacterias lácticas (BL) y levaduras. Microorganismos patógenos pueden desarrollar en las frutas debido a la proximidad con el suelo durante su cultivo y recolección y/o por el empleo de aguas de riego contaminadas (Khan *et al*. 2007, Krause *et al.* 2001).

Actualmente los consumidores escogen alimentos naturales mínimamente procesados, es decir que mantengan las características sensoriales del producto fresco durante el mayor tiempo posible y sean seguros desde el punto de vista higiénico-sanitario, sin necesidad de emplear tecnologías agresivas como tratamientos térmicos o el empleo de conservantes químicos tradicionales para su conservación (Tiwari *et al.* 2008, Ferrante *et al*. 2007, Sentandreu *et al.* 2006).

La contaminación microbiológica es uno de los problemas más importantes en el desarrollo de estos productos alimenticios. Nguyen-The y Carlin (1994) reportó que durante la elaboración de jugo de frutas tiene especial importancia la fase de cortado ya que destruye la barrera natural de protección de la fruta y facilita la disponibilidad de nutrientes celulares (azúcares y otros) que determinan la contaminación microbiológica.

Las BL han sido implicadas en el deterioro de frutas, jugos de frutas y productos relacionados. Tajchakavit *et al*., (1998) demostraron que *Lactobacillus* y *Leuconostoc* sp. desarrollan en jugo de manzana otorgándole un indeseable aroma mantecoso por la producción de diacetilo, un marcado carácter láctico por la formación de ácido láctico e hinchamiento del envase por la formación de CO_2.

El objetivo de éste trabajo es investigar y comparar la microflora autóctona presente en las superficies de naranjas obtenidas de un puesto de venta al público de un mercado y un establecimiento de elaboración de jugos cítricos de la provincia de Tucumán. Aislar y seleccionar la microflora láctica para posteriores estudios de interés para su aplicación industrial.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

Las naranjas se obtienen de un puesto de venta al público de un mercado de frutas y verduras frescas y una planta elaboradora de jugos cítricos (citrícola). Estas últimas se recolectan antes de la etapa de lavado para su procesamiento industrial.

Determinación de la carga microbiana

La superficie de las naranjas se lava tres veces con 10 ml de agua destilada estéril, se recoge el agua de cada lavado y se determina su carga microbiana por el método de las diluciones sucesivas (ufc/ml). 0,1 ml de cada dilución se siembra en los medios Plate Count Agar (PCA) para recuento de aerobios totales; MRS agar (1,5%), pH 5 y 6,5 adicionado con Pimaricina (1,3 y 10 µg/ml) para inhibir el crecimiento de células eucariota, para bacterias lácticas (MRS-P) y Mac Conkey Agar para bacterias coliformes.

Condiciones de Incubación

Las placas de PCA y Mac Conkey se incuban en aerobiosis y las de MRS-P agar en microaerofilia durante 10 días a 30ºC.

Análisis de la microflora autóctona

Los microorganismos aislados a partir de las colonias se clasifican en base a coloración de Gram, reacción de catalasa y morfología celular. Se seleccionan de medio MRS-P las colonias Gram positivas, catalasa negativas pertenecientes al grupo de BL para su posterior identificación**.**

Identificación de BL

Las BL se identifican fenotípicamente en base a morfología celular, producción de amoníaco a partir de arginina (Devriese *et al*. 1993), producción de gas a partir del metabolismo de glucosa en medio Gibson, tipo de isómero del ácido láctico formado a partir de glucosa determinado por métodos enzimáticos, capacidad para desarrollar a diferentes temperaturas (15, 30, 37 y 45ºC) y pH (4,8 y 6,5). Las cepas de *Lactobacillus plantarum* se identifican genotípicamente por el método de PCR específica de especie (Torriani *et al*. 2001) que amplifica un fragmento del gen *recA*. Los productos amplificados se visualizan, luego de la corrida electroforética, en gel de agarosa al 1.5% (p/v) teñido con bromuro de etidio.

Análisis Estadístico

Las determinaciones se realizan por duplicado y replicadas tres veces. Para validar los resultados el método de "studen´s t-test" fue aplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Carga microbiana en naranjas obtenidas de planta procesadora

En la **Tabla 1** se observa los recuentos microbianos obtenidos en medios PCA, MRS agar Suplementado o no con pimaricina y Mac Conkey para las muestras de agua de lavado. En medio PCA el recuento de microorganismos aerobios totales promedio correspondientes a las muestras obtenidas de los tres lavados es 3,28 log ufc/ml. La mayor carga microbiana se detecta en la muestra correspondiente al primer lavado con una concentración celular de 3,51 log ufc/ml. En el segundo lavado la población disminuye casi 1 ciclo logarítmico y luego se mantiene constante. Sajur *et al.* (2007) demostraron que el recuento de bacterias aerobias mesófilas en la superficie de tomates estuvo en el orden de 10^4 ufc/ml.

En medios MRS agar sin antibiótico a pH 5,0 no se aíslan microorganismos. A pH 6,5 las levaduras constituyen la microflora predominante y no se detectan BL, lo que indicaría que las levaduras estarían controlando su desarrollo en el medio natural. Este hecho podría estar relacionado con los numerosos requerimientos nutricionales en factores de crecimiento de las BL para desarrollar (Saguir y Manca de Nadra 2002, 2007) lo que favorecería el crecimiento de las levaduras por competición nutricional o a productos metabólicos liberados por las levaduras como SO_2, etanol o ácidos orgánicos (Comitini *et al*. 2005).

En ésta condición la adición de pimaricina en baja concentración inhibe parcialmente el desarrollo levaduriforme, sin embargo éstas continúan siendo predominantes impidiendo el crecimiento y la detección de BL. A pH 6,5 el incremento en la concentración del antibiótico inhibe el crecimiento microbiano. En ninguna de las muestras de agua de lavado se observa desarrollo en medio Mac Conkey, indicando la ausencia de bacterias coliformes. Por el contrario, Sajur *et al*. (2007)

demostraron la presencia de Enterobacterias en la superficie de tomates de fincas cosechados en la provincia de Tucumán. Similar resultado fue demostrado por Drosinos *et al.* (2000).

Tabla 1. Cuantificación de la microflora autóctona de la superficie de naranjas provenientes de una planta elaboradora de jugos cítricos (citrícola).

Muestras	Recuentos microbianos (Log UFC/ml) en medios						
	PCA	MRS agar		MRS-P agar			Mac Conkey
		pH 5,0	pH 6,5	pH 5,0a	pH 6,5a	pH6,5b	
Primer lavado	3,51	SC	2,81	SC	2,81	SC	SC
Segundo lavado	2,87	SC	2,54	SC	2,16	SC	SC
Tercer lavado	2,95	SC	2,06	SC	1,87	SC	SC

[a:] Concentración de pimaricina: 1,3 µg/ml
[b:] Concentración de pimaricina: 10 µg/ml
SC: sin crecimiento

Cuantificación e identificación de la población microbiana en la superficie de naranjas obtenidas de un puesto de venta al público de mercado de frutas y verduras

En la **Tabla 2** se observan los recuentos microbianos obtenidos a partir de las muestras de agua de lavado de naranjas provenientes de puesto de mercado en medio PCA, MRS adicionado o no con pimaricina y Mac Conkey. En medio PCA se determina un recuento promedio de las tres muestras de agua de lavado de 6,34 log ufc/ml, indicando que la carga microbiana en esta condición es significativamente mayor que la obtenida de naranjas de planta elaboradora de jugos cítricos. Éste resultado demuestra la importancia del origen, manipuleo y tratamiento de la fruta en relación con la población microbiana presente en el medio natural. Recientemente, Shashidhar *et al.* (2007) indicaron la necesidad de asegurar la calidad microbiológica de frutas y vegetales frescos durante su manipuleo y posterior procesamiento. En medio PCA se aíslan principalmente colonias blancas correspondientes a bacterias con morfología de cocos dispuestos en racimos irregulares o de a pares, Gram y catalasa positivas. La prueba de la coagulasa positiva indicaría que corresponden a algunas especies del genero *Staphylococcus*, posiblemente *Staphylococcus aureus*. Sajur *et al.* (2007) demostraron la presencia de cepas de *Staphylococcus aureus* en puré de tomate, las cuales fueron inhibidas por el crecimiento y metabolismo de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* Tsc durante el almacenamiento a 30ºC. En menor proporción se aíslan levaduras y colonias blancas o grises correspondientes a bacterias Gram postivas, catalasa negativas pertenecientes al grupo de las BL.

Tabla 2. Cuantificación de la microflora autóctona de la superficie de naranjas provenientes de un mercado de frutas y verduras frescas.

Muestras	Recuentos microbianos (Log UFC/ml) en medios						
	PCA	MRS agar		MRS-P agar			Mac Conkey
		pH 5,0	pH 6,5	pH 5,0a	pH 6,5a	pH6,5b	
Primer lavado	6,96	2,61	5,58	2,32	4,56	2,30	3,27
Segundo lavado	5,97	2,27	5,19	2,24	3,51	3,08	2,68
Tercer lavado	5,76	2,93	4,63	1,90	2,46	2,71	2,65

[a:] Concentración de pimaricina: 1,3 µg/ml
[b:] Concentración de pimaricina: 10 µg/ml

En medio MRS pH 6,5 adicionado con la menor concentración de pimaricina (1,3 µg/ml) se aíslan en el orden de 10^1 ufc/ml bacterias Gram positivas, catalasa negativas, inmóviles, no esporuladas, principalmente con morfología de bacilos cortos dispuestos de a pares o cadenas cortas pertenecientes al grupo de las BL. En presencia de 10 µg/ml del antibiótico se inhibe completamente el desarrollo de células eucariotas detectándose solamente BL en el orden de 10^2 ufc/ml. Los resultados indican que el número promedio de BL de las superficies de naranjas de puesto de venta al público se encuentra en el orden de 10^1 ufc/ml. Saguir *et al.* (2009) demostraron que el número de BL en jugo de uva estuvo en el orden de 10^3 ufc/ml. Bae *et al.* (2006) determinaron que la población inicial de BL de la superficie de uvas fue muy baja y menor a 10^2 ufc/g. La identificación preliminar a nivel fenotípico de colonias de BL seleccionadas al azar de los medios MRS-P indica que la mayoría de las cepas pertenecen al género *Lactobacillus*. Empleando la técnica de PCR específica de especie se identifica la presencia de aislados pertenecientes a la especie *Lactobacillus plantarum.*

En el medio selectivo Mac Conkey se observa desarrollo de colonias rosas constituidas por bacterias con morfología celular de bacilos cortos, Gram negativas, catalasas positivas pertenecientes al grupo de las Enterobacterias, con capacidad para fermentar la lactosa del medio selectivo. La presencia de bacterias coliformes representaría un potencial riesgo para la salud del consumidor. Ghenghesh *et al.* (2005) demostraron en jugo de frutas que en la mayoría de los jugos exprimidos desarrollaron bacterias que pueden producir diarrea en el consumidor, lo que indicaría que estos jugos no cumplen con las normas de calidad requeridas. Detectaron la presencia de cepas de *Escherichia coli*, de las cuales ninguna aglutinó con el antisuero específico de *E. coli* O157.

Por otro lado los resultados obtenidos indican que el lavado de las cáscaras de naranjas con agua destilada estéril durante tres veces consecutivas a temperatura ambiente no es suficiente para eliminar completamente la carga microbiana de las superficies, incluyendo microorganismos potencialmente patógenos, lo que constituiría un riesgo para la salud del consumidor. Así, en la muestra de agua destilada correspondiente al tercer lavado se obtiene un recuento de microorganismos mesófilos aerobios y bacterias coliformes en los medios PCA y Mac Conkey alrededor de 10^5 y 10^2 ufc/ml, respectivamente (Tabla 2). Pao y Brown (1998) demostraron que la carga microbiana mesófila de la superficie de naranjas se redujo alrededor de 2 ciclos logarítmicos por efecto del lavado y encerado de las naranjas.

CONCLUSIONES

La microflora autóctona de las superficies de naranjas obtenidas de un puesto de venta al público de un mercado y un establecimiento de elaboración de jugos cítricos de la provincia de Tucumán muestran diferencias significativas en cuanto a su composición y niveles de concentración. Este resultado confirma la importancia que presentan los procesos de manipulación y tratamiento de las frutas en relación con la microflora presente en el medio natural.

Las naranjas obtenidas de la citrícola presentan una carga microbiana menor que las naranjas provenientes del puesto de ventas al público. Las levaduras constituyen la microflora predominante y no se detectan BL, ni bacterias coliformes.

Las naranjas obtenidas del puesto de venta al público presentan elevados niveles de microorganismos mesófilos aerobios totales constituyendo las bacterias con reacciones de Gram, catalasa y coagulasa positivas la microflora predominante. Se aíslan además levaduras, BL y bacterias pertenecientes al grupo de las Enterobacterias, lo que constituye un potencial riesgo para la salud del consumidor.

Las BL aisladas de las naranjas del puesto de venta al público identificadas genotípicamente como *Lactobacillus plantarum* se seleccionan para posteriores estudios de interés para su aplicación industrial.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bae S, Fleet GH, Heard GM. 2006.Lactic acid bacteria associated with wine grapes from several Australian vineyards. Journal of Applied Microbiology**,** 100(4):712-27

Comitini F, Ferretti R, Clementi F, Mannazzu I, Ciani M. 2005. Interactions between Saccharomyces cerevisiae and malolactic bacteria: preliminary characterization of a yeast proteinaceous compound(s) active against Oenococcus oeniJournal of Applied Microbiology. 99(1):105-11.

Devriese LA, Pot B, Collins MD. 1993. Phenotypic identification of the genus Enterococcus and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. Journal Applied Bacteriology, 75(5):399-408.

Drosinos EH, Tassou C, Kakiomenou K, Nychas G-J E.2000. Microbiological, physico-chemical and organoleptic attributes of a country tomato salad and fate of *Salmonella enteritidis* during storage under aerobic or modified atmosphere packaging conditions at 4°C and 10°C. Food Control, 11:131-135.

Ferrante S, Guerrero S, Alzamorat SM. 2007. Combined use of ultrasound and natural antimicrobials to inactivate Listeria monocytogenes in orange juice. Journal of Food Protection, 70(8):1850-6.

Ghenghesh KS, Belhaj K, El-Amin WB, El-Nefathi SE, Zalmum A. 2005. Microbiological quality of fruit juices sold in Tripoli–Libya. Food Control, 16(10): 855-858

Khan AA, Melvin CD, Dagdag EB. 2007. Identification and molecular characterization of Salmonella spp. from unpasteurized orange juices and identification of new serotype Salmonella strain S. enterica serovar Tempe. Food Microbiology. 24(5):539-43.

Krause G, Terzagian R, Hammond R. 2001. Outbreak of Salmonella serotype Anatum infection associated with unpasteurized orange juice. South Medical Journal, 94(12):1168-72

Nguyen-The C, Carlin F. 1994. The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. Crit. Rev. Food Science Nutrition, 34: 371-401.

Nguyen-The C, Carlin F. 2000. Fresh and processed vegetables. In B.M. Lund, T. C. Baird-Parker, & G. W. Gould (Eds.), The microbiological safety and quality of food Gaithersburg, Maryland: Aspen Publishers, Inc. 620–684.

Pao S, Brown GE. 1998. Reduction of microorganisms on citrus fruit surfaces during packinghouse processing. Journal of Food Protection, 61: 903- 906.

Saguir MF, Manca de Nadra MC. 2002. Effect of L-malic and citric acids on the essential amino acid requirements for *Oenococcus oeni* growth. Journal of Applied Microbiology, 93: 295-301.

Saguir MF, Manca de Nadra MC. 2007. Improvemnet of a chemically defined medium for the sustained growth of *Lactobacillus plantarum* nutritional requirements. Journal of Applied Microbiology. 104(6):1597-604.

Saguir MF, Maturano C, Loto Campos IE, Manca de Nadra MC. 2009. Identification of dominant lactic acid bacteria isolated from grape juices. Assessment of its biochemical activities relevant to flavor development in wine. International Journal of Wine Resarch 2009:1 : 175-185.

Sajur SA, Saguir MF, Manca de Nadra MC. 2007. Effect of dominant specie of lactic acid bacteria from tomato on natural microflora development in tomato purée. Food Control, 18: 594-600.

Sentandreu E, Carbonell L, Rodrigo D, Carbonell JV. 2006. Pulsed electric fields versus thermal treatment: equivalent processes to obtain equally acceptable citrus juices Journal of Food Protection, 69(8):2016-8.

Shashidar SR, Dhokane VS, Hajare SN, Sharma A, Bandekar JR. 2007. Effectiveness of Radiation Processing for Elimination of *Salmonella* Typhimurium from Minimally Processed Pineapple (*Ananas comosus* Merr.). 72 (3):98-101

Tajchakavit S, Ramaswamy HS, Fustier P. 1998. Enhanced destruction of spoilage microorganisms in apple juice during continuous flow microwave heating. Food Research International, 31: 713-722.

Tiwari BK, Muthukumarappan K, O'Donnell CP, Cullen PJ. 2008. Effects of sonication on the kinetics of orange juice quality parameters. Journal Agricultural and Food Chemistry, 56(7):2423-8.

Torriani S, Clementi F, Vancanneyt M, Hoste B, Dellaglio F, Kersters K. 2001. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus* and *L. paraplantarum* Species by RAPD-PCR and AFLP. Systematic and Applied Microbiology, 24(4):554-560

Caracterización Microbiológica y Fisicoquímica de Miel de Yateí en la provincia de Misiones

Microbiology and physicochemical characterization of Yateti honey from Misiones

Pucciarelli AB, Schapovaloff ME, Kumritz S, Señuk IA, García MA,(*)Brumovsky LA

Laboratorio de Microbiología de Alimentos y Biotecnología "Dr. Fernando Benassi". Facultad de Ciencias Exactas, Química y Naturales-Universidad Nacional de Misiones (UNaM) - Posadas, Misiones. (*)Fundación DINCYT (Desarrollo e Investigación Científica y Tecnológica) Posadas - Misiones-mima@fceqyn.unam.edu.ar

RESUMEN

La miel de abejas sin aguijón *Tetragonisca angustula*, llamada Yateí en Argentina, es conocida por sus propiedades medicinales contra diferentes dolencias. Debido al reciente interés y comercialización de la miel melipona, se comenzó a caracterizar microbiológica y fisico-químicamente dicha miel con el objeto de sugerir estándares para su control de calidad. Los resultados promedios obtenidos sobre 40 muestras mostraron que el 95 % de los recuentos de hongos y levaduras y el 10 % de recuentos de mesófilos aerobios totales fueron mayores a los valores límites de la legislación Europea para miel de Apis (10^2 y 10^4 ufc/g respectivamente). Los porcentajes de los microorganismos evaluados en las muestras fueron: Enterococos (20 %); *Staphylococcus aureus* (18 %); *Bacillus* spp. (32 %) y *Clostridium* spp. (30 %); *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. (Ausencia). Los parámetros fisicoquímicos promedios fueron: pH (4,2); acidez (74,3 meq/kg); humedad (24,3 %); cenizas (0,39 g %); Azúcares (g/100 g de miel): fructosa (21,5); glucosa (15,5); maltosa (1,1 g en el 53 % de las muestras) y ausencia de sacarosa; sodio (17,1 mg/100 g) y potasio (217,4 mg/100g). Estos datos constituyen un aporte importante desde el punto de vista sanitario para su producción y comercialización.

ABSTRACT

Honey of the stingless bee *Tetragonisca angustula*, called Yateí in Argentina; is known a medicine properties against different ailments. Due to the recent interest in the production and trading of meliponine honey, we started characterizing the microbiological and physicochemical characterist with the purpose to suggest standars for quality control. The average values obtained in 40 samples were: 95% Fungi counts and 10% Mesophilic Aerobic Count were higher than the limit values of European legislaction for *Apis mellifera* honey (10^2 and 10^4 cfu/g respectivelly); The porcentage of microorganisms in samples were: 20% *Enterococcus* spp; 18% *Staphylococcus aureus;* 32% *Bacillus* and 30% *Clostridium spp;* ausence *of Escherichia coli* and *Salmonella* spp.*;* The average physicochemical parameters were: pH (4,2); acidity (74.3 meq/Kg); moisture (24,3%); ash (0,39%); Total sugars (g/100g honey): fructose (21.5); glucose (15.5); maltose(1.1g in 53% of samples) and ausence de sacarose; sodium (17.1 mg/100g) and potasium (217,4 mg/100g). The data is an important contribution from the sanitary point of view for production and trading of this particular honey.

PALABRAS CLAVE: *miel de yateí, flora microbiana, parámetros fisicoquímicos¸ Tetragonisca angustula.*

KEYWORDS: *yatei honey, microbiological characterist, physicochemical characterist.*

INTRODUCCIÓN

La abeja Yateí (*Tetragonisca angustula fiebrigii*) de la subfamilia *Meliponinae* es una especie que habita zonas con climas tropicales y subtropicales y en el Continente Americano se extiende desde el noreste de Argentina: Provincias de Misiones, Chaco, Formosa y Corrientes, hasta México (Nogueira-Neto, 1970). Son nativas de América, a diferencia con las abejas *Apis mellifera* que han sido traídas por los españoles. No poseen aguijón, son de menor tamaño que las abejas tradicionales, de vuelo más corto, visitan especies florales que en algunos casos las Apis no lo hacen, y son sociales.

(Meliponicultura, 2004). Actualmente, son conocidas cerca de 500 especies distribuidas en aproximadamente 40 géneros (Crane, 1994).
Estas abejas son importantes para el medio ambiente porque son polinizadores de plantas silvestres, responsables de la fecundación de más del 98 % de los árboles y arbustos nativos. Sin embargo debido a que la masa boscosa del continente Sudamericano está decreciendo, también la cantidad de melipónidos van camino a la extinción.
La abeja melipona produce miel, polen, cera y propóleos, su miel es exquisita y se le atribuye un importante potencial curativo para una serie de dolencias y enfermedades, lo que hace su consumo muy potencial (Costa *et al.* 2004).
Las características organolépticas de la miel que posee dulzura y aroma particular, dependen del contenido de azúcares, madurez y presencia de compuestos activos: glicósidos, aminoácidos, isoprenoides, alcaloides, flavonoides, ácidos orgánicos, cumarinas y otros compuestos fenólicos, los cuales aportan propiedades especiales y definen su *flavor*. La composición química de esta miel también difiere de la miel producida por *A. mellifera*, siendo menos viscosa, menos dulce (composición de azúcares simples y ausencia de sacarosa); más ácida y contiene mayor porcentaje de agua, por lo cual se debe tener cuidado en su conservación. El contenido de agua en la miel depende de la época de cosecha, el grado de madurez de la colmena y factores climáticos. En base a ello se sugiere que los estándares de calidad deben ser diferentes; y algunos autores proponen estándares fisicoquímicos que manifiestan diferencias entre la miel genuina de *A. mellifera* y la miel de los géneros Melipona (Vit *et al.* 2004, Rodriguez *et al.* 2003, Estupiñan *et al.* 1998)
Los principales peligros asociados a la miel son de tipo microbiológico. En la miel existen dos fuentes de contaminación con microorganismos: una primaria que incluye al polen, tracto digestivo de las abejas, polvo, aire, tierra, néctar, etc., los cuales resultan muy difícil de controlar; y la otra secundaria debido a procedimientos de manipuleo por el hombre (contacto con piel, aire, equipamiento, contaminación cruzada, etc.), que pueden ser controlados utilizando buenas practicas de manufactura (BPM) durante la recolección y procesamiento. Los mohos y las levaduras osmófilas representan las formas más abundantes y son los responsables de la fermentación que incrementa la acidez cuando existen elevados niveles de humedad (mayor a 21 %) (Finola *et al.* 2006). En la miel de Yateí se han hallado recuentos considerables de levaduras (*Starmerella meliponinarum*, *Aureobasidium pullulans*, *Rhodotorulla* spp. y *Zygosaccharomyces bisporus-like.)* La levadura *S. meliponinarium* es una especie nueva aislada a partir de muestras de abejas adultas, de la miel, del polen, del néctar, etc., de *Tetragonisca angustula*. Se alude que dicha levadura es metabolitamente activa y hábil para crecer a expensas de los azúcares presentes en esa fuente, mejorando su calidad nutricional. No obstante las levaduras *A. pullulans* y *Rhodotorulla* spp., son géneros asociados con plantas y flores en general, y se creen son flora transitoria transportada por las abejas. En cambio la especie *Zygosaccharomyces rouxii* son agentes deteriorantes de alimentos azucarados y su presencia disminuye la calidad del alimento (Rosa *y col.*, 2003).Las bacterias comúnmente aislados en las mieles pertenecen a los géneros *Bacillus* spp. y *Clostridium* spp. Las formas vegetativas no suelen encontrarse, pero en mieles maduras recién cosechadas se encuentran un recuento elevado y estaría indicando contaminación reciente (Finola *et al.* 2006).
La meliponicultura cada día cobra mayor importancia como fuente generadora de recursos y como promotora de la diversidad biológica (Salamanca *y col.*, 2000). Misiones por las características únicas de su ecosistema natural, reflejado en su variada flora, puede constituirse en poco tiempo en productora de una miel de características diferenciadas, con excelentes perspectiva de comercialización. En la zona esta miel se produce y comercializa sin contar con estudios de calidad ni de identidad, por lo que es prioritario realizar los mismos a fin de obtener un producto de buena calidad, con identidad de origen, destinada a distintos segmentos del mercado. En Misiones se realizaron varios encuentros entre los productores de miel de Yateí, quienes manifestaron su interés en temáticas como ser: condiciones de salubridad en el melado; manejo y envasado de la miel; propiedades organolépticas de la miel, diferenciación de otras mieles; propiedades fisicoquímicas y microbiológicas requeridas para establecer calidad y adulteración; usos medicinales y nutricionales de la miel de Yateí; control de calidad y registro en el sistema alimentario nacional.
El objetivo de este trabajo fue determinar la calidad microbiológica y evaluar parámetros fisicoquímicos de la miel de Yateí producida en distintas zonas fitogeográficas de la provincia de

Misiones, para caracterizarla, valorizar su comercialización y colaborar con las propuestas de valores de referencia y su certificación frente a entidades bromatológicas nacionales y/o internacionales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de Miel

Se analizaron 40 muestras de miel de Yateí que fueron recolectadas a temperatura ambiente de días soleados (30-35 ºC), en diferentes períodos de floración y etapas de producción, las cuales se clasificaron según la zona de obtención en: urbanas (13), suburbanas (12) y rurales (15). Cada muestra de miel se extrajo en forma aséptica con jeringas estériles, sin agujas, conservándose a 5 ºC hasta el momento del procesamiento; se acompañó de un espécimen entomológico consistente en 3-5 abejitas conservadas en etanol al 70 % para su correspondiente montaje e identificación.

Análisis microbiológico

Se determinó su flora microbiana por recuento de bacterias y hongos filamentosos y levaduras, a fin de caracterizar microbiológicamente a este tipo de miel con la metodología basada en Food and Drug Administration-Bacteriological Analytical Manual (FDA-BAM)- AOAC. Los recuentos se obtuvieron con distintas diluciones de agua peptonada estéril al 0,1 %, se realizaron con siembra por duplicados expresando el resultado como unidades de colonias formadas por gramo de miel (ufc /g).

Recuento de Bacterias Aerobias Mesófilas Totales

Se sembraron las diluciones en una serie de placas de Petri estériles, con 15mL de PCA (Plate Count Agar), fundido y mantenido a 46 ± 1 °C. Se incubaron 35°C, durante 48 horas.

Recuento de bacterias coliformes totales y coliformes fecales

Coliformes totales: Se utilizó el método de fermentación de los múltiples tubos, con la expresión de resultados como Número Más Probable/g (NMP/g), utilizando caldo Lauril Sulfato como medio de enriquecimiento que fueron confirmados en caldo Brilla, incubándolos a 35 °C durante 48 horas; leyendo el recuento de microorganismos en la Tabla de Mann.

Coliformes fecales: A partir de los tubos positivos de Coliformes, se sembró una ansada en tubos con caldo Brilla que se incubaron en baño termostático a 44 ± 0,5 °C, durante 24 horas. Con los tubos (+) y (-) se leyó el recuento de microorganismos en la Tabla de Mann.

Pruebas confirmatorias: Escherichia coli. Desde un tubo positivo de Coliformes fecales, se sembraron para aislamiento en placas con medio EMB (*Agar Eosina Azul de Metileno*, incubando a 37 ºC durante 24 horas. Las colonias sospechosas de *Escherichia coli* desarrolladas, fueron confirmadas con pruebas diferenciales de IMVIC: Indol, Rojo de Metilo, Voges Proskauer y Citrato.

Recuento de Enterococos

Se utilizó el método de fermentación de los múltiples tubos, con la expresión de resultados como Número Más Probable/g (NMP/g), con caldo Azida Glucosa, incubándolos a 35 °C durante 48 horas. Los tubos (+) se sembraron para aislamiento en agar KF que se incubaron durante 48 horas a 37 °C; las colonias rojas-rosadas se confirmaron con coloración de Gram y pruebas bioquímicas: Caldo BHI + 6,5 % NaCl; Caldo BHI y catalasa. Con los tubos confirmados (+) y (-) se leyó el recuento de microorganismos en la Tabla de Mann.

Recuento de estafilococos coagulasa (+)

Se realizó la siembra en superficie sobre Agar Baird Parker, que se incubaron a 35-37 °C durante 48 horas. Las colonias negras con borde incoloro sospechosas de *Staphylococcus aureus* coagulasa (+), fueron confirmadas con la Coloración de Gram; y pruebas bioquímicas de TSI, Catalasa y coagulasa.

Análisis de Anaerobios Esporulados

Se sembró cada dilución en Agar Clostridios Reforzado fundido y enfriado a 45 ºC, se selló con un tapón de vaselina estéril, incubando los tubos a 35 ºC durante 48 horas, en condiciones anaerobias. Se realizaron las coloraciones de Gram y verde de malaquita, y las pruebas bioquímicas de: lecitinasa, nitratos, lactosa, movilidad, gelatina, y otros.

Determinación de Aerobios Esporulados: Bacillus spp.

Se realizó siembra en superficie con diluciones de la miel sobre agar *Bacillus cereus* Selectivo, incubando a 35 ºC durante 24 horas. Las colonias típicas sospechosas de *B. cereus*, fueron observadas en microscopio para evaluar la presencia de glóbulos de lípidos en las células vegetativas y se realizaron: coloración de Gram; Caldo BHI + 6,5 % NaCl; Caldo BHI; Voges Proskauer modificado; catalasa; gelatina y citrato.

Recuento de hongos y levaduras
Se realizo la siembra con agar Hongos y levaduras con cloranfenicol, que se incubaron a 25-28 ºC, durante 5 a 6 días.
Presencia de Salmonella spp.
pre-enriquecimiento: las muestras fueron homogenizadas en caldo peptonado bufferado incubando durante 24 horas a 35 ºC. Enriquecimiento selectivo; se sembraron al 10 % en caldos Selenito-Cistina(SC) y Rappaport Vassiliades (RV), los cuales se incubaron a Baño maría durante 24 ± 2 horas a 43 ºC. Aislamiento: se utilizaron placas con agar Xilosa-Lisina (XLD) y agar Bismuto-Sulfito (BS), los cuales se incubaron a 35 ºC por períodos variables según los requerimientos. Los ensayos se realizaron por triplicado. Se tomaron cinco colonias sospechosas de *Salmonella* y se incubaron en picos de agar triple azúcar hierro (TSI) y agar lisina hierro (LIA) incubando a 35 ºC durante 24 h, continuando luego con las pruebas bioquímicas compatibles con el género *Salmonella* (ureasa, fenilalanina desaminasa, oxidasa, indol, Voges Proskaur, citrato y otros)

Análisis físico-químico

Se determino el contenido de agua, acidez, pH, azúcares, cenizas, sodio y potasio, adaptando los métodos de análisis que son aplicables a la miel de abejas Apis.
Determinación del contenido de agua
Para muestras total o parcialmente cristalizadas, se pesó 3 g de miel en recipiente hermético y se calentó a baño María (45 ºC), enfriando antes de su utilización. Código Alimentario Argentino (CAA). Se determinó el contenido de agua por el método refractométrico (Chataway-1932, Wedmore -1955)
Determinación de Acidez
Se utilizó la técnica de Bianchi (1986) con algunas modificaciones, basada en la neutralización del ácido fórmico con hidróxido de sodio. Se colocó 2 g de muestra en un vaso de precipitado de 80 mL y se la diluyó con 15 mL de agua destilada previamente hervida y enfriada a fin de eliminar el CO_2. Esta solución se tituló con NaOH 0,1 N con ayuda de un agitador magnético y un medidor de pH hasta alcanzar un pH = 8,3 y que persista durante 30 segundos.
Determinación de pH
Se determino mediante un medidor de pH Orion, modelo 230 A, equipado con electrodo de vidrio y calibrado con buffer pH = 4,0 y pH = 7,0.
Determinación de azúcares
Se empleó un método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), utilizando una columna Amino, marca Alltech Associates, Inc. USA, modelo Altima de 250 mm de longitud y 4,6mm de diámetro. La fase móvil empleada fue Acetonitrilo/Agua en una proporción 70/30, y con un caudal de 1,2 ml/min. Se empleo un detector de Índice de Refracción Diferencial marca Waters modelo 410.
Determinación de cenizas
En un crisol de porcelana se pesaron aproximadamente 2 g de muestra y se adicionaron unas gotas de aceite de oliva para evitar la formación de espuma. Se calentó la misma hasta sequedad y ennegrecimiento, luego se calcino en mufla a 525 ºC ± 25 ºC hasta peso constante.
Determinación de sodio y potasio
Se utilizó un método de fotometría de llama. Para esto, los residuos de la determinación de cenizas se trataron 2 veces con 1,5 ml de ClH 1 N y se llevaron a baño maría hasta sequedad, luego se disolvieron con solución de oxalato de amonio al 1,7 % y se enrasaron en un matraz de 10 mL. Las lecturas se realizaron en un Fotómetro de llama marca Crudo Caamaño modelo Ionometer Alfanumérico, calibrado con soluciones patrones de ClNa y ClK.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis Microbiológico

El recuento de Bacterias aerobias mesófilos totales del 90 % de las mieles de Yatei estudiadas, correspondiente a la zona suburbana, el 81% y 85% de las muestras correspondientes a las zonas urbana y rural respectivamente, se encuentran dentro del límite permisible por la legislación Europea para miel de *Apis mellifera* (1×10^4 ufc/g), como se ve en la **Figura 1**; con un recuento que varia de 30 ufc/g a 3×10^5 ufc/g, con un promedio de $1,2 \times 10^4$ ufc/g, distribuidos en las tres zonas con un valor promedio de: $3,1 \times 10^4$ ufc/g (urbana); $3,7 \times 10^3$ ufc/g (suburbana), y $6,3 \times 10^3$ ufc/g (rural); los microorganismos que forman parte de este grupo son muy heterogéneos donde se incluyen todos aquellos que muestran la capacidad de formar colonias visibles en las condiciones de ejecución de la

prueba. La miel con colonias viables altas (10.000/g) puede ser aceptable si la presencia de levaduras es baja y se encuentra libre de Coliformes totales y fecales (Snowdon and Cliver, 1996). En este estudio se obtuvieron recuentos de colonias viables menores a 10.000/g y libre de Coliformes, pero el recuento de levaduras fueron más elevadas que los valores límite aceptables para miel *Apis mellifera* en todas las muestras.

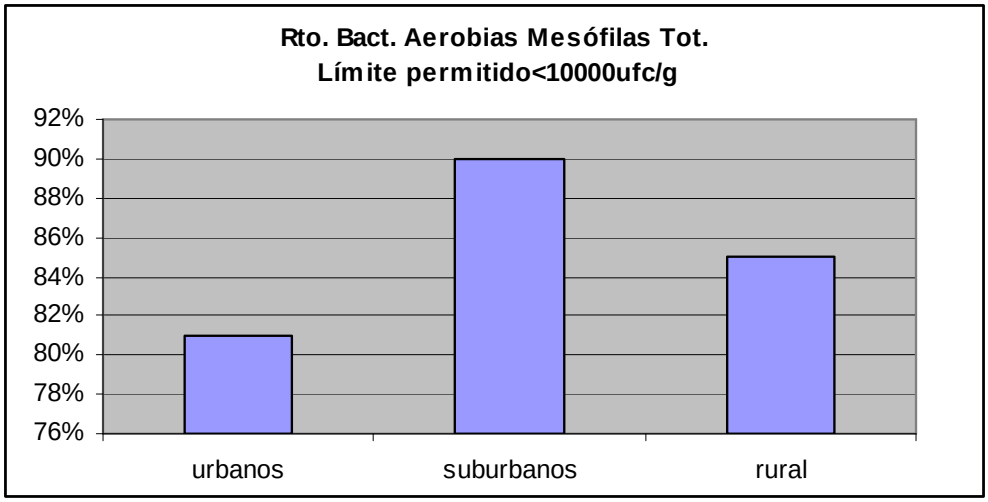


Figura 1

Los porcentajes de muestras positivas para los microorganismos ensayados fueron: 20 % de *Enteroccocus* spp; 18 % de *Staphylococcus aureus*; 32 % de *Bacillus* spp. y 30 % de *Clostridium* spp. Ninguna muestra presentó desarrollo de *Escherichia coli* ni *Salmonella* spp. (**Figura 2**)

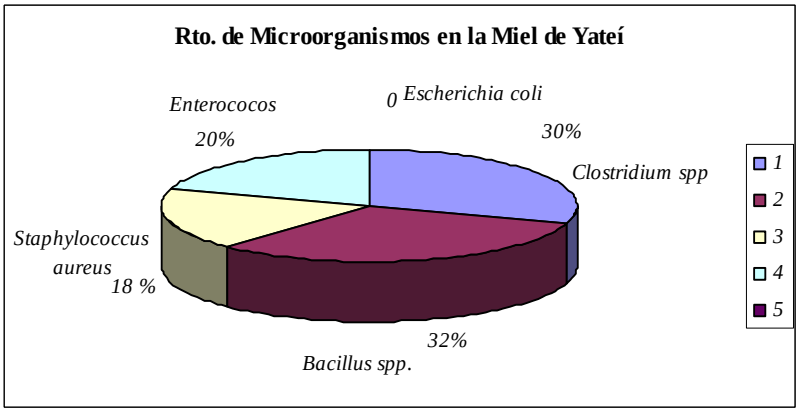


Figura 2

No se detectó presencia de coliformes en ninguna de las muestras analizadas, es decir, todas las muestras presentaron un recuento de coliformes totales menor a 3 NMP/g. Debido a que éstos son muy susceptibles a factores ambientales extremos y su desarrollo se inhibe a pH ácidos (menores a 4,0) su hallazgo en la miel dependerá del nivel de contaminación original y del tiempo transcurrido hasta la ejecución del análisis, es decir, un manejo inadecuado del panal (Salamanca *et al.* 2000). Se observó presencia de *Enteroccocus* spp., en el 20 % de las muestras analizadas; generalmente se observa presencia de este microorganismo, debido a una contaminación secundaria por mal manipuleo de la miel durante la extracción (Finola *et al.* 2006, Iurlina *et al.* 2005); sin embargo todas las muestras fueron tomadas asépticamente, y el resultado de estos microorganismos probablemente se deba a una contaminación primaria y se asocia a condiciones ambientales del lugar.

Dentro de la carga microbiana normal de la miel de abeja se encuentran ciertas bacterias y levaduras, que suele ser baja y proviene de la misma flora bacteriana y fúngica de las abejas, así como del néctar de las flores; generalmente va a estar constituida por esporas del género *Bacillus* y *Clostridium, y* por

levaduras del género *Saccharomyces*, que, cuando crecen y se multiplican, son las causantes de la fermentación de la miel. Por otra parte, se debe tomar en cuenta que una manipulación inadecuada durante la recolección, procesamiento y almacenamiento de la miel, puede llevar a su contaminación de la misma con microorganismos patógenos (Atrouse *et al.*2004, Snowdon *et al.*1996). La presencia de microorganismos aerobios y anaerobios esporulados encontrados confirman que la miel de panal es un vehículo potencial de esporas de los géneros de *Bacillus* y *Clostridium*, así un 30 % de las muestras desarrollaron bacterias Clostridium sulfito-reductoras, y 32 % de las muestras desarrollaron colonias sospechosas de *Bacillus spp.*, donde las colonias correspondientes al 10% de las muestras fueron confirmadas como *Bacillus cereus.* Las formas vegetativas no suelen encontrarse debido a las condiciones hostiles que inhiben su desarrollo, pero se pueden encontrar algunas formas vegetativas y esporos que indicarían contaminación secundaria (Iurlina *et al. 2005*). La presencia de *Clostridium* Sulfito Reductores pueden indicar la presencia de *Clostridium botulinum*, que en la miel de abejas *Apis* esta muy estudiada y se relaciona con el botulismo en los infantes menores de 1 año (Midura 1979, *Nevas*, 2006).
Varios trabajos con mieles de *A. mellífera* confirman la presencia de esporas y el aislamiento de *Bacillus* spp. No obstante, estos microorganismos no tienen acción negativa sobre la miel y no son peligrosos para la salud humana. Por otro lado, se ha encontrado que la presencia de *Bacillus* está asociada comúnmente a las abejas *Apis* y meliponas; y fueron aisladas de abejas obreras, material fecal de larvas y reinas, polen y miel. Además demostraron que este microorganismo en mieles de *Apis* produce sustancias antimicrobianas y numerosas enzimas igual que algunos hongos presentes (Salamanca Grosso *et al.* 2000, Gilliam *et al.* 1997).
El 95 % de las muestras de miel de Yatei presentaron los recuentos de hongos y levaduras mayor al límite permitido por la legislación Europea y MERCOSUR para la miel de *Apis mellifera* (10^2 ufc/g), obteniendo recuentos que varían entre 100 ufc/g a 5 x 10^4 ufc/g con un valor promedio de 7,3 x 10^3 ufc/g; distribuidos en las tres zonas con valor promedio de: 4,8 x 10^3 ufc/g (urbana); 1,1 x 10^4 ufc/g (suburbana) y 8,7 x 10^3 ufc/g (rural).**Figura 3**. Las cepas de levaduras identificadas resultaron el 65 % de *Candida* spp y el 35 % de *Saccharomyces* spp. Sin embargo, nuestros valores de recuento de Hongos y Levaduras son elevados, del orden de magnitud que los valores obtenidos por Rosa *et al.* (2003) en miel de Yatei que es ≈10^4 ufc/g. Regularmente se espera encontrar hongos y levaduras en la miel, pero los niveles son bajos y pueden ser controlados por buenas prácticas higiénicas Los mohos y las levaduras osmófilas representan las formas más abundantes y son los responsables de la fermentación que incrementa la acidez cuando existen elevados niveles de humedad. También algunas especies de hongos aisladas de miel producen sustancias antimicrobianas en niveles superiores que las aisladas de tierra y alimentos (Gilliam *et al.*1997).

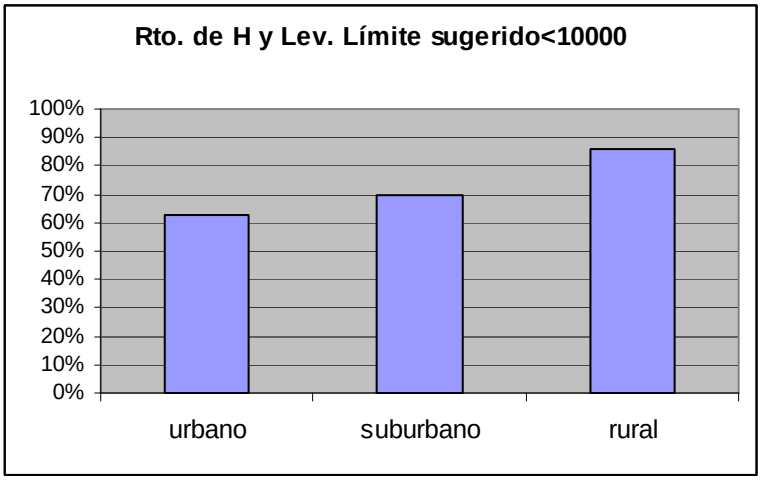


Figura 3

Análisis físicoquímico

Se encuentran detallados en la **Tabla 1**. Los valores de pH del total de las muestras analizadas oscilaron entre un mínimo de 3,5 y un máximo de 5,0 Siendo el valor promedio de 4,2. Bajos valores de pH en mieles inhiben la presencia y el crecimiento de microorganismos (Atrouse *et al.* 2004).

Tabla 1: Parametros fisicoquímicos

	pH	Agua % bh	Fructosa g/100 g	Glucosa g/100 g	Maltosa g/100 g	Azúcares totales g/100g	Cenizas g % bh	Acidez meq/kg	Potasio mg/100 g	Sodio mg/100 g
Mínimo	3,5	21,5	11,9	8,6	0,6	20,5	0,16	29,4	17,8	7,2
Máximo	5,0	27,0	30,1	25,6	1,9	54,8	0,62	126,7	365,3	26,1
Promedio	4,2	24,2	21,5	15,5	1,1	37,7	0,39	74,3	217,4	17,1
SD	0,01	0,11	1,18	1,17	0,14	2,37	0,03	8,49	25,51	1,29
Miel *Apis*		20		45			0,5	40	0,97 ppm	

Entre las características organolépticas, el color de las muestras de mieles analizadas por observación visual corresponden a: 63 % color ámbar claro; 10 % ámbar; y 27 % a mieles oscuras. El color es la primera cualidad que se percibe variando de una miel a otra y va desde blanco agua a oscuro, pasando por tonalidades amarillas, ámbares y marrones. La coloración depende, entre otros aspectos, del origen, del tipo de abejas, de la época del año en que se recolecte y del clima. Las mieles más fluidas poseen un mayor contenido de agua y son, más susceptibles a transformaciones y alteraciones debidas al crecimiento microbiano. El contenido de agua determina también el color, el sabor y la solubilidad (White *et al.* 1962).

El contenido de agua detectable fue entre 21,5 % y 27,0 %, donde se observa que el valor mínimo es superior al límite máximo de agua permitido para la miel *Apis* exigido por el CAA, que es 18 %.

El contenido de agua en la miel *Apis* depende de la época de cosecha, el grado de madurez alcanzado en la colmena y los factores climáticos. Un elevado porcentaje de agua (mayor al 20%) está directamente relacionada con la presencia de microorganismos fermentadores, los cuales se multiplican a medida que esta aumenta, por consiguiente, su determinación es una medida de seguridad alimentaria (Finola *et al.* 2006). Las mieles maduras tienen una aw baja, lo que reducen el espectro de microorganismos sobrevivientes, y la miel de *T. angustula* contiene un porcentaje de agua considerablemente más alto que la miel de *A. mellífera* (De Mera *et al.* 2004), por lo tanto el número de microorganismos existentes en la primera puede ser mayor. Por tal motivo los parámetros de evaluación de calidad microbiológica deben ser diferentes, lo que explicaría los valores elevados obtenidos en los recuentos de microorganismos.

El análisis de estos datos sugiere una gran diferencia entre ambos tipos de miel, y se percibe fenotípicamente en las propiedades organolépticas, dependiendo su color tanto del contenido de cenizas como el origen del néctar. Así, una miel clara se condice con un bajo contenido de cenizas, mientras que mieles oscuras tienen un porcentaje de cenizas elevado. Por otro lado, el origen botánico del néctar afecta también la intensidad de color de la miel haciéndola más clara o más oscura. (Finola *et al.*2006).

El contenido de acidez varió entre 29,4 y 126,7 meq/kg, siendo el promedio de 74,3 meq/kg valor que supera el valor máximo propuesto por el CAA para la miel *Apis* que es de 40 meq/kg.

El contenido de cenizas varió de 0,16 a 0,62 g %, donde el 93 % de las muestras resultó con un valor menor a 0,5 g %; un alto contenido de cenizas indicaría el material polínico obtenido de la gran variación floral con que cuenta los distintos lugares de la provincia de Misiones. Finola *et al*. (2006) describieron que una relación inversa podría ser observada entre la acidez y cenizas, es decir, la acidez decrece lentamente con el aumento de contenido de cenizas y esa dependencia podría estar relacionada considerando que el contenido alto de este mineral en la miel corresponde a una alta fracción de ácidos salinizados presentes.

El contenido de azúcares totales es muy variable, obteniéndose valores entre 20,5 a 54,8 g/100 g de miel, siendo estos valores bastante menores al valor mínimo de azúcares reductores que exige el CAA para miel de Apis (60 g/100 g). El azúcar cuantitativamente más importante fue fructosa (11,9 a 30,2 g/100g) seguido por glucosa (8,6 a 25,6 g/100g), los cuales dependen principalmente de la fuente del néctar. En tanto la maltosa se obtuvo en el 53 % de las muestras analizadas (0,6 a 1,9 g/100 g) y no se detectó sacarosa en ninguna muestra analizada. Cabe mencionar que no se observó cristalización en ninguna de las muestras de miel evaluadas. El contenido de sodio y potasio es muy variable en todas las muestras, el sodio (7,2 a 26,1 mg/100 g) y potasio (17,8 a 365,3 mg/100 g), siendo importante el aporte nutricional del potasio en estas mieles.

CONCLUSIONES

En muestras de miel de Yatei, el 19 % de las muestras de la zona urbana, el 10 % de las muestras la zona suburbana y el 15 % de las zona rural, presentaron Bacterias Aerobias Mesófilas totales superiores a los niveles límite permisible por la legislación Europea y del Mercosur (1×10^4 ufc/g).
El 95 % de todas las muestras mieles de Yatei analizadas presentaron recuentos de hongos y levaduras superiores al límite máximo permisible para miel *Apis mellifera* de la legislación Europea, Mexicana y del MERCOSUR (1×10^2 UFC/g). Se sugiere elevar el valor del límite máximo permisible de 1×10^2 ufc/g a 1×10^4 ufc/g para el recuento de Hongos y Levaduras en miel de Yatei; valor sugerido además por Rosa *et al.* (2003) y Vit *et al.* (2006) para este tipo de miel.
Los coliformes totales no forman parte de la microflora natural de la miel.
La miel de Yateí presenta una flora bacteriana compuesta por micoorganismos esporulados de los géneros *Bacillus* y *Clostridium.*
Esta miel aporta una acidez variable y es mayor que la permitida por las normas para la miel *Apis*.
El contenido de azúcares reductores es bastante menor al contenido mínimo que exige el CAA para la miel de *Apis*. De acuerdo a esto, este contenido mínimo debería definirse para la miel de Yateí, como así el contenido máximo de sacarosa.
El pH de las muestras analizadas es menor al pH de miel *Apis*.
El contenido de agua es mayor que la exigida para la miel *Apis* y se confirma que el estándar propuesto por Vit *et al.* (2004) con un máximo de 30 % es adecuado para este tipo de miel.

AGRADECIMIENTOS

A los productores de miel de Yatei de la provincia de Misiones, a los Ing. Agron. Sergio Feversani y Noelia Ramírez (INTA Oberá).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Atrouse OM, Oran SA & Al-Abbadi SY. 2004. Chemical analysis and identification of pollen grains from different Jordanian honey samples. International Journal of Food Science and Technology. 39, 413–417.

Crane E. 1994.The importance of stingless bees to man in the past. Proceedings of the fifth conference on apiculture in tropical climates. IBRA. Cardiff, 259 - 264.

Costa Neto E, Pacheco J. 2004. Utilizacão medicinal de insetos no povado de Pedra Branca, Santa Teresina, Bahia, Brasil. Universidade Federal de São Carlos, 1-21.

De Mera JH & Angert ER. 2004. Comparison of the antimicrobial activity of honey produced by *Tetragonisca angustula* (Meliponinae) and *Apis mellifera* from different phytogeographic regions of Costa Rica. Apidologie, 35. 411– 417.

Estupiñan S, Sanjuán E, Millán R y González-Cortés A. 1998. Parámetros de calidad de la miel: Microbiología, caracteres físico-químicos y de envejecimiento: Revisión Rev. Alimentaria Nro. 296.

Finola MS, Lasagno MC & Marioli JM. 2006. Microbiological and chemical characterization of honeys from central Argentina. Food Chemistry Elsevier on line

Food and Drug Administration - Bacteriological Anylitican Manual. (FDA - BAM) 1992. Séptima Edición. OAAC.

Gilliam M. 1997- Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees. FEMS Microbiology Letters, 155 -1-10.

Iurlina, MO y col. 2005. "Characterization of microorganisms in Argentinean honeys from different sources" Int. J. Food Microbiol. 105 - 297-304

Meliponicultura**.** Hermanas sin aguijón y miel de oro. Portal Apícola. 29/10/2004. http://www.apicultura.entupc.com

Metodología Analítica Oficial de Miel del Código Alimentario Argentino (CAA) Anexo Mercosur. Ediciones Marzocchi (CAA, Anexo Mercosur, Resol. GMC N° 15/94)

Midura TF; Snowden F; Wood RM; & Arnon SS. 1979. Isolation of *Clostridium botulinum* from Honey. Journal of Clinical Microbiology, 9 (2), 282 – 283.

Nevas.M. 2006- *Clostridium botulinum* in honey production with respect to infant botulism. Department of Food and Environmental Hygiene Faculty of Veterinary Medicine University of Helsinki Helsinki, Finland

Nogueira-Neto P 1970 A Criação de Abelhas Indígenas sem Ferrão. Editora Tecnapis, São Paulo, p 365.

Rodríguez Montoya, M. 2003. Composición, calidad y consumo de miel en España. Observatorio de Seguridad Alimentaria. Universidad Autónoma de Barcelona.

Rosa CA, Lachance MA, Silva JO, Teixeira AC, Marini MM, Antonini Y & Martins RP. 2003 Yeast communities associated with stingless bees. FEMS Yeast Research, 4, 271-275.

Salamanca Grosso G, Ortíz A, Fernández K, Arciniegas M. 2000. Potencial apícola en la productividad y conservación de cultivos y plantas promisorias en el Tolima Colombiano

Salamanca Grosso G, Henao Rojas CA, Moreno GI & Luna A.2001. Características microbiológicas de las mieles tropicales de *Apis mellifera*. gsalaman@angel.ut.edu.co

Snowdon and Cliver JA, 1996. Microorganisms in honey, Int. J. Food Microbiol, 31 (1–3) 1–26.

Vit PM. Medina & M. E. Enríquez -2004. Quality standards for medicinal uses of *Meliponinae* honey in Guatemala, Mexico and Venezuela. Bee World,2004, 85 (1), 2–5.

White, J.; Riethof, M.; Subers, M. and Kushneir, I. Composition of amarican Honey. Us. Dep. A. Rech. Bull 1261, 124, 1962.

Identificadores micrográficos de interés para el control de calidad botánico de alimentos elaborados con harinas provenientes de cultivos andinos

Micrographical indicators of interest for botanical quality control of meals elaborated with flours from andean cultures

Rivas, MA (1), Bassols, G (2), Schimpf, JH (1), Gurni, AA (2) Vignale, ND (1)

(1) Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Jujuy, Alberdi 47 (4600) S. S. de Jujuy, Argentina
(2) Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Junín 956, 4º piso (1113), Buenos Aires, Argentina
ndvignale@yahoo.com.ar

RESUMEN
Se realizó el análisis micrográfico de órganos subterráneos y granos andinos empleados en la fabricación de harinas y otros productos derivados. Se empleó la técnica micrográfica de reducción a polvo del órgano vegetal usado como materia prima alimenticia y la reacción histoquímica para almidón con solución yodo-iodurada de Lugol. Los caracteres de valor diagnóstico están representados por los granos de almidón, los cuales son muy pequeños en "quinua", *Chenopodium quinua* Willd., "kiwicha", *Amaranthus caudatus* L. y "cañihua", *Chenopodium pallidicaule* Aellen, y de un tamaño no uniforme, de forma ovoide con un hilio central lineal en "maca", *Lepidium meyenii* Walpers. En "papa", *Solanum tuberosum* L. y "haba", *Vicia faba* L. se observaron los almidones de mayor tamaño, con hilio excéntrico de forma ovoide y estrías marcadas en la "papa" y de forma elíptica y esférica, de tamaños no homogéneos, predominando los más grandes en "haba". El "maíz", *Zea mays* L. presentó almidones de forma poliédrica con un hilio central estrellado. Estos indicadores micrográficos se aplicaron para certificar el origen genuino de productos elaborados con estas especies andinas como la harina y otros productos que se comercializan en estado fragmentado y/o pulverizado y que a pesar de los tratamientos físicos y químicos sometidos, los granos de almidón aún conservan su morfología.

ABSTRACT
A micrographical analysis from andean subterranean plant organs and grains used to elaborate flours and other similar products was performed. Botanical materials were reduced to powder and tested by means of the reaction with iodine-iodide solution (lugol). Main diagnostic elements are starch grains. The smallest grains appear in "quinua", *Chenopodium quinua* Willd."kiwicha", *Amaranthus caudatus* L. and "cañihua", *Chenopodium pallidicaule* Aellen. They are ovoid, with central lineal hilum and not uniform in size in "maca", *Lepidium meyenii* Walpers. In "papa", *Solanum tuberosum* L. and in "haba", *Vicia faba* L. the largest starch grains were found. They are striated and have excentric hilum in "papa" and are elliptic or spherical varying in size predominating the largest ones in "haba", "Maíz", *Zea mays* L., has poliedric starch grains with stellated central hilum. These micrographical indicators were used to certify the genuine origin of products elaborated with them, such flours and others which are commercially spent as powder or cut into small pieces. Despite of some physical and chemical treatments, starch grains may maintain there structure.

PALABRAS CLAVE: *harinas andinas, micrografía, agroalimentos, calidad botánica.*

KEYWORDS: *andean flours, micrography, agrofoods, botanical quality.*

INTRODUCCIÓN
La región andina es uno de los centros de mayor diversidad de plantas alimenticias y sus cultivos en la actualidad han trascendido las fronteras de su lugar de origen, debido a las propiedades que se les atribuyen particularmente nutricionales y medicinales, entre otras (Cárdenas 1969, Hernández Bermejo y León 1992, Mujica y Jacobsen 2006, Repo Carrasco *et al* 2007, Tapia 2007). Son alimentos muy valiosos, los que se deben preservar como parte de la agrobiodiversidad regional; debido a la fuerza

cultural y gracias a la labor de conservación que realizan los agricultores andinos, aún se puede contar con esta riqueza (Tapia y Fries 2007).

Los cultivos andinos comprenden un grupo de especies originarias de los Andes que aportan sus órganos útiles para la alimentación, medicina y otras aplicaciones. Las especies que proveen sus raíces y tubérculos están representadas por las "papas" (*Solanum tuberosum ssp andigena* y muchas otras especies de *Solanum*), "oca" (*Oxalis tuberosa*), "ulluco", "papa lisa" o "papa verde" (*Ullucus tuberosu*), "añu", "mashua" o "isaño" (*Tropaeolum tuberosum*), "achira" (*Canna edulis*), "yacón" (*Smallanthus sonchifolius*), "ahipa" (*Pachyrhizus ahipa*) y "maca" (*Lepidium meyenii*). Aportan granos la "quinua" (*Chenopodium quinoa*), "cañahua" o "cañihua" (*Chenopodium pallidicaule*), "kiwicha"(*Amaranthus caudatus*) y "amaranto" (*Amaranthus edulis*). Incluyen las legumbres como "poroto" (*Phaseolus vulgaris* y *P. vulgaris var. aborigineus*) y "tarwi" (*Lupinus mutabilis*). Por otra parte también aportan frutas y verduras como "chirimoya" (*Annona cherimola*), "cayote" (*Cucurbita ficifolia*), diversos "zapallos" (*Cucurbita pepo*, *C. maxima*), "achojcha" (*Cyclanthera pedata*), "papa del aire" (*Sechium edule*), "pimiento" (*Capsicum frutescens*), "quitucho" (*Capsicum baccatum*), "ulupica" (*Capsicum eximium*), "sacha tomate" o "tomate árbol" (*Solanum betaceaum*) y "aguaymanto" o "uchuva" (*Physalis peruviana*).

Estas especies, además de favorecer la variedad de alimentos disponibles, poseen gran valor nutricional así como la ventaja de estar adaptadas a las condiciones ecológicas de los andes, donde manifiestan su resistencia a plagas y sequías (Tapia y Fries 2007). Es por ello que constituyen una alternativa a la demanda de los consumidores en la actualidad que requieren alimentos seguros, mínimamente procesados y sin aditivos químicos. La aplicación de procesos artesanales o industriales a los cultivos andinos da lugar a una serie de productos derivados de los cuales las harinas son muy importantes, dado que se usan en la preparación de cremas para sopas, mazamorras, en panadería y pastelería.

Entre las especies generadores de harinas se encuentran: A.- órganos subterráneos: como la raíz de *Lepidium meyenii* Walpers ("maca") empleada también por sus propiedades medicinales como estimulante de la reproducción, energizante, revitalizador, como suplemento de diversos productos alimenticios y para la elaboración de caramelos (León 1964); B.- órganos aéreos: representados por los frutos (denominados granos andinos) de *Chenopodium quinua* Wild. ("quinua"), *Chenopodium pallidicaule* Aellen ("cañihua") y *Amaranthus caudatus* L. ("kiwicha"), de alto valor nutricional debido a su contenido de proteínas (Mujica *et al* 2004) y de *Zea mays* L. ("maíz") y semillas de *Vicia faba* L. ("haba") cultivo andinizado que integra la mesa tradicional andina.

La "papa", *Solanum tuberosum* L. uno de los cultivos andinos más difundido (Tapia y Fries 2007) constituye una fuente de almidón cuya demanda crece diariamente.

Los productos se comercializan de manera formal e informal en mercados, comercios dedicados a la venta de alimentos procesados, casas naturistas, herboristerías, ferias regionales y otros, tanto en el área andina como en otros países del mundo en los que han ido conquistando espacio, tanto para fines nutricionales como medicinales.

Garantizar productos genuinos en el proceso de comercialización de estos productos contribuye al aumento del consumo por parte de la población, lo que sin duda se traducirá en un incremento de los ingresos para los agricultores de la región que los producen

Para detectar posibles adulteraciones y/o sustituciones en estos productos derivados, en los que el material vegetal original se encuentra fragmentado y/o pulverizado, es necesario recurrir al auxilio que ofrece la anatomía vegetal aplicada orientada al control de calidad botánico.

El presente trabajo se realiza con el propósito de atender la necesidad de llevar a cabo este control de calidad botánico, tanto en las harinas derivadas de cultivos andinos como en los agroalimentos que originan, cualquiera sea la escala de producción (artesanal/industrial) y de comercialización.

En estas situaciones la herramienta más segura para el control de calidad la constituyen los caracteres anatómicos. Mediante la aplicación de la metodología micrográfica, integrada por técnicas sencillas, de bajo costo y que brindan resultados transferibles de inmediato, las que se adecuan al órgano del vegetal que se debe analizar, se compara la parte de la planta que se encuentra formando el producto, con el patrón de identificación micrográfico de la especie previamente definido, certificando de esta manera su origen genuino (Vignale y Gurni 2003, 2005, 2008).

El principal objetivo de la investigación está orientado a establecer los indicadores de valor diagnóstico que permitirán reconocer la presencia de las especies analizadas en los productos

alimenticios que se comercializan, en los cuales la materia prima se encuentra en un profundo estado de fragmentación/ pulverización/desintegración.
Los resultados obtenidos pueden ser aplicados a los productos regionales que circulan en la cadena de comercialización con el propósito de certificar su origen genuino
Existe una interesante y creciente variedad de productos, entre los que merecen citarse las harinas andinas, que se expenden ya sea fraccionadas o a granel y con la que se elaboran alimentos, a los que se agregan las sopas para cremas y otros productos en los cuales los granos de almidón no hayan sufrido durante su elaboración notables modificaciones por los tratamientos físicos o químicos a los que ineludiblemente debió ser sometido. De esta forma se garantiza que se ofrecen al consumidor productos de confianza.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales vegetales

Los ejemplares coleccionados por los autores se encuentran depositados en el Herbario del Museo de Farmacobotánica "J. A. Domínguez" de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, cuya sigla, según Index Herbariorum es BAF
Se efectuaron consultas en el Herbario de la Universidad San Antonio Abad del Cusco, cuya sigla es CUS.

Materiales estudiados

***Amaranthus caudatus* L.** PERÚ, Puno, 22/II/2008, Mujica, A. y Rossel, J. s/n (BAF)
***Chenopodium quinua* Willd** PERÚ, Camacani, 10/II/2008, Vignale, N. D., Rossel, J. y Chura, E. 955 (BAF); ARGENTINA, Jujuy, Humahuaca, 29/IV/2009, Vignale, N. D., Rivas, M. A., Ramos, R. S. y Flores, E. N. 999 (BAF)
***Chenopodium pallidicaule* Aellen** PERÚ, Puno, 31/I/2008, Mujica, A. y Rossel, J. s/n (BAF)
***Lepidium meyenii* Walpers** PERÚ, Puno, 11/II/2008, Vignale, N. D. y Rossel, J. 957 (BAF)
***Solanum tuberosum* L.** ARGENTINA, Salta, Colanzulí, Vignale, N. D. y Schimpf, J. H., 987 (BAF)
***Vicia faba* L.** ARGENTINA, Salta, Colanzulí, 18/III/2008, Vignale, N. D. y Schimpf, J. H., 992 (BAF)
***Zea mays* L.** ARGENTINA, Jujuy, Hornillos, 27/II/2008, Vignale, N. D. y Schimpf, J. H., 979 (BAF)

Materiales consultados

***Amaranthus caudatus* L.** PERÚ, Calca, Hacienda Urco, I/1938, Vargas, C. 721 (CUS); PERÚ, Moquegua, Moquegua, Toreentera, 15/X/1976, Vargas, C. 22897 (CUS);
***Chenopodium quinua* Willd** BOLIVIA, Oruro, IV/1943, Ochoa, C. s/n (CUS); PERÚ, Cuzco, Muñapata, Urcos, Núñez, P. 7604 (CUS).
***Chenopodium pallidicaule* Aellen** PERÚ, Ianasca, Canas, IV/1938, Vargas, C. 1907 (CUS).
***Lepidium meyenii* Walpers** PERÚ, Puno, Carabaya, Hacienda Lacka, 2/I/1948 , Vargas, C. 7011 (CUS)
***Zea mays* L.** PERÚ, Cuzco, XII/1937, Vargas, C. 616 (CUS).

Productos alimenticios

Como material para la aplicación de indicadores micrográficos de raíces y granos se emplearon productos regionales elaborados en base a estas especies andinas y que se comercializan en mercados y ferias regionales de la provincia de Jujuy (ARGENTINA) y en comercios de Puno, Cusco y Lima (PERÚ): harina de maca pre-tostada, crema de haba tostada para sopa, fécula (almidón) de maíz, harina de quinoa para sopa instantánea, hojuelas de kiwicha, harina de cañihua o cañihuaco.
Estos materiales se incorporaron al Muestrario de Plantas Útiles del Laboratorio de Botánica Sistemática y Etnobotánica de la Cátedra de Botánica Sistemática y Fitogeografía de la Facultad de Ciencias Agrarias (UNJu), cuya sigla es M-CBSF.

Métodos

Se emplearon las siguientes técnicas del método micrográfico:
Reducción a polvo de la materia prima (raíces, tubérculos, semillas); reacción histoquímica para almidón con solución yodo-iodurada de lugol; observación al microscopio óptico; registro de caracteres de interés a través de fotomicrografías, las que fueron tomadas con una cámara compacta digital Cannon modelo Powershot A640, incorporada al Microscopio Trinocular Carl Zeiss, modelo Axiostar Plus. Todas se presentan con zoom digital de 1,8.

Esta metodología es la que se emplea para el trabajo con las plantas medicinales que integran la Farmacopea Argentina y que está aprobado por la Organización Mundial de la Salud (WHO 1978).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos para cada una de las especies estudiadas se presentan a continuación, según el órgano de la planta que provee almidón y la contrastación con el producto alimenticio analizado cuando se realizó la misma, en la que se efectuó la reacción histoquímica con lugol:

Órganos subterráneos

Raíz.

Lepidium meyenii Walpers

Análisis micrográfico: granos de almidón simples, de forma irregular ovoide, algunos esféricos, con hilio central lineal poco marcado y ausencia de estrías, cuyo tamaño alcanza el valor de 17,5 µm (**Figura 1 A**).

Producto alimenticio: Harina de maca (**Figura 1 B**).

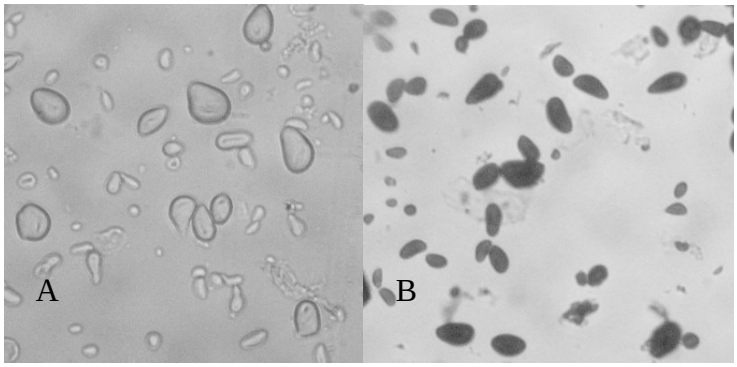


Figura. 1. *Lepidium meyenii*: A- raspado de raíz mostrando los granos de almidón; B- harina de maca comercial mostrando los granos de almidón teñidos con lugol (40x).

Tubérculos.

Solanum tuberosum L.

Análisis micrográfico: granos de almidón simples, de forma ovoide y elíptica y tamaños no uniformes, encontrándose en mayor proporción los de mayor tamaño, con hilio excéntrico y estrías visiblemente marcadas; en el presente trabajo, son los de mayor tamaño 75 µm (**Figura 2**).

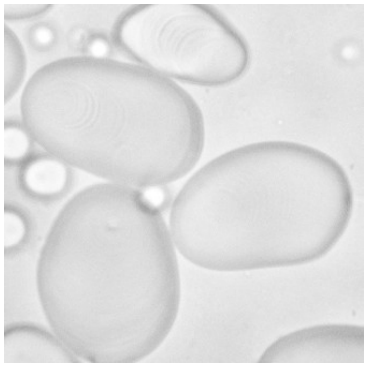


Figura 2. *Solanum tuberosum*: raspado mostrando los granos de almidón (40x).

Órganos aéreos

Granos (frutos)

Zea mays L.

Análisis micrográfico: granos de almidón simples, de forma poliédrica y redondeada, con un hilio estrellado sin evidencias de estrías, de tamaños superiores a los de la maca, alcanzando 22,5 µm (**Figura 3 A**)

Producto alimenticio: almidón (harina) de maíz (**Figura 3 B**)

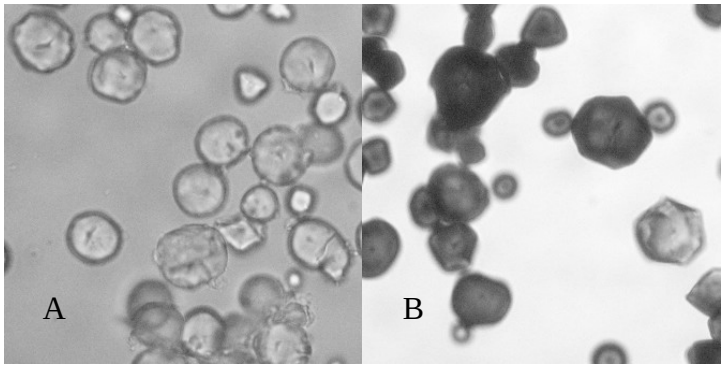


Figura 3. *Zea mays*: A- raspado de grano mostrando almidón; B- granos de almidón de harina de maíz teñidos con lugol (40x)

Chenopodium quinua Willd., *Amaranthus caudatus* L. y *Chenopodium pallidicaule* Aellen
Análisis micrográfico: los granos de almidón de estas tres especies son muy pequeños, redondeados y entre ellos no se destacan diferencias que permitan certificar su origen. Las dos primeras especies llegan a medir hasta 1,7 µm, mientras que *Chenopodium pallidicaule* Aellen muestra un tamaño máximo de 1,2 µm (**Figura 4 A-1**; **B-1**; **C-1**).
Productos alimenticios: sopa de quinoa (Fig. 4 A-2); hojuelas de kiwicha (**Figura 4 B-2**); harina de cañihua, conocida como "cañihuaco" (**Figura 4 C-2**).

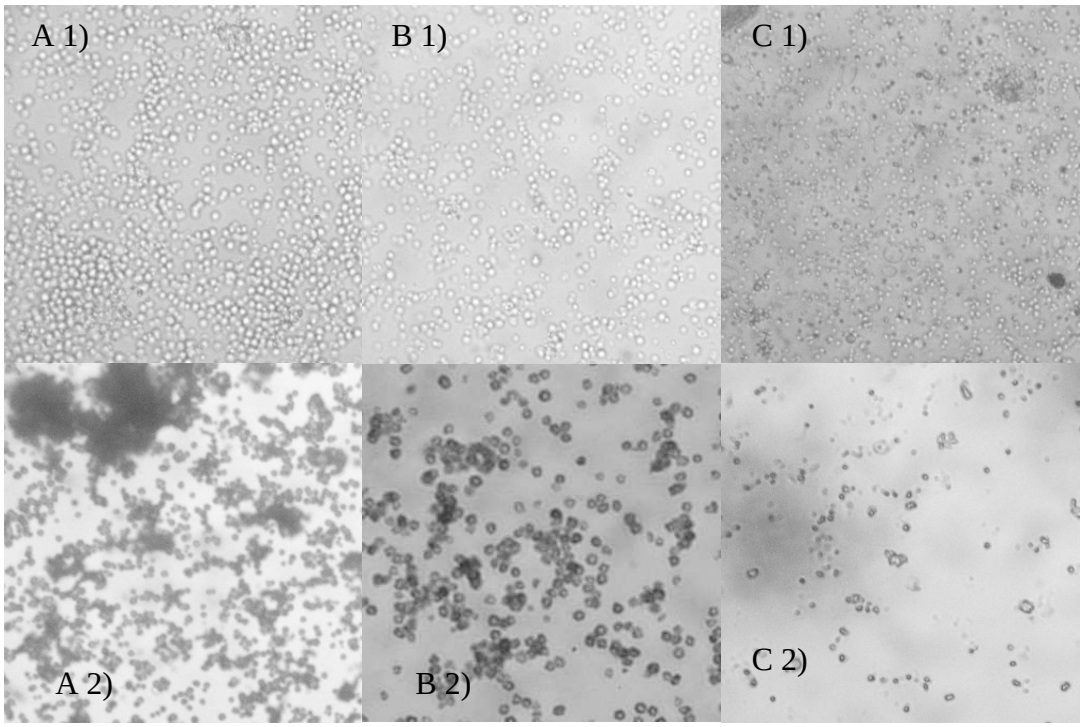


Figura 4. Granos andinos: A-1) raspado de grano de *Chenopodium quinua*; A-2) Sopa de quinua mostrando los granos de almidón teñidos con lugol; B- 1) raspado de grano de *Amaranthus caudatus*, B-2) hojuelas de kiwicha mostrando los granos de almidón teñidos con lugol; C-1) raspado de grano de *Chenopodium pallidicaule* mostrando los granos de almidón; C-2) cañihuaco o harina de cañihua (40 x).

Semillas
Vicia faba L.
Análisis micrográfico: granos de almidón de tamaño irregular; los más grandes alcanzan el valor de 33,5 µm y en su mayoría son de forma elíptica, mientras que los más pequeños, que se encuentran en menor proporción, son de forma esférica; hilio excéntrico y estrías visibles. (**Figura 5 A**)
Producto alimenticio: crema de habas tostadas (**Figura 5 B**)

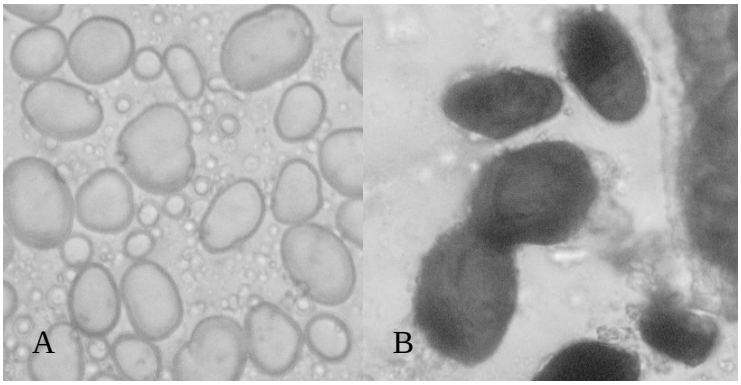


Figura 5. *Vicia faba*: A- raspado de semilla mostrando los granos de almidón; B- crema de haba tostada: granos de almidón teñidos con lugol (40x). Los granos de almidón se observan levemente modificados.

Los indicadores micrográficos que permiten diferenciar los materiales trabajados están representados por los granos de almidón, los que expresan sus características originales siempre que para lograr el producto alimenticio se utilicen solamente acciones mecánicas o acciones térmicas en forma leve (Flint 1994).
Las referencias morfológicas que permiten caracterizar los granos de almidón están definidas por forma, tamaño y abundancia relativos, forma y posición del hilo y evidencia o no de estrías (Agama-Acevedo 2005, Crivaro 2006, Prego *et al* 1998) (**Tabla 1**).

Tabla 1. Diferencias morfológicas de los granos de almidón analizados.

Granos de almidón	Tipo (simple/ compuesto)	Forma	Hilo	Estrías	Tamaños máximo (µm)
Lepidium meyenii	simple	irregular ovoide, algunos esféricos	central lineal poco marcado	ausentes	17,5
Solanum tuberosum	simple	ovoide y elíptica, tamaños no uniformes	excéntrico puntiforme	visiblemente marcadas	75
Zea mays	simple	poliédrica y redondeada	central estrellado	no evidentes	22,5
Chenopodium quinua	simple	redondeados	no perceptible	no evidentes	1,7
Amaranthus caudatus	simple	redondeados	no perceptible	no evidentes	1,7
Chenopodium pallidicaule	simple	redondeados	no perceptible	no evidentes	1,2
Vicia faba	simple	elípticos y esféricos	excéntrico	visibles	33,5

CONCLUSIONES

El elemento de valor diagnóstico que posibilita diferenciar las especies estudiadas está representado por el grano de almidón; éste se constituye en el indicador micrográfico que facilitará la búsqueda de la certeza de que el producto obtenido es genuino, tanto si se trata de producto final, como puede ser un alimento de panadería como de producto intermedio, como son las diferentes harinas, cuya utilización aumenta considerablemente dada la tendencia mundial de diversificar la oferta, sobre todo cuando se trabaja en la atención de enfermedades particulares como la celíaca.
Esta perspectiva de análisis posibilita ampliar el espectro de los controles de calidad que en forma clásica se realizan a los alimentos, incorporando la dimensión botánica; redundará en mejorar el bienestar de la población pues significa una forma rápida, sencilla pero segura de garantizar que el producto es genuino, porque ha sido elaborado con la materia prima que indica la respectiva rotulación y por lo tanto no hay indicios de sustitución ni de adulteración.
Cabe resaltar que el método micrográfico, a través de las técnicas adecuadas al análisis ya sea de órganos subterráneos o aéreos herbáceos, resulta de utilidad para la certificación de calidad botánica de

aquellos productos que conserven la estructura granular del almidón a pesar de los tratamientos físicos y químicos a que debe ser sometido para lograr el punto deseado.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue financiado por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCYT) mediante el subsidio otorgado al Proyecto CA PICT 30134.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agama-Acevedo E, Ottenhof MA, Farhat IA., Paredes-López O, Ortíz-Cereceres J, Bello-Pérez LA. 2005. Aislamiento y caracterización del almidón de maíces pigmentados. Agrociencia, 39: 419-429.

Cárdenas, M. 1969. Manual de plantas económicas de Bolivia. Cochabamba: Ichtus. pág. 421.

Crivaro NO, Apóstolo NM , Calloni S, Lorenzo E, Viñales L, Gualdieri P. 2006. Reconocimiento de alimentos vegetales: Caracterización micrográfica del grano de avena. Ciencia e Tecnologia de Alimentos, Campinas, 26(2): 297-302.

Flint O. 1994. Microscopía de los alimentos. Manual de métodos prácticos utilizando la microscopía óptica. Zaragoza: Acribia. pág. 131.

Hernández Bermejo JE, León J, editores. 1992. Cultivos marginados, otra perspectiva de 1492. Produc. y Protec. Veg. 26. Roma: FAO. pág. 339.

León J, 1964. The “maca”, *Lepidium meyenii* Walpers a little known food plan of Peru. Economic Botany 18: 127-128.

Mujica A, Izquierdo J, Marathee JP, Jacobsen S. 2004. Libro Quinua: Ancestral Cultivo Andino, Alimento del Presente y Futuro. FAO, CIP, UNA. Puno, Perú. Pág. 320.

Mujica A, Jacobsen S.2006. La quinua (*Chenopodium quinoa*Willd.) y sus parientes silvestres. En: Moraes M, Ollgaard B, Kvist LP, Borchsenius F, Balslev H, editores. Botánica económica de los abdes centarles. 1º ed. La Paz: Universidad Mayor de San Andrés. Pág 449-457.

Prego I, Maldonado S, Otegui M. 1998. Seed Structure and Localization of Reserves in C*henopodium quinoa.* Annals of Botany, 82: 481-488.

Repo Carrasco R, Cortes G, Montes RO, Quispe L, Ramos I. 2007. Cultivos andinos. En: León AE, Rosell C, editores. De tales harinas, tales panes. Granos, harinas y productos de panificación en Iberoamérica. 1º ed. Córdoba: Hugo Báez Editor. pág. 243-294.

Tapia ME, Fries AM. 2007. Guía de campo de los cultivos andinos. Roma: FAO. Lima: ANPE. Pág. 209.

Vignale ND, Gurni AA. 2003. Micrografía de plantas medicinales andinas usadas como aditivos alimentarios en la provincia de Jujuy. Argentina. Boletín Sociedad Argentína de Botánica 38. (Supl.):142

Vignale ND, Gurni AA. 2005. Identificación Micrográfica de Hojas de *Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Robinson (Asteraceae). Acta Farmacéutica Bonaerense, 24: 96-98.

Vignale ND, Gurni AA. 2008. Usos tradicionales y caracterización micrográfica de *Calceolaria santolinoides* Kraenzl (Scrophulariaceae), especie medicinal andina de Jujuy (Argentina). Arnaldoa, 15(1): 101- 108.

World Health Organization (WHO). 1978. Pharm 80502:21.

Propiedades el equilibrio de sorción de agua de manzanas (*Granny Smith*) osmo-microdeshidratadas

Properties of water equilibrium sorption of osmo-microdehydrated apples (*Granny Smith*)

Rodriguez A (1), Pagano AM (1, 2)

(1) TECSE, Depto. Ingeniería Química, FIO-UNICEN
(2) PROGRAMA INSTITUCIONAL ALIMENTOS – UNICEN
Facultad de Ingeniería, Av. Del Valle 5737, 7400 (Olavarría), Buenos Aires, Argentina.
apagano@fio.unicen.edu.ar

RESUMEN

Durante el almacenamiento y procesamiento de alimentos de origen vegetal pueden ocurrir cambios en las características físicas, químicas y microbiológicas influenciados por la humedad del material, la actividad acuosa y la temperatura de almacenamiento. Para el proceso de secado y almacenamiento de productos de elevada actividad acuosa (aw) tales como manzanas, el conocimiento de la relación entre la humedad de equilibrio de un sólido (EMC) y la humedad relativa de equilibrio (ERH) es esencial. El objetivo del trabajo es estudiar el equilibrio sorcional de manzanas deshidratadas obtenidas mediante una técnica combinada basada en deshidratación osmótica y secado por microondas. Las muestras fueron deshidratadas mediante un pretratamiento de ósmosis en soluciones de sacarosa 30 y 50% p/p, y secadas en microondas a 270W durante 60 min. Las isotermas de sorción se determinaron por el método estático gravimétrico con soluciones salinas saturadas (KOH, CH_3COOK, CO_3K_2, BrNa, ClNa, $SO_4(NH_4)_2$, rango de aw: 0,059-0,81) a temperaturas (T) entre 25 y 45ºC, por duplicado. Se observó un entrecruzamiento de las curvas isotermas obtenidas para distintas temperaturas, comportamiento típico de alimentos con alto contenido de azúcar: Para aw<0,4 a medida que aumenta T, disminuye EMC, ya que el aumento de T excita las moléculas de agua causando menor estabilidad y ruptura de los sitios de unión entre el agua y el alimento, disminuyendo así el contenido de humedad de monocapa; también puedo atribuirse a una disminución de la solubilidad de los sólidos del alimento (carbohidratos) en el agua. Para aw>0,4 EMC se incrementa con T, debido al aumento de la solubilidad de los carbohidratos presentes en el producto, posiblemente por el incremento de la actividad enzimática e intercambio de las moléculas de agua con los carbohidratos (propios del producto fresco y aportados por el pretratamiento osmótico). Los datos experimentales se ajustaron mediante modelos EMC-ERH que incluyen el efecto T (Henderson, Halsey, Oswin, Chung-Pfost) y otros que no lo hacen (GAB, BET, Kuhn, Chen). La calidad de ajuste se evaluó mediante los criterios estadísticos R^2, R^2corr, Sy, RSS, p y gráficos de residuos. El entrecruzamiento en las curvas isotermas a distintas temperaturas observado para aw ≈ 0,4 es debido a que a elevada aw la solubilidad de los sólidos del producto aumenta generando un incremento del contenido de humedad de equilibrio. Este cruce se produjo en una aw menor que lo habitual en productos no osmotizados a causa de la absorción de soluto durante el pretratamiento. La ecuación de Chen aw = exp[K – C exp(– b EMC)] resultó ser la más exacta para la descripción de los datos experimentales; las constantes del modelo (K, C, b) no mostraron dependencia de T, ni de la concentración de la solución empleada en el pretratamiento de ósmosis.

ABSTRACT

During storage and processing of vegetable foods, changes in physical, chemical and microbiological characteristics influenced by the material moisture, water activity and temperature can occur. For the drying process and storage of product with high water activity (aw), such as apples, knowledge of the relationship between the equilibrium moisture content of the solid (EMC) and equilibrium relative humidity (ERH) is essential. The aim of this work is to study the sorptional equilibrium of dehydrated apples obtained using a technique based on combined osmotic dehydration and microwave drying. The samples were dehydrated by osmosis pretreatment in solutions of sucrose 30% and 50% w / w, and dried at 270W microwave power level for 60 min. Sorption isotherms were determined by gravimetric

method with saturated salt solutions (KOH, CH_3COOK, CO_3K_2, NaBr, ClNa, $SO_4(NH_4)_2$, range of aw: 0059-0,81) at temperatures (T) between 25 and 45 º C, in duplicate. Cross between isotherms at different temperatures was observed, typical behaviour for foods with high sugar content: For aw <0,4 as T increases, EMC decreases, since the increase of T excites the water molecules causing less stability and rupture of the binding sites between water and food, thus reducing the monolayer moisture content; this behaviour can be also attributed to a decreasing in the solubility of solid food (carbohydrates) in water. For aw>0,4 EMC increases with T, due to the increasing on the solubility of the carbohydrates present in the product, possibly related to the increasing the enzyme activity and exchange of water molecules with carbohydrates (own of the fresh product and provided by the osmotic pre-treatment). Experimental data were fitted by EMC-ERH models that include T effect (Henderson, Halsey, Oswin, Chung-Pfost) and others do not (GAB, BET, Kuhn, Chen). The quality of fit was evaluated using statistical criteria R^2, R^2corr, Sy, RSS, p and residual plots. The cross on the curves at different temperatures observed isotherms for aw ≈ 0,4 is because at high aw solid solubility of the product increases, increasing equilibrium moisture content. This intersection occurred at lower aw than usual in osmotic-ally untreated products due to the solute absorption during pre-treatment. Chen's equation aw = exp [K - C exp (- b EMC)] proved to be most accurate to describe the experimental data; the model constants (K, C, b) showed no dependence on T, or the concentration of the solution used in the pre-treatment of osmosis.

PALABRAS CLAVE: *equilibrio de sorción, actividad acuosa, manzanas deshidratadas, modelado.*

KEYWORDS: *sorption equilibrium, water activity, dehydrated apple, modeling.*

INTRODUCCIÓN

Durante el almacenamiento y procesamiento de los productos agrícolas, pueden ocurrir cambios en las características físicas, químicas y microbiológicas influenciados por el contenido de humedad del material, la actividad de agua y la temperatura de almacenamiento (Lahsasni *et al.* 2002).

En todos los productos alimenticios existe una relación inherente entre el contenido de agua y la humedad relativa de la atmósfera en equilibrio con él, que es equivalente a la actividad de agua (aw).

El contenido de humedad de un alimento en equilibrio con la humedad del aire y a una temperatura dada se denomina contenido de humedad de equilibrio (EMC) (Soysal y Özketin 1999).

Dicho equilibrio puede alcanzarse ya sea por secado (desorción), cuando el alimento pierde humedad, es decir el contenido de humedad del producto es superior a la humedad de equilibrio ó por hidratación (adsorción), cuando el contenido de humedad es inferior al del equilibrio y por lo tanto se hidrata.

La humedad relativa del aire circundante en equilibrio con el alimento es conocida como ERH ó en unidades decimales, como actividad de agua (aw). La definición de actividad de agua está basada en los conceptos de la termodinámica y es un factor importante en la pérdida de calidad de alimentos durante su almacenamiento que influye en las reacciones bioquímicas y en la estabilidad de productos desecados (Silvi 2008).

Para el proceso de secado y almacenamiento, el conocimiento de la relación entre la humedad de equilibrio de un alimento (EMC) y el contenido de humedad relativa de equilibrio (ERH) es esencial (Silvi 2008).

La relación entre la actividad de agua y el contenido de humedad del producto a menudo se expresa como isotermas de sorción (Lahsasni *et al.* 2002). Las mismas son usualmente clasificadas acorde a su forma en cinco diferentes tipos. Las isotermas Tipo I son curvas convexas hacia arriba, mientras que las Tipo II son curvas cóncavas hacia arriba. Los productos secos usualmente muestran isotermas Tipo II y III. Las isotermas III, IV y V son aquellas que muestras uno o más puntos de inflexión (Yan *et al.* 2008).

La forma típica de una isoterma refleja la manera en la cual el agua está atada al sistema. En el rango de aw de 0-0,3 se considera que el agua esta unida a sitios polares de energía relativamente altas y se denominada monocapa (Lahsasni *et al.* 2002). Esas moléculas de agua tienen una movilidad prácticamente nula y por lo tanto su probabilidad de participar en reacciones bioquímicas es cero. Se reconoce como parte integrante de la fase sólida, es decir no tienen propiedades funcionales del agua pura y es considerada la zona de estabilidad de un alimento.

El rango de aw entre 0,3-0,7 es referido al agua multicapa. Ésta consiste en capas de agua que están ligadas a la primer capa por uniones hidrógenos (Lahsasni *et al.* 2002). Las moléculas de agua en estas capas tienen una movilidad limitada y su posibilidad de tomar parte en reacciones bioquímicas puede ser muy restringida.
Por encima de aw 0,7 está enfocada en la condición de "agua condensada", es relativamente el agua libre retenida en los capilares formando soluciones en los productos alimenticios.
Los microorganismos más frecuentes en alimentos no pueden crecer en medios cuyas aw sea inferior a 0,7. Ya en aw=0,7 la interacción agua-alimento es suficientemente fuerte como para impedir que el agua se encuentre disponible para el crecimiento microbiano. Por este motivo se ha establecido este valor como límite para calcular la humedad de seguridad (Silvi 2008).
Así, con el conocimiento de la isoterma de sorción de humedad, es posible predecir el máximo de humedad que los productos alimenticios pueden tener y la posibilidad de ganar o perder durante el almacenamiento o el secado. Los datos de las isotermas de adsorción pueden ser utilizados para el establecimiento de un método de almacenamiento, mientras que los datos de las isotermas de desorción son útiles en el análisis de secado. El método tradicional utilizado para medir el grado de humedad en los productos vegetales es el gravimétrico, el cual consiste en colocar las muestras con una humedad relativa y temperatura del ambiente establecido. Cuando el cambio de la masa de las muestras es insignificante, el contenido de humedad es medido y adoptado como valor del contenido de humedad de equilibrio (EMC) (Cordeiro *et al.* 2006).
Varios modelos han sido propuestos en la literatura para describir matemáticamente las isotermas de sorción de los productos alimenticios higroscópicos usando ecuaciones de isotermas (ASAE, 2004). Algunos de estos modelos son basados en teorías del mecanismo de sorción, otros son puramente empíricos y semi-empíricos (Kaymak-Ertekin y Gedik 2004). Sin embargo, la experiencia ha mostrado que ninguna ecuación puede ajustar adecuadamente los datos de las isotermas de sorción en todo el rango de aw y para los diferentes tipos de alimentos. En general, los criterios ampliamente aceptados para la selección del modelo mas apropiados son el que mejor se ajuste a los datos experimentales y la simplicidad del modelo (Kaymak-Ertekin y Gedik 2004).
Según Soysal y Öztekin (2001), la ecuación de Guggenheim-Anderson-de Boer (GAB) es reconocida como el modelo más versátil para los diversos materiales, como inorgánicos y productos alimenticios, a lo largo de un amplio rango de actividad agua (aw). Esta ecuación puede considerarse una versión del modelo de BET que se ha mejorado mediante la introducción de un tercer parámetro, K, como un multiplicador de la actividad de agua**.**
Los objetivos a abordar en este trabajo son, evaluar el equilibrio sorcional de los productos obtenidos mediante la deshidratación osmótica combinada con microondas y analizar distintos modelos a fin de determinar cuál es el que brinda un mejor ajuste de los datos experimentales obtenidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron manzanas verdes frescas de la variedad *Granny Smith* (lote: 600; calibre: 80 mm; categoría: Elegido; cosecha 2008) las cuales fueron compradas en el mercado local y mantenidas en refrigerador a 4ºC. En todas las determinaciones se utilizó el mismo lote para evitar variabilidad biológica en el tejido celular debido al tiempo de cosecha. Las frutas se retiraron de la heladera 60 minutos antes para estabilizar la temperatura, luego fueron lavadas, peladas manualmente y cortadas en cubos de 1,3 cm^3 (1,52 g $\pm$ 0,1). Los cubos fueron cortados con un cortador de papas de cuchillas de acero inoxidable 18/8.
Previo a la evaluación del equilibrio sorcional, las muestras fueron deshidratadas mediante un método combinado. Éste consistió en una etapa inicial de deshidratación osmótica en la cual el agente osmótico utilizado fue sacarosa comercial; se trabajó con dos concentraciones 30% p/p y 50% p/p, empleando una relación fruta/agente de 1:12, a temperatura ambiente, con remoción cada tres horas sin agitación. Luego las muestras fueron sometidas a una etapa de terminación de la deshidratación por secado en microondas a una potencia constante de 270 W.
El equilibrio sorcional de las muestras osmo-microdeshidratadas se determinó por el método gravimétrico estático a temperaturas de 25, 35 y 45 ºC. Se utilizaron seis soluciones salinas saturadas (KOH, CH_3COOK, CO_3K_2, BrNa, ClNa, SO_4 $(NH_4)_2$) previamente seleccionadas para obtener diferentes humedades relativas en el rango de aw de 0,059-0,81.

Cada solución se colocó en un recipiente de vidrio herméticamente cerrado (higróstato), los cuales se mantuvieron en estufa en condiciones isotérmicas a las temperaturas mencionadas anteriormente.
A intervalos regulares las muestras fueron evaluadas en peso en balanza analítica de precisión a fin de determinar por diferencia el punto donde se puede dar por finalizado el intercambio higroscópico.
Por último, en la condición de equilibrio, la humedad de equilibrio (Me) se corroboró por el método de estufa de vacío a 60°C hasta alcanzar peso constante (aproximadamente 9 h) (Norma AOAC 1980 modificada).
En cuanto al análisis de modelos matemáticos del equilibrio de sorción, la relación entre los datos de contenido de humedad de equilibrio de los cubos de manzanas y la humedad relativa del aire en función de la temperatura (T) se evalúo de acuerdo a los modelos GAB, Henderson, Halsey, Oswin, Chung-Pfost, Chen, BET y Kuhn (Ahmed *et al.* 2005, Kaymak-Ertekin y Gedik, 2004, Taiwo *et al.* 2005). Las ecuaciones de estos modelos son presentadas en la **Tabla 1.**

Tabla 1. Modelos utilizados para el ajuste de los datos experimentales de sorción.

Modelo	Ecuación	Referencia
GAB	$Me = XmKCaw/[(1-Kaw)(1-Kaw+CKaw)]$	Ahmed *et al.* (2005)
Henderson	$Me = Xm(-\ln(1-aw)/(T+b))^n$	
Halsey	$Me = Xm(-\exp(bT)/\ln(aw))^n$	
Oswin	$Me = Xm(1+bT)(aw/(1-aw))^n$	
Chung-Pfost	$aw = \exp[-K/RT\exp(-CMe)$	Kaymak-Ertekin y Gedik (2004)
BET	$Me = XmCaw/[(1-aw)+(c-1)(1-aw)aw]$	
Chen	$aw = \exp(K - C\exp(-bMe)$	
Kuhn	$Me = (C/\ln aw)+K$	Taiwo *et al.* (2005)

Me: humedad de equilibrio; aw: actividad acuosa; T: temperatura; Xm, K, C, b, n: constantes propias del material

Para encontrar los parámetros de los modelos se utilizó el módulo no lineal del software Systat (Wilkinson, 1990). La desviación media relativa p y el coeficiente de correlación cuadrático R^2 fueron utilizados como los principales criterios estadísticos para determinar el mejor modelo matemático más preciso para describir las curvas experimentales. Adicionalmente se analizaron los gráficos de los residuos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados experimentales obtenidos relacionados con el contenido de humedad de equilibrio (EMC) para manzanas osmo-microdeshidratadas en las temperaturas estudiadas con su actividad de agua (aw) se muestran en la **Figura 1**.
Se puede observar que existe un entrecruzamiento de todas las curvas, típico comportamiento de los productos con alto contenido de azúcar (Yan *et al.* 2008 en bananas, Kaymak-Erketin y Gedik, 2004, Simal *et al.* 2007 en piña) en manzanas osmo-microdeshidratadas se divisa en aw mayores que 0,4.
En aw menores que 0,4 se contempla que la temperatura tiene una gran influencia sobre la EMC, ya que al aumentar la misma los valores de EMC son menores. Una de las razones de este comportamiento es que a medida que aumenta la temperatura las moléculas de agua se activan debido a su nivel de excitación causando menor estabilidad y ruptura de los sitios de unión entre el agua y el material alimenticio, disminuyendo así el contenido de humedad de monocapa. Otra razón es que se genera una disminución de la solubilidad de los sólidos de los alimentos (carbohidratos) en el agua, resultados coincidentes con Uribe *et al.* (2008).

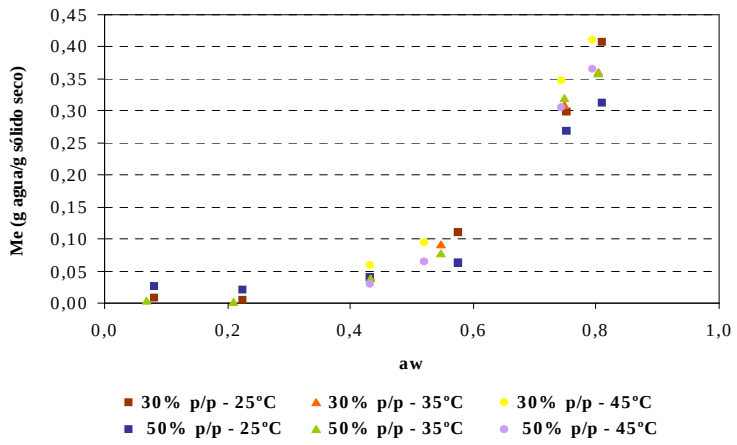


Figura 1. Isotermas de sorción obtenidas a diferentes temperaturas para manzanas osmo-microdeshidratadas obtenidas empleando diferentes concentraciones de agente osmótico y una potencia de 270 W.

Para aw mayores que 0,4 el contenido de humedad se incrementa por el aumento de la solubilidad de los carbohidratos presente en el producto. Una de las teorías que puede explicar este comportamiento es que el incremento de la humedad a alta aw es como consecuencia de un incremento de la actividad enzimática e intercambio de las moléculas de agua con los carbohidratos y proteínas de los diferentes alimentos, principalmente con aquellos que tienen altos contenidos de azúcar. Similares comportamientos se han observado en diferentes materiales por varios autores, tales como Lahsasni-Kouhila *et al.* (2003) en peras; Kaymak-Ertekin y Gedik (2004) en uvas y albaricoques; Uribe y col. (2008) en aloe vera, Yan et. al (2008) en bananas.

Si bien muchos autores (Simal *et al.* 2007, Kaymak-Ertekin y Gedik 2004, Uribe *et al.* 2008) han reportado que es común que las curvas isotérmicas de productos con alto contenido de azúcar intercepten en aw mayores que 0,65, en este trabajo se observó que la intersección ocurrió en una aw menor (aproximadamente 0,45); ésto se debe a que las muestras poseen mayor contenido de azúcar por el agregado de soluto durante el pretratamiento que lo normal (productos no deshidratados por ósmosis).

A efectos de realizar el ajuste de los datos experimentales mediante los modelos matemáticos, los valores observados fueron trabajados de dos maneras diferentes:

- para el ajuste de las ecuaciones de Henderson, Halsey, Oswin y Chung-Pfost se tomó el conjunto completo de datos (sin discriminar por concentración de agente osmótico, ni tampoco por temperatura dado que la isoterma incluye esta última variable en su expresión).
- para el ajuste de las ecuaciones GAB, BET, Kuhn y Chen, los datos se agruparon por temperatura (sin discriminar por concentración de agente osmótico), obteniendo los estadísticos y parámetros de los modelos para cada T.

Los resultados obtenidos del análisis de regresión no lineal mediante este procedimiento se muestran en la **Tabla 2** para aquellas ecuaciones que tienen en cuenta la temperatura, y en la **Tabla 3** para las que no la incluyen en sus expresiones.

Tabla 2. Parámetros estadísticos obtenidos en el ajuste de las ecuaciones isotermas que tienen en cuenta la temperatura.

Modelo	R^2	R^2 corr	SY	RSS	p
Henderson	0,748	0,556	0,104	0,366	4,252
Halsey	0,978	0,961	0,031	0,032	1,112
Oswin	0,977	0,959	0,031	0,034	0,820
Chung-Pfost	0,963	0,848	0,104	0,386	0,521

R^2: coeficiente de correlación; R^2 corr: coeficiente de correlación corregido; SY: desvío de la estimación; RSS: suma de cuadrados de los residuos; p: probabilidad.

Tabla 3. Parámetros estadísticos obtenidos en el ajuste de las ecuaciones isotermas que no tienen en cuenta la temperatura.

Modelo	T (°C)	R^2	R^2 corr	SY	RSS	p
BET	25	0,979	0,960	0,031	0,009	0,474
	35	0,987	0,978	0,031	0,006	1,280
	45	0,983	0,971	0,031	0,009	0,685
GAB	25	0,924	0,854	0,063	0,034	1,401
	35	0,929	0,878	0,063	0,033	3,280
	45	0,806	0,675	0,109	0,104	0,890
Kuhn	25	0,975	0,952	0,031	0,011	0,655
	35	0,991	0,984	0,021	0,004	2,664
	45	0,989	0,981	0,025	0,006	0,357
Chen	25	0,979	0,909	0,089	0,076	0,347
	35	0,990	0,959	0,063	0,035	0,276
	45	0,991	0,966	0,055	0,029	0,277

R^2: coeficiente de correlación; R^2 corr: coeficiente de correlación corregido; SY: desvío de la estimación; RSS: suma de cuadrados de los residuos; p: probabilidad.

Como se dijo anteriormente, la selección del modelo más apropiado se basa en un acuerdo entre los valores experimentales y los valores del modelo, y además en su simplicidad.
En las **Tablas 2** y **3** puede observarse que parámetros estadísticos demuestran que el modelo de Chen es el que mejor se ajusta los resultados observados, siendo los R^2 mayores que 0,95 y los valores de p menores que 0,35.
A modo de ejemplo, en la **Figura 2** se observa claramente el buen acuerdo que existe entre los datos experimentales a 25°C (puntos) y los predichos por el modelo (línea) en todo el rango de aw estudiado. Para las restantes temperaturas se obtuvieron gráficas similares.

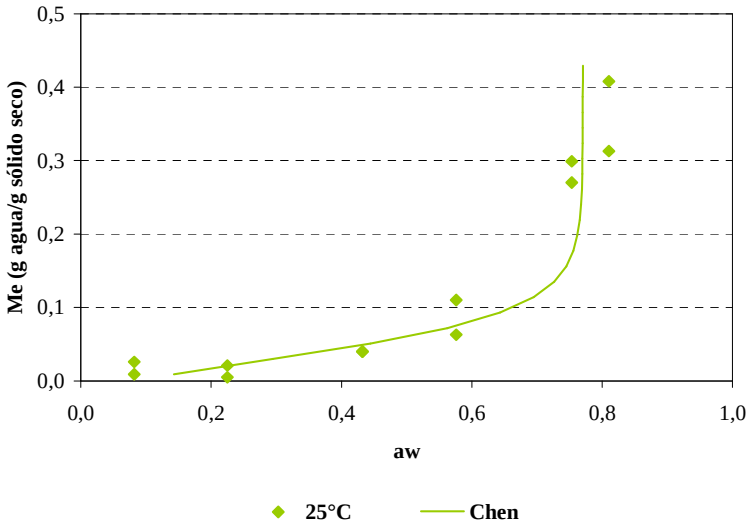


Figura 2. Valores experimentales (puntos) de sorción a 25ºC y predichos (línea) por el modelo de Chen para cubos de manzanas osmo-microdeshidratadas.

Hay que tener en cuenta que los parámetros estadísticos no son una evidencia suficiente para el buen ajuste de las isotermas de sorción basada en datos experimentales, también debe ser considerado el comportamiento de los residuos. Los residuos mostraron que el modelo de Chen tiene una distribución aleatoria o ramdom en todas las temperaturas analizadas. Acorde a estos resultados se considera al modelo de Chen como el mejor para predecir el comportamiento de las isotermas de manzanas osmo-microdeshidratadas a temperaturas entre 25ºC y 45°C y humedades relativas en el rango 0,06-0,81.
En este ajuste del modelo de Chen sobre el conjunto de datos experimentales agrupados por temperaturas (cuyos parámetros estadísticos se mostraron en la **Tabla 3**), se obtuvieron los valores para las constantes que se muestran en la **Tabla 4**

Tabla 4. Parámetros del modelo de Chen para la sorción de agua de manzanas osmo-microdeshidratadas para diferentes temperaturas en el rango 25-45°C.

T (°C)	Parámetros	ASE
25	K = -0,261 C = 2,139 b = 26,326	0,061 0,627 9,482
35	K = -0,255 C = 1,357 b = 18,676	0,042 0,149 3,363
45	K = -0,262 C = 1,296 b = 16,084	0,039 0,126 2,536

ASE: desvío del parámetro.

Una vez determinado el mejor modelo para describir los datos experimentales a cada temperatura, se realizó también un nuevo ajuste de los parámetros agrupando los resultados en función de la concentración agente osmótico (CAO) empleada en el pretratamiento, a fin de obtener un modelo más preciso para cada condición experimental. El resultado de este análisis se muestra en las **Tablas 5** (criterios estadísticos) y **6** (parámetros).

Tabla 5. Parámetros estadísticos obtenidos en el ajuste del modelo de Chen de los datos de sorción de agua de manzanas osmo-microdeshidratadas empleando diferentes concentraciones de agente osmótico, para diferentes temperaturas.

CAO	T (°C)	R^2	R^2 corr	SY	RSS	p
30%	25	0,986	0,939	0,089	0,025	0,320
	35	0,994	0,976	0,055	0,010	0,236
	45	0,996	0,984	0,044	0,007	0,214
50%	25	0,986	0,938	0,095	0,026	0,342
	35	0,990	0,960	0,077	0,017	0,309
	45	0,993	0,974	0,063	0,011	0,273

CAO: concentración del agente osmótico; R^2: coeficiente de correlación; R^2 corr: coeficiente de correlación corregido; SY: desvío de la estimación; RSS: suma de cuadrados de los residuos; p: probabilidad.

Tabla 6. Parámetros del modelo de Chen a distintas temperaturas en el rango 25-45°C para la sorción de agua de manzanas osmo-microdeshidratadas obtenidas con diferentes concentraciones de agente osmótico.

CAO (%p/p)	T (°C)	Parámetros	ASE
30%	25	K = -0,252 C = 1,632 b = 17,976	0,092 0,415 8,508
	35	K = -0,252 C = 1,251 b = 15,728	0,058 0,175 3,686
	45	K = -0,253 C = 1,358 b = 13,516	0,048 0,165 2,403
50%	25	K = -0,249 C = 4,255 b = 43,940	0,084 2,424 16,937
	35	K = -0,258 C = 1,550 b =24,202	0,070 0,308 7,253
	45	K= -0,265 C = 1,292 b = 21,269	0,058 0,194 4,976

CAO: concentración del agente osmótico; ASE: desvío del parámetro.

Se puede observar que este ajuste muestra valores de R^2 superiores y de p menores que los correspondientes al ajuste anterior del modelo (**Tabla 3**) realizado con los datos sin discriminar por efecto de la CAO.
En la **Figura 3** puede notarse cómo los datos experimentales agrupados ahora por T y por CAO resultan mejor descriptos por este modelo de Chen, con respecto de la figura anterior (**Figura 2**). Para las demás condiciones ensayadas se encontró similar comportamiento.

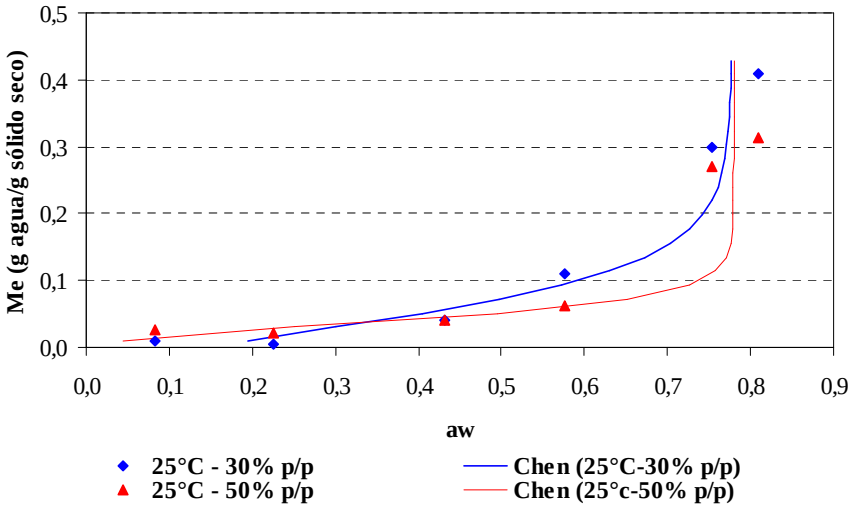


Figura 3. Valores experimentales (puntos) de sorción a 25ºC y predichos (líneas) por el modelo de Chen para manzanas osmo-microdeshidratadas en distintas concentraciones de jarabe.

Por otra parte, en la **Tabla 6** se observa que la constante K para 30% p/p se mantiene prácticamente invariable con la temperatura; en el caso de la muestras deshidratadas al 50% p/p se observa que este parámetro K disminuye levemente a medida que aumenta la temperatura (resultados similares a los reportados por Kaymak-Ertekin y Gedik 2004 en un estudio de equilibrio EMC-ERH de manzanas frescas y deshidratadas por aire caliente).
Para determinar si efectivamente la temperatura, y también la concentración del agente osmótico, ejercen alguna influencia sobre las constantes K, C y b del modelo de Chen, se realizó un análisis de la varianza (ANOVA), evidenciándose que ninguna de las dos variables resulta significativa sobre las mismas (**Tabla 7**).

Tabla 7. Análisis de la influencia de la temperatura (T) y de la concentración de agente osmótico (CAO) sobre las constantes K, C y b.

Constante	Variable	Suma de cuadrados	gl	Cuadrado medio	F	p	F-Tabla	Significativo
K	T	$0,723 \times 10^{-4}$	2	$0,362 \times 10^{-4}$	1,269	0,441	19,000	No
	CAO	$0,375 \times 10^{-4}$	1	$0,375 \times 10^{-4}$	1,316	0,370	18,513	No
	Error	$0,57 \times 10^{-4}$	2	$0,285 \times 10^{-4}$				
C	T	3,337	2	1,669	1,569	0,389	19,000	No
	CAO	1,359	1	1,359	1,278	0,376	18,513	No
	Error	2,127	2	1,064				
b	T	207,7	2	103,8	1,953	0,339	19,000	No
	CAO	296,7	1	296,7	5,580	0,142	18,513	No
	Error	106,3	2	53,2				

T: temperatura; CAO: concentración del agente osmótico; gl: grados de libertad; F: test de Fisher; p: probabilidad.

CONCLUSIONES

En el ensayo del equilibrio sorcional se observó una intersección de todas las curvas EMC-ERH para aw mayor que 0,4; como consecuencia se concluye que este cruce es debido a que a elevadas aw la solubilidad de los sólidos del producto aumenta generando un incremento del contenido de humedad de equilibrio. A su vez, este cruce se produjo en una aw menor que lo habitual en productos no osmotizados a causa de la absorción de soluto durante el pretratamiento.

En el modelado de los datos EMC-ERH, la ecuación de Chen fue la más satisfactoria para ajustar los valores obtenidos, pudiendo ser utilizada para predecir el comportamiento sorcional de los cubos osmo-micro deshidratados de manzanas *Granny Smith* en el rango de temperaturas de 25 a 45ºC y en el de rango de aw 0,06 a 0,081.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A.O.A.C. 1980. Official Methods of Analysis, 13th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.

Ahmed J, Khan AR and Ramaswamy H. 2005. Moisture adsorption isotherms for date-wafer. Proceeings of IADC-3rd Inter-American Drying Conference, Paper V:3.

Cordeiro DS, Raghavan GSV, Oliveira WP. 2006. Equilibrium moisture content models for Maytenus ilicifolia leaves. Biosystems Engineering, 94: 221-228.

Kaymak-Ertekin F, Gedik A. 2004. Sorption isotherms and isosteric heat of sorption apricots, apples and potatoes. Lebensm.-Wiss. u.-Technol., 37: 429–438.

Lahsasni S, Kouhila M, Mahrouz M, Kechaou N. 2002. Experimental study and modelling of adsorption and desorption isotherms of prickly pear peel (*Opuntia ficus indica*). Journal of Food Engineering, 55: 201-207.

Lahsasni S, Kouhila M, Mahrouz M, Fliyou M. 2003. Moisture adsorption-desorption isotherms of prickly pear cladode (*Opuntia ficus indica*) at different temperatures. Energy Conversion and Management, 44: 923-936.

Silvi M. 2008. Influencia de la humedad inicial y la temperatura de secado sobre el coeficiente de difusión durante el secado de soja en capa delgada. Tesis de Licenciatura en Tecnol. Alimentos, Facultad de Ingeniería UNICEN, Argentina.

Simal S, Femenia A, Castell-Palou A, Roselló C. 2007. Water desoprtion thermodynamic properties of pineapple. Journal of Food Engineering, 80: 1293-1301.

Soysal Y, Öztekin S. 1999. Equilibrium moisture content equations for some medicinal and aromatic plants. J. agric. Engng Res., 74: 317-324.

Soysal Y, Öztekin S. 2001. Comparison of seven equilibrium moisture content equations for some medicinal and aromatic plants. J. agric. Engng Res., 78: 57-63.

Taiwo Akanbi Ch, Sikiru Adeyemi R, Ojo A. 2005. Drying characteristics and sorption isotherm of tomato slices. Journal of Food Engineering, 73: 157–163.

Uribe E, Miranda M, Lemus R, Vega-Gálvez A. 2008. Moisture adsorption and desorption isotherms of Aloe Vera (*Aloe Barbadensis Miller*) and determination of sorption heats. International Journal of Food Engineering, 4(4), Artible 12.

Wilkinson L. 1990. SYSTAT: The System for Statistics. SYSTAT Inc., Evanston IL, USA.

Yan Z, Sousa-Gallaagher MJ, Oliveira FAR. 2008. Sorption isotherms and moisture sorption hysteresis of intermediate moisture content banana. Journal of Food Engineering, 86: 342-348.

Viabilidad de *Listeria monocytogenes* en un sistema de alimento adicionado con combinaciones de compuestos fenólicos

Listeria monocytogenes viability in food system with phenolic compounds

Rodríguez Vaquero, M. J., Manca de Nadra, M. C.

Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA), Chacabuco 145 y Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán (UNT), Ayacucho 471. San Miguel de Tucumán. 4000. E-mail: mariajo@fbqf.unt.edu.ar

RESUMEN

El método de conservación utilizado para carne fresca y productos cárnicos es la refrigeración, con el fin de extender el tiempo de almacenamiento en refrigeración, se adicionan aditivos antimicrobianos de origen sintético. En la actualidad, tiene gran interés el uso de productos naturales como alternativa de conservantes de alimentos, entre los de mayor estudio, se encuentran los compuestos derivados de vegetales. Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios normalmente presentes en las plantas y poseen numerosas propiedades beneficiosas para la salud del hombre. En trabajos previos demostramos que las combinaciones de ácidos gálico-protocatéquico, gálico-cafeico y quercetina-rutina son óptimas para inhibir sinérgicamente el crecimiento de *L. monocytogenes* en medio de cultivo. El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto antibacteriano de las combinaciones mencionadas sobre la viabilidad celular de *L. monocytogenes* en carne de pescado. Las combinaciones de compuestos fenólicos se adicionan en concentraciones de 100 y 200 mg/l (50:50 v/v) en la carne inoculada con *L. monocytogenes* y se incuban a 20 y a 4ºC durante 21 días. El número de células viables se determina por el método de diluciones sucesivas en medio selectivo Palcam a distintos tiempos de incubación. Se realiza un control sin compuestos fenólicos. A 20°C, en el medio control se observa crecimiento de 3,87 ciclos logarítmicos, a 21 días. Con el agregado de 100 mg/l de las diferentes combinaciones de compuestos fenólicos, todas producen inhibición en el crecimiento, sin muerte celular. Las mezclas de los ácidos gálico-protocatéquico, gálico-cafeico y quercetina-rutina disminuyen el crecimiento en 35,9%, 75,5% y 90,7%, respectivamente. Con 200 mg/l de las combinaciones de gálico-protocatéquico, gálico-cafeico y quercetina-rutina, se observa muerte de las células inoculadas al medio de 1,0, 1,96 y 2,8 ciclos logarítmicos, respectivamente. En el medio control de carne de pescado, a 4°C, se observa crecimiento de *L. monocytogenes*, incrementando a 21 días 0,60 ciclos log el recuento de bacterias. El agregado de 100 mg/l de las combinaciones de gálico-protocatéquico, gálico-cafeico y quercetina-rutina produce muerte bacteriana en 2,0; 4,1 y 5,6 ciclos logarítmicos, respectivamente, respecto al inóculo. Con la adición de 200 mg/l de las combinaciones de gálico-cafeico y quercetina-rutina, no se detectaron bacterias a los 14 días. Los resultados demuestran la posibilidad de utilizar combinaciones de compuestos fenólicos, especialmente mezclas de quercetina-rutina y ácidos gálico-cafeico, como biopreservativos naturales de alimentos.

ABSTRACT

The method used for preservation of fresh meat and meat products is cooling, in order to extend the storage period under refrigeration, synthetic antimicrobials additives are added. At present, is keen to use natural products as alternative food preservatives, among the most study are the compounds derived from plants. Phenolic compounds are secondary metabolites normally present in plants and have many beneficial properties for human health.In previous work, we demonstrate that gallic-protocatechuic acids, gallic-caffeic acids and quercetin-rutin combinations were the most effectives to inhibit synergistically the growth of *L. monocytogenes* in a culture medium. The objective was to evaluate the antibacterial effect of the above combinations on the viability of *L. monocytogenes* in fish meat. Phenolic compound combinations were added at a final concentration of 100 and 200 mg/l (50:50 v/v) in meat inoculated with *L. monocytogenes* and incubated at 20°C and 4ºC for 21 days. The survivors of *L. monocytogenes* were enumerated at different time intervals 0, 4, 7, 14 and 21 d. The samples were serially diluted and spread on Palcam agar. Plates were incubated at 30°C for 24 h before enumeration. The controls were carried without phenolic compounds. At 20°C, *L.*

monocytogenes growth 3.87 log cycles in control medium, at 21 d. The addition of 100 mg/l of all phenolic compound combinations produced growth inhibition, without cellular death. Gallic-protocatechuic acids, gallic-caffeic acids and quercetin-rutin combinations decreased the growth of the bacterium 35.9%, 75.5% and 90.7%, respectively. With 200 mg/l gallic-protocatechuic acids, gallic-caffeic acids and quercetin-rutin produced cellular death, reducing 1.0, 1.96 and 2.8 log cycles, the inoculated cells, respectively. At 4°C, *L. monocytogenes* growth 0.60 log cycles in the control medium with fish meat, at 21 d. The addition of 100 mg/l of the combinations of gallic-protocatechuic acids, gallic-caffeic acids and quercetin-rutin produced cellular death, reducing by 2.0, 4.1 and 5.6 log cycles the number of inoculated cells, respectively. With the addition of 200 mg/l of gallic-caffeic acids and quercetin-rutin there were not detected viable cells at 14 d. The results demonstrated the possibility to use phenolic compounds combination, especially, quercetina-rutin and gallic.caffeic acids combinations as natural preservative of food.

PALABRAS CLAVE: *L. monocytogenes, pescado, compuestos fenólicos, sinergismo.*

KEYWORDS: *L. monocytogenes, fish, phenolic compound, synergism.*

INTRODUCCIÓN

En la denominación general de "compuestos fenólicos" se incluyen sustancias heterogéneas, que se caracterizan por poseer un anillo aromático con al menos una sustitución hidroxilo (**Figura 1**). La reactividad de este tipo de moléculas se debe tanto a la presencia de la función fenol que, por la movilidad de su átomo de hidrógeno, presenta un carácter ácido, como el núcleo bencénico que puede sufrir sustituciones electrofílicas. Los compuestos fenólicos son considerados metabolitos secundarios (Randhir y col., 2004). Bell (1981) define los metabolitos secundarios como aquellos que no poseen un papel reconocido en el mantenimiento de los procesos fundamentales de la vida (crecimiento, desarrollo y reproducción) de los organismos que lo sintetizan. Parecen no tener un papel explícito en la economía total del organismo. Los compuestos fenólicos pueden sufrir polimerizaciones o ser degradados produciendo metabolitos primarios (Haslam, 1986).Los compuestos fenólicos están ampliamente distribuidos en la naturaleza y concentrados principalmente en piel de frutas y semillas. Los compuestos fenólicos tienen importancia en alimentos y medicamentos por sus propiedades beneficiosas para la salud humana, captadores de radicales libres, antialérgicas, antidepósito de triglicéridos, antiinflamatorias, antivirales, etc.

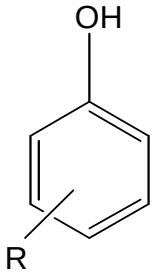
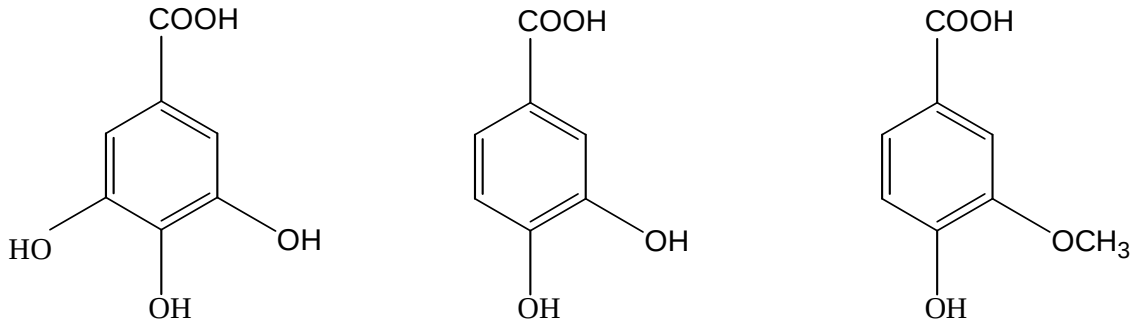


Figura 1. Estructura química básica de los compuestos fenólicos.

De acuerdo con su esqueleto carbonado, los compuestos fenólicos se agrupan en clases o familias, siendo las más importantes, los compuestos fenólicos no flavonoides y flavonoides.

Los compuestos fenólicos no flavonoides contienen un único anillo bencénico que, dependiendo de los sustituyentes, da lugar a diversas estructuras. Se los conoce también como compuestos fenólicos de bajo peso molecular. Algunos ejemplos son los compuestos derivados del ácidos benzoicos (ácidos gálico, protocatéquico y vainillínico) y compuestos derivados del ácido cinámico, portadores de cadena lateral insaturada (ácido cafeico). Los compuestos fenólicos no flavonoides se encuentran en la naturaleza en forma libre o combinada. En el caso de los ácidos benzoicos, sus combinaciones son poco frecuentes, al contrario de lo que ocurre con los ácidos cinámicos, que se suelen encontrar casi siempre combinados con otras moléculas como hidroxiácidos, azúcares y otros compuestos fenólicos. (**Figura 2**). Los compuestos fenólicos flavonoides están formados por dos ciclos bencénicos unidos

por una cadena de tres átomos de carbono. Normalmente, estos tres átomos de carbono dan lugar a un heterociclo oxigenado (pirano). Los diversos tipos de compuestos flavonoides se diferencian por el grado de oxidación y de sustitución del heterociclo. A su vez, dentro de cada familia flavonoidea, los distintos compuestos se diferencian por el número y localización de los grupos hidroxilos y/o metoxilo en los anillos A y B. La forma habitual en que se encuentran en la naturaleza es en combinaciones con azúcares, mediante uniones O-heterosídicas y, con menor frecuencia, C-heterosídicas. Los glucósidos pueden, a su vez, encontrarse esterificados o no (**Figura 3**).



Acido Gálico ***Acido Protocatéquico*** ***Acido Vainillínico***

Figura 2. Estructura química de compuestos no flavonoides derivados del ácido hidroxibenzoico.

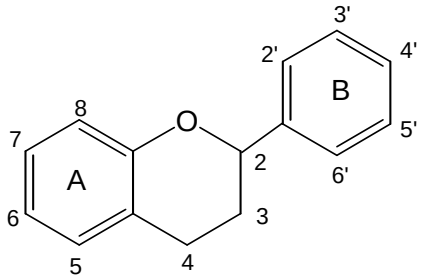


Figura 3. Estructura básica de los flavonoides.

La contaminación de alimentos por microorganismos es un tema de preocupación mundial que aún no se encuentra bajo control. Los alimentos pueden contaminarse con microorganismos patógenos, principalmente *Clostridium sporogenes, Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus, Pseudomonas* y *Escherichia coli*. *Listeria monocytogenes* es un bacilo Gram (+), psicrófilo, esta última característica define su capacidad para desarrollar a bajas temperaturas, demostrándose que sobrevive y desarrolla a 3°C en caldo triptosa fosfato, a 4°C en leche y a 0°C en carnes. Posee un amplio espectro de distribución ambiental, siendo aislada de una gran variedad de hábitats, como aguas residuales, barros de aguas residuales, agua, tierra, ensilados, vegetales, carnes crudas y heces (Trepat i Quilez, 2002). Se ha reconocido a *Listeria monocytogenes* como un agente de enfermedades transmitidas por alimentos, postulándose que los alimentos pueden llegar a contaminarse por heces de hombre y animales infectados o portadores fecales asintomáticos. La penetración del microorganismo puede efectuarse por vía digestiva a través de la ingestión de alimentos contaminados y una vez atravesada la barrera intestinal se produce una infección sistémica. Las principales vías de transmisión de *Listeria* son el contacto directo del hombre con el animal infectado, la infección cruzada durante el período neonatal, y la transmisión alimentaria.

El uso de nuevos productos antimicrobianos naturales para la preservación de alimentos es la tendencia actual, debido al incremento en la resistencia de los microorganismos a los conservantes alimentarios tradicionales y al utilizar compuestos fenólicos como agentes antimicrobianos podrían atribuir un beneficio adicional a los conservantes tradicionales, debido a sus numerosas propiedades beneficiosas para la salud del hombre.

Rodríguez Vaquero *et al.(*2007a, 2007b y 2008) demostraron que los compuestos fenólicos poseen actividad antibacteriana sobre *Proteus mirabilis, Serratia marcescens, Klebsiella pneumoniae, Flavobacterium sp., Listeria monocytogenes, Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC

35218, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 25923 y *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 29213. Los autores demostraron que entre los compuestos fenólicos estudiados, ácido cafeico, rutina y quercetina son los compuestos fenólicos más efectivos como antibacterianos.
En trabajos previos se demostró que las combinaciones de ácidos gálico-protocatéquico, gálico-cafeico y quercetina-rutina son óptimas para inhibir sinérgicamente el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en medio de cultivo.
El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto antibacteriano de las combinaciones mencionadas sobre la viabilidad celular de *L. monocytogenes* en carne de pescado.

MATERIALES Y MÉTODOS

L. monocytogenes se selecciona por ser contaminante de alimentos y producir enfermedades en el consumidor. *L. monocytogenes* crece en medio BHI, que contiene en g/l: infusión de cerebro 200,0; infusión de corazón 250,0; peptona 10,0; NaCl 5,0; glucosa 2,0 y Na_2HPO_4 2,5. El pH se ajusta a 7,0 antes de la esterilización. El medio selectivo utilizado para el desarrollo de *L. monocytogenes* es el medio Palcam que contiene en g/l: Agar base, 39,0; D-glucosa, 0.5; D-manitol, 10,0; esculina, 0,8; citrato de hierro y amonio, 0,5; rojo fenol, 0,08; cloruro de litio, 15,0. Se adiciona al medio un vial de Suplemento Selectivo, que contiene por gramo en UI: Polimixina B, 50000; Acriflavina HCL, 0,0025 y Ceftazidima, 0,01.

Preparación de compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos (ácidos gálico, protocatéquico, cafeico, quercetina y rutina) se disuelven en etanol 99,8% y se esterilizan por filtración utilizando membranas filtrantes GV (Durapore) EM PVDF de 0,22 μm de poro, 25 mm de diámetro, Millipore.

Efecto antibacteriano de combinaciones de compuestos fenólicos en carne de pescado

Se pesan 10 gramos de carne de pescado y se colocan en bolsas estériles para stomacher, las combinaciones de compuestos fenólicos seleccionadas (ácidos gálico-protocatéquico, gálico-cafeico y quercetina-rutina) se adicionan en 10 ml de solución fisiológica estéril hasta obtener una concentración de 100 mg/l (50 mg/l de cada compuesto) o 200 mg/l (100 mg/l de cada compuesto) y se coloca sobre la carne de pescado, se inocula con *L. monocytogenes* ($1,0 \times 10^9$ ufc/ml) y se incuban durante 21 días a 20°C o 4ºC. El control se realiza sin la adición de compuestos fenólicos. A los días 0, 4, 7, 14 y 21 se toman alícuotas y se determina el número de células viables por el método de diluciones sucesivas en medio Palcam.
A partir de las gráficas de log ufc/ml vs tiempo se calcula el "tiempo de reducción decimal" (*D*) que es el tiempo en el que mueren el 90% de las células inoculadas al medio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la **Figura 4** se observa el número de células viables de *L. monocytogenes* inoculada en carne de pescado adicionada con combinaciones de compuestos fenólicos a 20°C y 4ºC.
En el control a 20ºC, se observa un crecimiento de *L. monocytogenes* de 3,87 ciclos logarítmicos, a 21 días (**Figura 4a**). A 4° C, la bacteria crece en el control de carne de pescado, incrementando 0,60 ciclos log el número de células, al final de la incubación (**Figura 4b**).
Los resultados de viabilidad de la **Figura 4** en presencia de las combinaciones de compuestos fenólicos se resumen en la **Tabla 1**.
A 20°C, con el agregado de 100 mg/l de las combinaciones, todas producen inhibición en el crecimiento, sin muerte celular. Las mezclas G-P, G-C y Q-R disminuyen el crecimiento en 35,9%, 75,5% y 90,7%, respectivamente. Con 200 mg/l, se observa la muerte de las células inoculadas al medio con las tres combinaciones, siendo la Q-R la más efectiva. El valor *D* encontrado para la combinación Q-R es 3 y 1,2 veces menor que los valores *D* encontrados para las combinaciones G-P y G-C, respectivamente (**Tabla 1**).
A 4°C, el agregado de 100 mg/l todas las combinaciones producen muerte bacteriana, los menores valores de *D* se observan con las combinaciones G-C y Q-R. Con 200 mg/l de las combinaciones el efecto antibacteriano incrementa. A 14 días no se detectan bacterias en las muestras suplementadas con las combinaciones G-C y Q-R, con valores de *D* de aproximadamente 1 día.

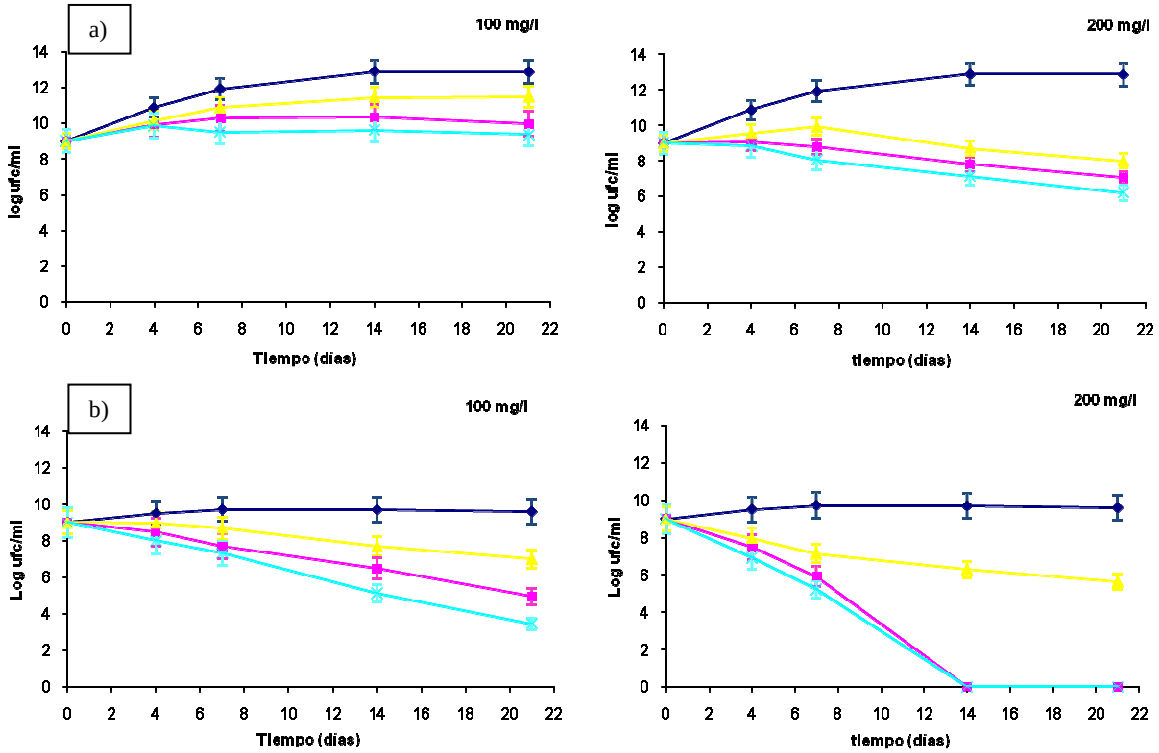


Figura 4. Efecto de combinaciones de compuestos fenólicos en carne de pescado sobre la viabilidad de *L. monocytogenes*: a) 20°C y b) 4°C. (◊) Control, (■) ácidos gálico-cafeico, (▲) ácidos gálico-protocatéquico y (ж) Quercetina-rutina.

Tabla 1: Reducción del números de células viables de L. monocytogenes, a 21 días de almacenamiento a 20°C y 4°C, en carne de pescado adicionada con combinaciones de compuestos fenólicos.

Combinaciones	Reducción en ciclos logarítmicos de *L. monocytogenes* a 21 días											
	20°C						**4°C**					
	100 mg/l			**200 mg/l**			**100 mg/l**			**200 mg/l**		
	C	**I**	***D***	**C**	**I**	***D***	**C**	**I**	***D***	**C**	**I**	***D***
G-P	1,39	-	-	4,87	1,0	21,0	2,6	2,0	9,0	3,96	3,36	4,4
G-C	2,92	-	-	5,83	1,96	8,5	4,65	4,05	5,2	9,6*	9,0*	1,2
Q-R	3,51	-	-	6,67	2,8	6,9	6,15	5,55	4,0	9,6*	9,0*	1,3

C: Ciclos logarítmicos reducidos respecto al control. **I:** Ciclos logarítmicos reducidos respecto al inóculo.
D: Tiempo de reducción decimal (días). **(-):** No se observa disminución. ***** A 14 días no se detectan células viables.

Los resultados muestran que las combinaciones de quercetina-rutina y de los ácidos gálico-cafeico son más efectivas que la combinación de los ácidos gálico-protocatéquico en carne de pescado. También se observa que la efectividad de compuestos fenólicos como antibacterianos se potencia a 4°C.
L. monocytogenes se aisla de una gran variedad de alimentos, que incluyen productos lácteos, aves de corral y productos cárnicos (Broseta *et al.* 2003). Los numerosos brotes de enfermedades ocasionados se debe a que *L. monocytogenes* es capaz de crecer a la temperatura de refrigeración (Cressy *et al.*, 2003). Mytle *et al.*(2006), observaron que *L. monocytogenes* en carne de pollo, crece 1,0 log ufc/g a 5°C en 14 días. Al incrementar la temperatura a 15°C el crecimiento aumenta apreciablemente. Numerosos agentes antimicrobianos provenientes de plantas se probaron contra *L. monocytogenes*, Bahk *et al.*(1990) y Beuchat *et al.*(1994) reportaron que bajas temperaturas aumentan la capacidad inhibitoria de los extractos de plantas.

CONCLUSIONES

La industria de alimentos se enfrenta a consumidores cada vez más informados y exigentes en lo que se refiere a la seguridad del alimento y que rechazan el uso de aditivos químicos. Actualmente se ha incrementado el interés por los conservantes de origen natural, los extractos más comunes para este objetivo son los obtenidos a partir de hierbas, diversas especies de plantas y frutos.

Nuestros resultados demuestran la posibilidad de utilizar combinaciones de compuestos fenólicos, especialmente mezclas de quercetina-rutina y ácidos gálico-cafeico, como biopreservativos naturales para ser utilizados en la industria de los alimentos.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bahk, J., Yousef, A. E., y Marth, E. H. 1990. Behavior of *Listeria monocytogenes* in the presence of selected spices. *Lebensmitel- Wissenschaft und-Technologie*, 23, 66–69.

Bell, E.A. 1981. Secondary plant products. En The biochemistry of plants. Vol 7 E.E. Conn. Ed. Academic Press, London, New York.

Beuchat, L. R., Brackett, R. E., y Doyle, M. P. 1994. Lethality of carrot juice to *Listeria monocytogenes* as affected by pH, sodium chloride and temperature. *Journal of Food Protection*, 57, 470–474.

Broseta, S. M., Diot, A., Bastian, S., Riviere, J., y Cerf, O. 2003. Estimation of low bacterial concentration: *Listeria monocytogenes* in raw milk. *International Journal of Food Microbiology*, 80, 1–15.

Cressy, H. K., Jerrett, A. R., Osborne, C. M., y Bremer, P. J. 2003. A novel method for the reduction of numbers of *Listeria monocytogenes* cells by freezing in combination with an essential oil in bacteriological media. *Journal of Food Protection*, 66, 390–395.

Mytle, N., Anderson, G. L., Doyle, M. P. y Smith M. A. 2006 Antimicrobial activity of clove (Syzgium aromaticum) oil in inhibiting *Listeria monocytogenes* on chicken frankfurters. *Food Control* 17 (2006) 102–107.

Randhir, R., Lin, Y. T., y Shetty, K. 2004. Phenolics, their antioxidant and antimicrobial activity in dark germinated fenugreek sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors. Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition, 13, 295–307.

Rodríguez Vaquero, M.J. and Manca de Nadra, M.C., 2008. Growth parameter and viability modifications of *Escherichia coli* by phenolic compounds and argentine wine extracts. Applied Biochemistry and Biotechnology. Doi: 10,1007/s12010-008-8197-0.

Rodríguez Vaquero, M.J., Alberto, M.R. and Manca de Nadra, M.C., 2007a. Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control* 18, 93 – 101.

Rodríguez Vaquero, M.J., Alberto, M.R. and Manca de Nadra, M.C., 2007b. Influence of phenolic compounds from wines on the growth of *Listeria monocytogenes*. Food Control, *vol. 18*, 587 - 593.

Trepat i Quilez, M. (2002) “Incidencia y comportamiento de Salmonella y Listeria de pechugas de pavo curadas”. Tesis doctoral Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Veterinaria.

Estudio de la cristalización térmicamente inducida en suero de soja liofilizado

Study of thermally induced crystallization in lyophilized soybean whey

Sobral P (1), Wagner J (2)

(1) Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA)
Facultad de Ciencias Exactas (UNLP-CONICET), 47 y 116 (B1900AJJ) La Plata, Provincia de Buenos Aires, Argentina.
(2) Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes, Roque Sáenz Peña 352 (B1876BXD) Bernal, Pcia. de Buenos Aires, Argentina
jwagner@unq.edu.ar

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto del tratamiento térmico y las condiciones de almacenamiento sobre la cristalización de azúcares en suero de soja liofilizado (SSL). El SSL se preparó por liofilización del suero de soja, que queda como sobrenadante isoeléctrico de la obtención de aislados. Los componentes mayoritarios del SSL son los carbohidratos (sacarosa y los oligosacáridos estaquiosa, rafinosa y verbascosa) seguido de los factores antitrípticos de Kunitz y Bowman-Birk y de la lectina (todos con actividad biológica), con una relación carbohidratos: proteína total de 3: 1. El análisis por calorimetría diferencial de barrido (DSC) en condiciones anhidras, del SSL almacenado sin previo tratamiento térmico, presentó una endoterma correspondiente a la fusión de cristales de azúcares con una temperatura de pico (Tp) a ≈ 65°C. Se prepararon muestras de SSL tratado térmicamente en cápsulas selladas herméticamente y en condiciones anhidras, a una velocidad de 5°C/min hasta 180°C, temperatura a la cual las proteínas de suero se desnaturalizan totalmente y alcanzan la máxima glicosilación. Las cápsulas con SSL calentado (SSLC), se enfriaron 30 min. en hielo-agua y se almacenaron a temperatura ambiente, bajo dos condiciones: cápsula cerrada y cápsula abierta en ambiente deshidratado (HR≈0). Las muestras SSLC almacenadas a distintos tiempos se analizaron por DSC para evaluar el grado de cristalización de azúcares. Los termogramas de SSLC almacenado ≈4 hs en cápsula cerrada no evidencian transiciones; luego de 15 días de almacenamiento los termogramas presentan una transición (Tp= 161,9°C; ΔH= 127,2 J/g) atribuible a la fusión de cristales formados durante el almacenamiento. Las muestras SSLC almacenados en cápsula abierta presentan luego de 12 días de almacenamiento, dos transiciones con Tp= 147,4 y 190,1ºC con ΔH= 3,2 y 21,8 J/g, respectivamente. Estas diferencias se atribuyen a que el agua liberada dentro de la cápsula durante el calentamiento (por reacción de Maillard y/o caramelización), si queda atrapada dentro de la cápsula (cápsula cerrada), contribuye a la hidratación de los cristales formados lo cual disminuye su temperatura de fusión, respecto a los cristales anhidros formados en condiciones de no confinamiento. Si en estas condiciones se prolonga el almacenamiento hasta 22 días, se obtiene una única transición (Tp= 200,5ºC; ΔH= 78,1 J/g). Se concluye que para tiempos de almacenamiento similares (12-15 días), la posibilidad de eliminar agua conduce a una menor cristalización de azúcares (5 veces menos asumiendo que entalpía ≈ masa de cristales) y a una mayor estabilidad de los cristales formados (Tp ≈ 30°C mayor). Se postula que la presencia de agua induciría la hidrólisis de oligosacáridos, dando azúcares con mayor tendencia a cristalizar. La mayor temperatura de fusión de los azúcares formados a tiempos largos de almacenamiento se atribuye a fenómenos de recristalización.

ABSTRACT

The objective of this work was to study the effect of the thermal treatment and the storage conditions on the crystallization of sugars in lyophilized soybean whey (LSW). The LSW was prepared by lyophilization of soybean whey, which is generated as isoelectric supernatant during the preparation of soy protein isolates. The more abundant components in LSW are the carbohydrates (sucrose and the oligosaccharides stacchiose, raffinose and verbascose) followed by Kunitz and Bowman-Birk trypsin inhibitors and lectin (all with biological activity), with a carbohydrates: proteins ratio of 3: 1. Differential scanning calorimetry (DSC) of LSW was performed under anhydrous conditions; in

thermogram of this sample without previous thermal treatment can be identified an endotherm which correspond to the sugar melting with a peak tempertarure (Tp) ≈ 65°C. LSW samples were heated in anhydrous condition inside the hermetic aluminium pans using a heating rate of 5°C/min up to 180°C; this temperature ensures the total protein denaturation and a maximum glycosylation. Once finished the heat treatment, the pans were cooled on ice for 30 minutes, proving the samples of heated lyophilized soybean whey (LSW-H). Half of these pans were kept closed and half opened. In both conditions, samples of LSW-H were stored at 25°C and at 0% relative humidity and then, samples were analyzed to evaluate the sugars crystallization degree by DSC. LSW-H stored for over 4 hours, no evidence any transition in termogramas; after 15 days of storage, DSC termogramas have a transition (Tp = 161.9 ° C, ΔH = 127.2 J / g) due to melting of sugar crystals formed during storage. LSW-H samples present, after 12 days of storage in open pans, two transitions with Tp = 147.4 and 190.1 °C (ΔH = 3.2 and 21.8 J/g), respectively. These differences are attributed to the released water into the pan during the heating (due to caramelization or Maillard reaction). If this water gets trapped inside the pans (closed pans) contributes to the hydration of the crystals formed which reduces its melting temperature, compared to anhydrous crystals formed on a non-confinement. If storage is prolonged in these conditions until 22 days, a single transition (Tp = 200.5ºC; ΔH = 78.1 J/g) was observed. We concluded that at similar periods of storage (12-15 days) the possibility to eliminate water conduce to a less crystallization degree (5 times less assuming enthalpy ≈ crystal mass) and to greater stability of the crystals formed (Tp 30°C bigger). We hypothesize that the presence of water would lead to hydrolysis of oligosaccharides, giving sugar to a greater tendency to crystallize. The highest melting temperature of the sugars crystal formed during a long storage time is attributed to recrystallisation phenomena.

PALABRAS CLAVE: *Suero, soja, liofilizado, cristalización, almacenamiento.*

KEYWORDS: *Whey, soybean, lyophilized, crystallization, storage.*

INTRODUCCIÓN

La producción tradicional de aislados genera un líquido residual denominado suero de soja el cual contiene cerca del 25% de las proteínas del grano, la mayoría de ellas biológicamente activas (Pearson 1983, Cheftel *et al*. 1989). Este suero, aunque es generalmente descartado, contiene proteínas, hidratos de carbono, isoflavonas, minerales, vitaminas, pudiéndose por lo tanto convertirse en un subproducto utilizable tanto por su valor nutricional como funcional.

Las proteínas mayoritarias que contiene el suero de soja son la lectina y los factores antitrípticos de Kunitz y de Bowman-Birk, que fueron identificados por SDS-PAGE (Iwabuchi y Yamauchi 1987) y sus propiedades térmicas y superficiales estudiadas por Sorgentini y Wagner (1999). Sin embargo los componentes mayoritarios del suero de soja son los hidratos de carbono solubles, entre ellos el más abundante es la sacarosa, seguido de la estaquiosa (oligosacárido típico de la soja) y trazas de glucosa, xilosa y fructosa (Espinosa-Martos *et al*. 2006, Espinosa-Martos y Rúperez 2006).

Se presentan dos inconcientes en el uso directa del suero de soja en alimentación humana, uno es la alta dilución del suero, ya que el contenido de sólidos totales no supera el 3% p/v (Sobral y Wagner 2009); el otro es que los factores antinutricionales están activos requiriendo un tratamiento térmico para su activación. Una estrategia posible es secar el suero y realizar la inactivación en estado deshidratado. El suero de soja deshidratado contiene 10,7% de proteínas, 6,9 % de NNP, 55% de hidratos de carbono y 13,4 % de minerales. Trabajos previos permitieron establecer que para lograr la desnaturalización de los inhibidores de tripsina en condiciones anhidras se tienen que alcanzar los 150°C y que con un tratamiento hasta 180°C, además de la inactivación se producen reacciones de glicosilación y caramelización debido al alto contenido de azúcares del suero (Sobral y Wagner 2007).

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de un tratamiento térmico que asegure la inactivación de los factores nutricionalmente indeseables sobre la cristalización y recristalización de los oligosacáridos presentes en función del tiempo y las condiciones de almacenamiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

El suero de soja (SS) fue obtenido según el procedimiento descrito por Sorgentini y Wagner (1999), siendo el sobrenadante isoeléctrico resultante de la preparación de aislado nativo. El extracto acuoso a pH 8 de una harina de soja desgrasada (Prosam R, Solae, Brasil) en relación agua: harina 10:1 se llevó a pH 4,5 con HCl 2 N y se centrifugó (10500 g, 20 min., 4°C) para separar las globulinas de reserva del SS. El SS, en alícuotas de menos 5mm de altura, fue congelado a -80ºC durante 72 hs y liofilizado (HETO FD4, -35ºC, 500 µTorr.). El suero de soja liofilizado (SSL) se mantuvo en condiciones de humedad relativa igual a cero (P_2O_5) antes de su almacenamiento a -80°C. Luego de 125 días en estas condiciones se realizó sobre esta muestra un tratamiento térmico empleando cápsulas comerciales de aluminio (T.A. Instruments) selladas herméticamente empleando un calorímetro diferencial de barrido (Polymer Laboratorios, Rheometrics Scientific). Se utilizó una rampa de calentamiento de 5°C/min hasta 180°C. Finalizado el tratamiento las cápsulas fueron enfriadas (hielo, 30 min) y secadas con papel absorbente. El SSL calentado (**SSLC**) fue almacenado en condiciones de confinamiento (cápsulas cerradas) o de no confinamiento abriendo y recuperando el SSLC (cápsulas abiertas). Los almacenamientos fueron realizados a temperatura ambiente en atmósfera deshidratante. Finalizado el almacenamiento, el SSLC fue analizado en idénticas condiciones utilizando el mismo DSC hasta 250°C. La microestructura de las muestras fue estudiada mediante ESEM utilizando un microscopio ELECTROSCAN 2010 Enviromental Scanning Electrón Microscope, el cual permite trabajar en un rango de 0-20 Torr. en presencia de vapor de agua regulando parámetros tales como presión, temperatura y humedad para la observación de muestras no conductivas, las que no requieren de preparación previa.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El SSL resultó ser un producto higroscópico, lo cual puede atribuirse a alto contenido en sales (13,4 ± 0,30 % p/p) y en glúcidos (≈ 55% p/p), algunos de estos son muy hidratables (rafinosa.5H2O) (Sobral y Wagner 2007). A una humedad relativa del 75% se produce un incremento de su masa en un 9,08 ± 1,55; 20,78 ± 1,40 y 34,18 ± 1,26 % p/p en 30, 120 y 450 min., respectivamente. Esta alta velocidad de hidratación determinó que el SSL fuese conservado en condiciones de humedad relativa igual a cero.

El SSL anhidro tiene aspecto de polvo color arena formado por partículas sueltas. Se sabe por trabajos previos (Sobral y Wagner 2007) que el SSL almacenado a -80°C en condiciones anhidras analizado por calorimetría diferencial de barrido presenta una Tg del sistema próxima a -3.3°C y un pico endotérmico (Fa) a aproximadamente 65°C que correspondería a la fusión de micro cristales de azúcares no observables por ESEM (**Figuras 1** y **2**). Entre 100 y 180°C el termograma presenta una gran transición exotérmica correspondiente a la glicosilación de las proteínas presentes dentro de la cual la desnaturalización de las principales fracciones proteicas se presenta como sub-transiciones endotérmicas I y II (**Figura 2**). Por encima de los 180°C (máximo de glicosilación) el termograma cae bruscamente alcanzando su mínimo en 200°C lo que corresponde a reacciones de descomposición y carbonización.

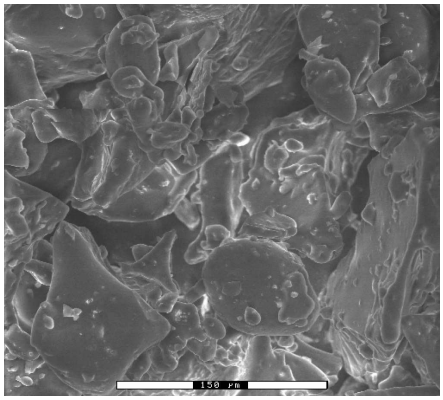


Figura 1. Microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM) de muestra de suero de soja liofilizado no tratado térmicamente analizado con un aumento de 290X. El aspecto de la muestra es el de una matriz amorfa con una distribución de tamaño de gránulos causada por el proceso de molienda propiamente dicho; en la parte inferior de la micrografía se inserta una barra de referencia de tamaño de 150 µm.

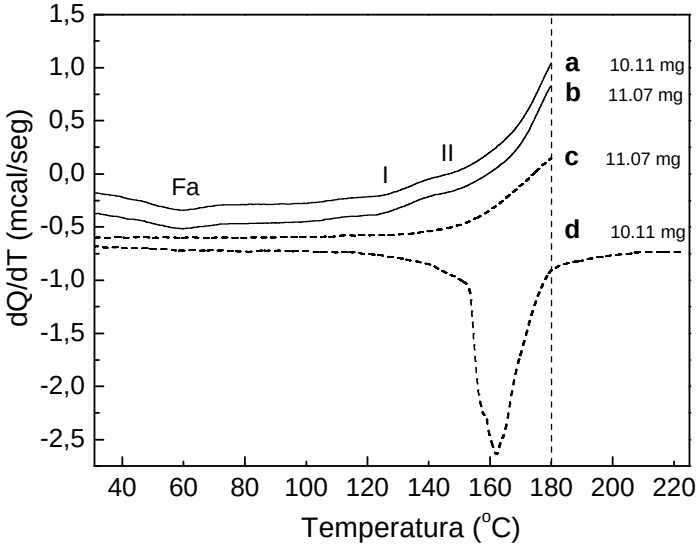


Figura 2. Los termogramas **a** y **b** (——) corresponden al tratamiento térmico en condiciones de confinamiento aplicado al SSL hasta 180ºC (rampa 5ºC/min.). Los termogramas **c** y **d** (– – –) corresponden a las cápsulas **b** y **a**, respectivamente, enfriadas y almacenadas cerradas a Tamb y vueltas a analizar por DSC en las mismas condiciones. Los tiempos de almacenamiento fueron: **c**) 2 hs y **d**) 15 días. Se indican las masas de muestra SSL empleadas.

Para analizar el efecto del almacenamiento de una muestra de SSL previamente sometida a calentamiento se eligió el tratamiento a 180°C. A esta temperatura los cristales de azúcar preexistentes fueron fundidos y se produjeron todas las reacciones esperables en el suero liofilizado. A simple vista el SSL tratado hasta 180ºC (SSLC180) es un caramelo de color pardo-rojizo. Debido al alto contenido en azúcares es de suponer que en el SSLC180, enfriado y almacenado, luego de un tiempo suficiente, cristalicen dichos azúcares. Debido a las reacciones de glicosilación y caramelización la cristalización puede producirse de un modo diferente que en el suero no calentado. También es esperable que influyan las condiciones de almacenamiento. Las características térmicas de la nueva forma cristalina adoptada por la muestra almacenada serán evidenciadas en un segundo ensayo de DSC por la temperatura y área de la endoterma de fusión de los cristales formados. Los termogramas del SSLC180 almacenado en condiciones de confinamiento (cápsula cerrada), son mostrados en la **Figura 2**. Los dos termogramas ubicados en la parte superior corresponden al comportamiento térmico (primer corrida) del SSL el cual presenta la transición Fa correspondiente a la fusión de cristales de azúcares sin glicosilación (generados por recristalización durante el almacenamiento a –80ºC). En los termogramas inferiores se observa el comportamiento térmico (segunda corrida) del SSLC180 luego de diferentes tiempos de almacenamiento. Se observa que para tiempos de almacenamiento muy cortos (2 hs.) el termograma obtenido adopta una forma similar a los del primer ensayo pero sin la presencia de las transiciones Fa, I y II, por haberse fundido los cristales sin detectarse una nueva cristalización y haberse desnaturalizado totalmente las proteínas del suero. El tiempo de almacenamiento no es suficiente como para permitir ninguna clase de reordenamiento estructural, aun cuando a temperatura ambiente se está por encima de la Tg del sistema. Por el contrario, luego de un almacenamiento mas prolongado (15 días) se forman cristales de azúcares con una estructura bastante estable, lo que se traduce en una transición con una alta temperatura de pico (Tp = 161,9ºC); transición que presenta además una elevada entalpía de fusión (ΔH = 127,2 J/g).

Los termogramas obtenidos con el SSLC180 almacenado en condiciones deshidratantes (cápsula abierta) son mostrados en la **Figura 3**. Luego de 12 días de almacenamiento aparecen dos transiciones: una a 147,4ºC (ΔH= 3,2 J/g) y otra de mayor área a 190,1ºC (ΔH=21,8 J/g). Si el almacenamiento se prolonga, vemos que luego de 22 días se observa una única transición con mayor temperatura y entalpía de fusión (Tp = 200,5ºC; ΔH = 78,1 J/g). Resulta evidente que la posibilidad de eliminar agua juega un papel importante tanto en la formación como en la temperatura de fusión de los cristales de azúcares. Considerando tiempos de almacenamiento similares (12-15 días) con la cápsula cerrada, la cristalización es seis veces superior (ΔH=161,9 J/g) que con cápsula abierta (ΔH=25 J/g). Para esto

asumimos que el área de pico ≈ entalpía de fusión ≈ masa de cristales formados. Con relación a la estabilidad de los cristales formados en condiciones de confinamiento, los mismos tienen una Tp casi 30ºC menor que cuando la cápsula está abierta, considerando para este segundo caso la transición más importante.

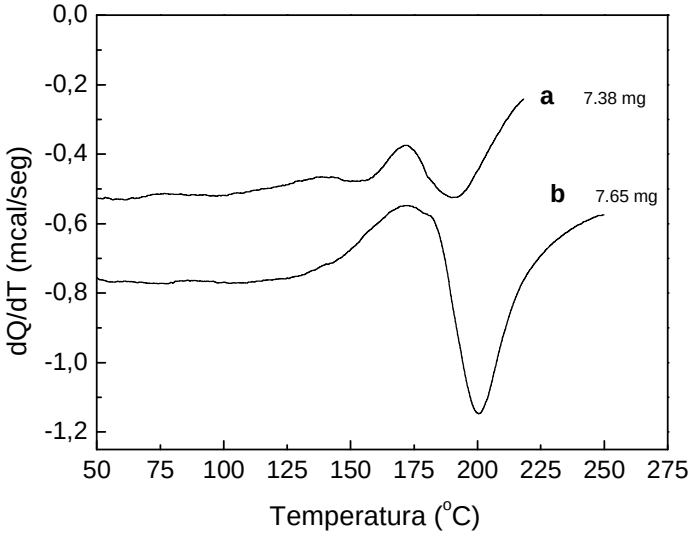


Figura 3. Termogramas DSC correspondientes a SSLC180 almacenado a temperatura ambiente fuera de la cápsula en desecante durante: **a**) 12 días; **b**) 22 días. Junto a cada termograma se indican las masas de muestra empleada.

El análisis en conjunto de los valores de entalpía y temperatura de las transiciones, indica que en condiciones de confinamiento se forma una cantidad 6 veces mayor de cristales pero menos estables debido a la retención del agua. En condiciones idénticas de almacenamiento (no-confinamiento), podemos analizar el fenómeno de recristalización. En la **Figura 3** pudo verse que luego de 12 días de almacenamiento en estado deshidratado el SSLC tiene por lo menos dos poblaciones de cristales de azúcares con diferente temperatura de fusión; luego de 22 días de almacenamiento se genera una única población de cristales con una mayor estabilidad (mayor Tp) debidos tanto a un fenómeno de recristalización como a la eliminación del agua y por lo tanto la reducción de efecto plastificante. Estos cristales debido a su gran tamaño pueden visualizarse fácilmente por ESEM (**Figura 4**). Además de los cristales (indicados como C) se puede observar en la micrografía (**Figura 4a**) un mayor grado de compactación y la aparición de estructuras tales como puentes (B) que conectan y unen porciones del liofilizado que antes del tratamiento térmico se encontraban separadas y huecos (H) que son las "huellas" dejadas en la matriz por los productos gaseosos generados durante el calentamiento. Estos productos pueden ser gases preexistentes eliminados (CO_2, O_2) o puede haber adoptado ese estado como consecuencia del desprendimiento de vapores generados por el tratamiento térmico (H_2O, NH_3). De esta manera, durante el tratamiento térmico ocurre en forma simultánea la reacción de pardeo no enzimático la cual genera productos gaseosos que no pueden escapar (por el sellado de la cápsula); lo que ocasiona un aumento de la presión dentro de la cápsula. Esto gases bajo presión se acumulan y formar burbujas las cuales deforman el material (hecho también facilitado por la alta temperatura que incrementa la plasticidad de la matriz) y originan las cavidades que persisten luego del enfriamiento originando los huecos vistos.

Si bien hasta el momento se dijo que 180°C es la temperatura en la que se alcanza el máximo grado de glicosilación, no hay razones para suponer que estos procesos tengan influencia sobre la tendencia a la cristalización de los azúcares, sino por el contrario, si estos toman parte de una glicosilación quedarían menos libres para cristalizar. A fin de explicar la mayor tendencia a la formación de cristales de azúcares en el SSLC 180°C se deben recurrir a otras hipótesis. En principio, sabemos que más del ≈55% p/p del SSL es de azúcares (proteínas<18%) y que estos son mayoritariamente oligosacáridos. En segundo lugar ya observamos que tienen muy poca tendencia a cristalizar, ya que ensayos con SSL calentados a 90ºC (en los que los azúcares fueron totalmente fundidos) no cristalizan luego del enfriamiento y almacenamiento similares a los descriptos en este trabajo. Se puede inferir entonces que el calentamiento a temperaturas tan altas en las que se producen reacciones de Maillard y

caramelización en las cuales hay liberación de agua, esta promueve la hidrólisis de los oligosacáridos. Esta hidrólisis aumenta la cantidad de azúcares simples con mayor tendencia a la cristalización. Cuando el almacenamiento se realiza en cápsula cerrada, el agua generada durante el tratamiento térmico permanece retenida y puede producir cristales hidratados los cuales tienen menor T_f que los correspondientes cristales anhidros. La fusión de azúcares puros ocurre a mayor temperatura en cristales anhidros: la D-glucosa anhidra (monosacárido) tiene una T_f de 146ºC, temperatura que se reduce a 86ºC para la α-D-glucosa.xH_2O; un disacáridos como la maltosa en estado anhidro funde en un rango comprendido entre 160 a 165ºC mientras que en su forma hidratada maltosa.xH_2O se reduce a 102-103ºC (Ross 1993). Estos valores apoyan el hecho que la presencia de pequeñas cantidades de agua durante la cristalización pueden permitir la formación de especies cristalinas hidratadas, las cuales tienen T_f sensiblemente menores a la correspondientes formas anhidras; además hay que tener presente que uno de los sacáridos típicamente presentes en soja es la rafinosa, la cual tiende a hidratarse con 5 moléculas de agua, especie que tiene una T_f de 80°C determinada por DSC (Roos 1993). De esta forma tenemos en un comienzo dentro de la cápsula de DSC un ambiente con HR=0; en la medida que la temperatura se eleva (durante el primer tratamiento térmico) se produce en una primera instancia la fusión de los cristales de azúcares que se completa a ≈ 75ºC y cuando supera los 100ºC comienza la liberación de productos de Maillard tales como furfural, NH_3, CO_2 y H_2O, la cual en condiciones de confinamiento queda atrapada aumentado la HR del ambiente. Además, como toda transición de primer orden, la fusión de los azúcares (aun los que no se hidratan) se produce a una menor temperatura en presencia de agua (Roos 1993), lo que explica la marcada diferencia en las temperaturas de fusión de los cristales para tiempos de almacenamientos similares dependiendo de si el agua fue o no eliminada.

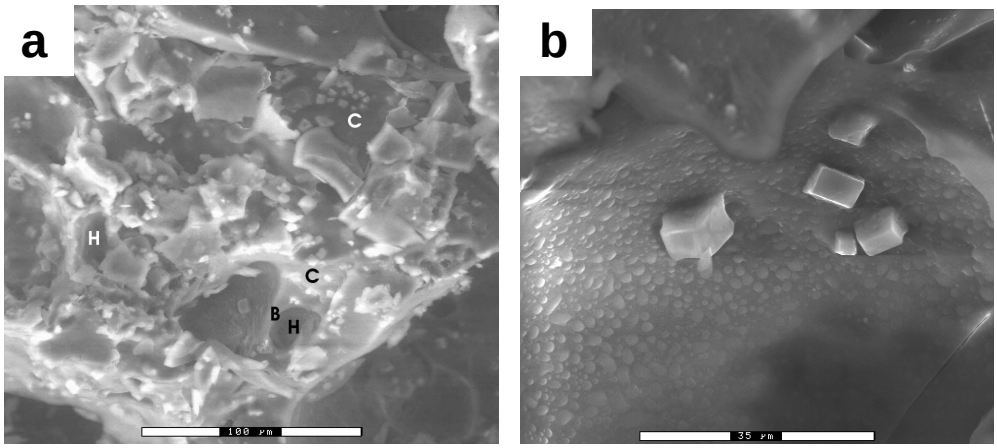


Figura 4: ESEM de muestra de suero de soja liofilizado, tratado térmicamente hasta 180ºC (SSLC180) con un aumento de 400X (a) y 1300X (b). Al pie de las mismas se incluyen escalas de referencia de 100 y 35 µm.

CONCLUSIONES

El calentamiento en condiciones controladas del suero de soja liofilizado conduce a la formación de una matriz tipo caramelo como resultado de reacciones de glicosilación, agregación proteica y caramelización de oligosacáridos.

Después de enfriamiento y con un almacenamiento no muy prolongado, se induce la formación de cristales de azúcares en el caramelo enfriado. Esta cristalización desencadenada por el tratamiento térmico se atribuye a la formación de azúcares simples como resultado de la hidrólisis de los oligosacáridos típicos de soja a alta temperatura en presencia del agua liberada.

El tipo, la estabilidad y la cantidad de cristales de azúcares formados dependen en gran medida del tiempo de almacenamiento que se da para el reordenamiento cristalino así como de la posibilidad de eliminar agua.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo dado por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) por los subsidios PICT 2002-09-10768 y PICTO-UNQ 2006-36473 y en forma especial, el apoyo financiero de la Universidad Nacional de La Plata y la Universidad Nacional de Quilmes (Programa I+D 53/1007).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Cheftel JC, Cuq JL, Lorient D. 1989. Proteínas Alimentarias. Zaragoza. Acribia S.A. Pág. 364.

Espinosa-Martos I, Préstamo G. Composición y Propiedades del Suero de Soja, un subproducto de la elaboración del tofu. Alimentaria, marzo: 72-73.

Espinosa-Martos I, Rupérez P. 2006. Soybean oligosaccharides. Potential as new ingredients in functional food, Nutr. Hosp. 21: 92-96.

Iwabuchi S, Yamauchi F. 1987. Electrophoretic analysis of whey proteins present in soybean globulin fractions. J. Agric. Food Chem. 35: 205-209.

Pearson AM. 1983. Soy proteins. En: Hudson BJF, editors. Developments in Food Protein. 2da edición. Londres: Applied Science. pag. 67-108.

Sobral PA, Wagner JR. 2007. Thermal properties of soybean whey and its protein. En: Lupano CE editor. Functional Properties of Food Components. 1a ed. Kerala: Research Signpost. Pag.. 57-76.

Sorgentini DA, Wagner JR. 1999. Comparative study of structural characteristics and thermal behavior of whey and isolate soybean proteins, J. Food Biochem. 23: 489-507.

Roos YH. 1993. Food Components and Polymers En: Taylor SL editor. Phase Transitions in Foods. 2a ed. San Diego: Academic Press. pag 109-156.

Efecto del secado en capa delgada sobre las características de calidad de cebada variedad Scarlett

Effect of thin-layer drying on quality characteristics of malting barley Scarlett variety

Sologubik CA (1), Crozza DE (1,2), Pagano AM (1,2)

(1) TECSE, Depto. de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería – UNICEN
(2) PROGRAMA INSTITUCIONAL ALIMENTOS – UNICEN
Av. Del Valle 5737, 7400 (Olavarría), Buenos Aires, Argentina,
Email anamariapagano@yahoo.com.ar

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de los distintos tratamientos de secado sobre algunas características de calidad del grano (poder germinativo, contracción volumétrica, densidad real) y el comportamiento de la cinética de secado de los granos de cebada cervecera (*Hordeum distichum* L.) variedad Scarlett expuestos a la repetición de un ciclo de humidificación y secado, bajo diferentes condiciones: humedad inicial del grano (15,16 y 18,24% b.s., base seca), temperatura (20, 28 y 38°C) y velocidad (0,8 y 1,5 m/s) del aire de secado. Las muestras fueron acondicionadas agregando agua en forma de spray para llevar el contenido de humedad a 15,16 y 18,24% b.s., se mantuvieron 48 horas en reposo y se sometieron al secado en un túnel secadero piloto de bandejas (Armfield). El poder germinativo se determinó según el método estándar ASBC Barley 3C, IOB, y EBC procedure, en tanto la contracción volumétrica mediante micrometría y la densidad real a través de picnometría líquida con xileno. Los resultados obtenidos indican que temperaturas de secado superiores a 20°C son inadecuadas por reducir el poder germinativo por debajo de la tolerancia de recibo (95%) de la cebada para maltería. El rango de variación del diámetro equivalente fue de 0,004356 a 0,00456 m y de la densidad real de 1188,891 a 1298,101 kg/m^3, afectados significativamente por la temperatura de secado ($p \leq 0,0005$ y $p \leq 0,0001$), la humedad inicial ($p \leq 0,0001$) y la velocidad del aire ($p \leq 0,0001$ y $p \leq 0,0051$) respectivamente. A su vez, la repetición de un ciclo de humidificación y secado no influyó sobre la cinética de secado del grano de cebada cervecera variedad Scarlett, ya que las curvas de secado del primer ciclo de humidificación-secado (H-S) no fueron estadísticamente (95% de confianza) diferentes de las curvas de secado del segundo ciclo de humidificacion-secado ($p \leq 0,854$). Los resultados obtenidos sugieren que, a fin de conservar la calidad de las semillas, el secado se debe realizar a una temperatura no mayor a los 20°C para granos con un contenido de humedad inicial entre 15 y 18% b.s., y que la capacidad de pérdida de agua de los granos no varía ante la repetición de un ciclo de humidificación y secado.

ABSTRACT

The aim of this work was to study the effect of different drying treatments on characteristics of grain quality (germination power, volumetric shrinkage, real density) and the drying kinetics of barley grains (*Hordeum distichum* L.) Scarlett variety exposed to repeated cycles of wetting and drying, under different conditions: two initial grain moisture contents (15,16 and 18,24% d.b., dry basis), three drying temperatures (20, 28 and 38°C) and two drying air velocities (0,8 and 1,5 m/s). Samples were conditioned by adding water as a spray in order to obtain moisture contents of 15,16% and 18,24% d.b., then kept 48 hours hermetically stored and dried in a tunnel dryer pilot (Armfield).

The germination power was determined by the standard ASBC method Barley 3C, IOB and EBC procedure, while the volumetric shrinkage was measured by micrometry and the real density through liquid pycnometry with xylene. The results indicate that drying temperatures above 20°C are inadequate because reduce the germination power below the tolerance of receipt (95%) for malting barley grains.

The range of variation of the equivalent diameter was 0,00456 to 0,004356 m and the real density of 1188,891 to 1298,101 kg/m^3, significantly affected by the drying temperature ($p \leq 0,0005$ and

p≤0,0001), the initial moisture content (p≤0,0001) and the air velocity (p≤0,0001 and p≤0,0051), respectively.
The repetition of a cycle of wetting and drying (H-S) did not influence the drying kinetics of malting barley grains Scarlett variety, in virtue of drying curves for the first H-S cycle did not were statistically different to drying curves for the second H-S cycle (p≤0,854). The results suggest that, in order to preserve the quality of seeds, drying should be performed at a temperature no greater than 20°C for grains with initial moisture contents of between 15% and 18% d.b., and that the ability of water loss from the grains does not vary with the repetition of a cycle of wetting and drying.

PALABRAS CLAVE: *cebada cervecera, secado, calidad.*

KEYWORDS: *malting barley, drying, quality.*

INTRODUCCIÓN

La producción de cebada cervecera (*Hordeum distichum* L.) en Argentina es de aproximadamente 1,4 mill. de tonelada y es destinada casi en su totalidad a la producción de cerveza (SAGPyA 2008). Por lo que las semillas secadas hasta alcanzar la humedad de almacenamiento seguro (12% base seca), deben conservar las características de calidad para cumplir con las condiciones exigidas por la industria maltera. Dentro de los parámetros de calidad, el poder germinativo es uno de los que mayor importancia reviste a la hora de tomar la decisión de comprar y fijar el precio. El poder germinativo establece para el productor importantes rebajas en el valor de venta: para valores inferiores al 98% y hasta un 95% se descuenta a razón del 1% del precio de venta por cada punto de reducción del poder germinativo, en tanto que porcentajes de germinación menores al 95% determinan el rechazo de la mercadería (CABCBAU 2008).
El proceso de secado a alta temperatura en caso de que no sea correctamente monitoreado puede producir pérdidas de peso, de poder germinativo y fisuras en las semillas que se tornan más propensas a las roturas (AMBAINC 2008).
A su vez, el secado afecta el tamaño de los granos produciendo una contracción volumétrica de los mismos por la extracción de la masa de agua necesaria al acondicionarlos a la humedad establecida para su almacenamiento seguro. Esto reviste importancia al momento de determinar la necesidad de infraestructura para el acopio de los granos, siendo una medida eficaz de la contracción volumétrica la determinación del diámetro equivalente de las semillas (Gupta y Das 1997). Así, el secado produce una merma de la masa húmeda de los granos y reduce su calibre. Un criterio que vincula estas dos características es la densidad real, la cual relaciona la masa de grano contenida en un volumen de grano y resulta ser una medida efectiva para comparar los efectos producidos por distintos tratamientos de secado aplicados sobre las semillas, ya que la velocidad de remoción de agua afecta el tamaño de los granos y en consecuencia la densidad real (Kachru 1994).
El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de los distintos tratamientos de secado sobre algunas características de calidad del grano (poder germinativo, contracción volumétrica, densidad real) y el comportamiento de la cinética de secado de los granos de cebada cervecera (*Hordeum distichum* L.) variedad Scarlett expuestos a la repetición de un ciclo de humidificación y secado, bajo diferentes condiciones: humedad inicial del grano (15 y 18% base seca), temperatura (20, 28 y 38°C) y velocidad del aire de secado (0,8 y 1,5 m/s).

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestra

Granos limpios y secos de cebada variedad Scarlett cosecha 2007/08, humedad 9,703% b.s., densidad real 1287 kg/m^3, peso hectolítrico 735 kg/m^3, peso de 1000 granos 42,751 g, diámetro equivalente 4,344 x 10^{-3} m.

Acondicionamiento de las submuestras

Se pesaron 12 muestras de 100 g cada una, se colocaron en recipientes herméticos y a seis (6) de ellas se le agregó en forma de spray el agua necesaria para que alcancen una humedad el 15,16% b.s. Con las seis (6) restantes se procedió de igual forma, sólo que agregando el agua necesaria para alcanzar una humedad del 18,24% b.s. Las muestras humidificadas se dejaron reposar a temperatura ambiente

24 horas permitiendo la distribución homogénea del agua añadida en todo el grano previo a realizar los ensayos de secado.
El volumen de agua agregada se calculó a través de:

$$w = I\left[\frac{M_2 - M_1}{100 - M_2}\right] \quad (1)$$

Donde w es la cantidad de agua que debe agregarse; I es el peso de la muestra en g; M_1 y M_2 son los contenidos de humedad inicial y final de la muestra en %.

Diseño experimental

Se realizaron 24 ensayos en un experimento factorial considerando las variables contenido de humedad inicial M_o (15,16 y 18,24% b.s.), temperatura de secado (20, 28 y 38°C) y velocidad del aire de secado V (0,8 y 1,5 m/s), con dos repeticiones.

Procedimiento experimental

Los ensayos de secado se realizaron en un secadero batch tipo túnel "Armfield" (rango de velocidad de 0 a 2 m/s y temperatura de 0 a 46ºC). Previo a los test las condiciones de secado se estabilizaron durante 60 min y se procedió a disponer las muestras en una capa delgada sobre los contenedores del equipo de secado (20 cm de largo, 7 cm de ancho y 2 cm de alto) y éstos se ubicaron dentro del secadero para dar inicio al proceso de secado. A intervalos regulares cada uno de los contenedores se extrajeron del túnel y se pesaron en una balanza electrónica (Ohaus modelo GT 410, 400 g de capacidad, sensibilidad 0,001 g) para poder cuantificar la pérdida de masa.
La velocidad del aire se controló por medio de un sistema electrónico y se registró con un anemómetro digital (LCA modelo 6000, serie 0,25-0,30 m/s, error ± 0,1 m/s). En tanto un controlador PID controló automáticamente la temperatura del aire. A su vez se registró mediante un psicrómetro aspirado (Papst modelo ZP 611) las propiedades (temperatura de bulbo seco y húmedo) del aire circundante al equipo de secado con el fin de calcular la humedad relativa del ambiente y del aire de secado mediante la carta psicrométrica electrónica Akton Psychrometric Chart Version 3.1 (Akton Associates Incorporated, 1996).

Repetición de un ciclo de humidificación y secado

Las muestras originales (contenido de humedad 9,703% b.s.) se acondicionaron a valores de humedad inicial del orden de 15% b.s. y 18% b.s., y luego fueron secadas a temperaturas de 20-28-38°C y velocidades de aire de secado 0,8-1,5 m/s. El material secado en ese primer ciclo se volvió a humidificar y secar en una segunda etapa (2do. ciclo).

Determinación de la Densidad Real (DR)

Se empleó el método de picnometría líquida mediante un picnómetro Beckman, Modelo 930, de 25 mL a 20ºC utilizando xileno en tres repeticiones. Las pesadas se realizaron en balanza analítica (Ohaus modelo GT 410, 400 g de capacidad, sensibilidad 0,001 g) (Kachru 1994).
Se pesó el picnómetro lleno con xileno (enrasado y seco), luego 10 granos de cebada que se introdujeron en el picnómetro, el cual se enrasó y secó previo a registrar su peso nuevamente. El volumen real ocupado por los granos se calculó según la ecuación:

$$V = \frac{Pa + S - Ps}{\delta xileno} \quad (2)$$

donde: Pa = peso del picnómetro lleno de xileno (g); Ps = peso picnómetro lleno de xileno y con 10 semillas de cebada (g); S = peso de 10 semillas de cebada (g); δxileno= densidad del xileno (0,864966 g/mL). La densidad real de los granos se determinó empleando la ecuación:

$$DR = \frac{S}{V} \times 1000 \quad (3)$$

donde: V = volumen real ocupado por las semillas de cebada (g); DR = densidad real (kg/m^3).

Determinación del Diámetro Equivalente (D_{eq})

Se midieron las longitudes (Largo, Ancho y Espesor) de 100 granos de cebada empleando un Micrómetro Mitutoyo (resolución 0,001 mm). El diámetro equivalente de la semilla fue determinado usando la siguiente expresión (Gupta y Das 1997).

$$D_{eq} = (L \times A \times E)^{(1/3)} \quad (4)$$

donde: L = longitud (m); A = ancho (m.); E = espesor (m).

Determinación del Poder Germinativo (PG)

Se utilizó el método estándar de remojado: 10 horas remojo – 18 horas exposición al aire en seco – 8 horas remojo – 12 horas exposición al aire en seco, con el objetivo de aumentar la humedad de los granos hasta 40-45% b.s. A continuación, el poder germinativo se determinó mediante el método estándar ASBC Barley 3C, IOB, y EBC procedure. American Society of Brewing Chemists, Ninth Edition, (2004) (Langrell y Edney 2006).

Se colocaron 100 granos de cebada en dos capas de papel de filtro Whitman Nº1, y en una placa de Petri de 9 cm de diámetro, a continuación se añadieron 4,0 mL de agua purificada. Las muestras se mantuvieron a 25ºC y 90% de Humedad Relativa en una cámara de germinación. Los granos fueron removidos después de las 24 y 48 horas, se hizo un recuento final a las 72 horas. Se realizó por duplicado (Langrell y Edney 2006).

Criterios estadísticos

Para evaluar el efecto de las variables del proceso sobre las características de calidad del grano se empleó la técnica de análisis de la varianza aplicando el software Systat (Wilkinson 1990); también se tuvieron en cuenta los criterios coeficiente de correlación corregido, error de la estimación y desviación media relativa estándar.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El poder germinativo (PG), tal como se muestra en la **Figura 1**, disminuyó con el incremento de la temperatura de secado variando desde un valor máximo de 99% para la muestra original acondicionada al 18,24% b.s. sin tratamiento de secado hasta un mínimo de 85,5% correspondiente a las muestras acondicionadas a humedades de 15,16% y 18,24% b.s. que fueron secadas a 38ºC a una velocidad de aire de 1,5 m/s. Las muestras acondicionadas a 15,16% y 18,24% b.s. y secadas a la menor temperatura (20°C) tuvieron valores de PG dentro del estándar de comercialización que impone un mínimo de un 95% poder germinativo, pero las muestras de los restantes ensayos no lograron alcanzar este límite.

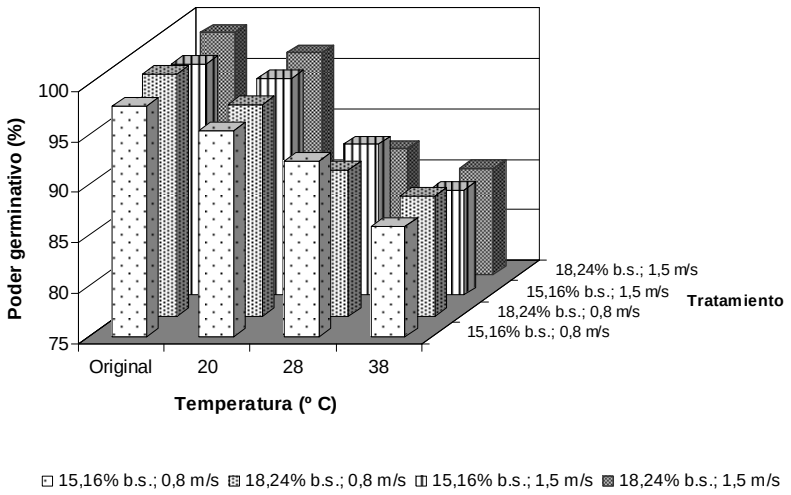


Figura 1. Efecto de diferentes condiciones de secado sobre el poder germinativo de cebada cervecera variedad *Scarlett* acondicionada a distintos tenores de humedad inicial
(Original: muestra sin tratamiento de secado).

El análisis de varianza (nivel de confianza 95%) demostró que la temperatura de secado es la variable que causa un efecto significativo ($p \leq 0{,}0001$) sobre el poder germinativo del grano, siendo despreciable la influencia del contenido inicial de humedad y de la velocidad del aire de secado. Esto estaría indicando que temperaturas de secado por encima de 20ºC afectan negativamente al embrión del grano de cebada variedad Scarlett reduciéndose así el número de semillas germinadas.

Respecto al diámetro equivalente (D_{eq}), el rango de variación fue de 0,004356 a 0,00456 m y, como lo muestra la **Figura 2**, disminuyendo al incrementarse la temperatura y la velocidad del aire de secado, y

aumentando con el aumento del contenido de humedad inicial de los granos. El mayor D_{eq} correspondió a la muestra con humedad inicial de 18,24% b.s. secada a la menor temperatura y velocidad (20ºC y 0,8 m/s). En tanto que la muestra acondicionada a 15,16% b.s. y secada a la mayor temperatura y velocidad (38ºC y 1,5 m/s) fue la que menor D_{eq} presentó.

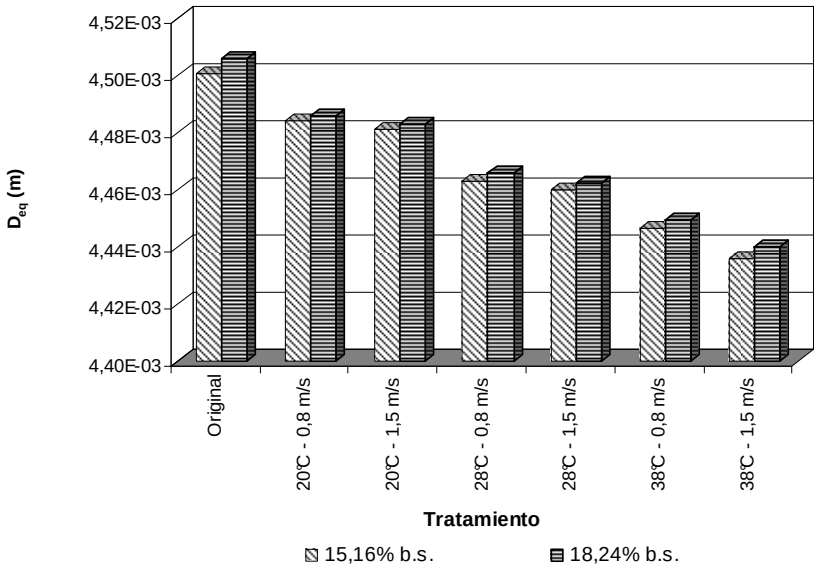


Figura 2. Efecto de diferentes condiciones de secado sobre el diámetro equivalente de cebada cervecera variedad *Scarlett* acondicionada a distintos tenores de humedad inicial
(Original: muestra sin tratamiento de secado).

El análisis de varianza demostró que las tres variables temperatura ($p \leq 0,0005$), humedad inicial ($p \leq 0,0001$) y velocidad del aire ($p \leq 0,0001$) evidenciaron un efecto significativo sobre el diámetro equivalente del grano.
Para la densidad real (DR) el rango de variación fue de 1188,891 a 1298,101 kg/m^3, correspondiendo la mayor DR a la muestra del test 18,24% b.s.-38ºC-0,8 m/s, en tanto que la menor densidad real se encontró en la muestra acondicionada a 15,16% b.s. y secada a 20ºC-0,8 m/s.
El análisis de varianza mostró que la densidad real es afectada significativamente por la temperatura de secado ($p \leq 0,0001$), por el contenido de humedad inicial ($p \leq 0,0001$) y por la velocidad del aire de secado ($p \leq 0,0051$).
Con vistas a estudiar la cinética de secado del grano de cebada se construyeron curvas relacionando la humedad adimensional MR=(M-M0)/((M0-Me) en función del tiempo de secado, donde M0 es la humedad a tiempo cero (humedad inicial de cada corrida), M es la humedad a tiempo t, y Me es la humedad de equilibrio para las condiciones de secado, la cual se calculó a partir de la ecuación isoterma de Chung-Pfost (ASAE, 1999) ajustada mediante un análisis de regresión no lineal con el módulo de NonLin de Systat (Wilkinson, 1990) sobre la base de datos experimentales de equilibrio de sorción de agua de cebada reportados por Sun y Woods (1994).
En primer lugar, se observó que las muestras con mayor humedad inicial se secaron más rápidamente que las de menor humedad inicial. Por ejemplo, como se muestra en la **Figura 3** a 38°C y 0,8 m/s, para llegar a una MR de 0,7 considerando sólo el primer ciclo H-S fueron necesarias 2,8 h cuando se partió de 15,16% b.s., mientras que sólo se requirieron 1,9 h cuando M0=18,24% b.s.
También se observó un efecto acelerador del proceso de secado atribuible al incremento de la temperatura: por ejemplo para secar granos con una humedad inicial de 18,24% b.s a 0,8 m/s hasta un valor de MR de 0,7 considerando nuevamente sólo el primer ciclo H-S se necesitaron 6,9 h a 20°C, a 3 h 28°C y sólo 1,9 h a 38°C.
A fin de analizar el efecto de la repetición de un ciclo H-S sobre la cinética de deshidratación de los granos de cebada se superpusieron las curvas de secado del 1er. ciclo H-S y del 2do. ciclo H-S en una misma gráfica, tal como lo muestra la **Figura 3** para algunas de las condiciones del diseño experimental (en este caso 38°C de temperatura y 0,8 m/s de velocidad de aire).

La gráfica muestra pequeñas diferencias entre los resultados de los test del 1er. ciclo H-S(líneas continuas) con respecto a las muestras rehidratadas y secadas en una segunda etapa o 2do. ciclo H-S (líneas discontinuas). No obstante, el análisis de varianza (nivel de confianza 95%) realizado demostró que estas diferencias no son significativas ($p \leq 0,688$).

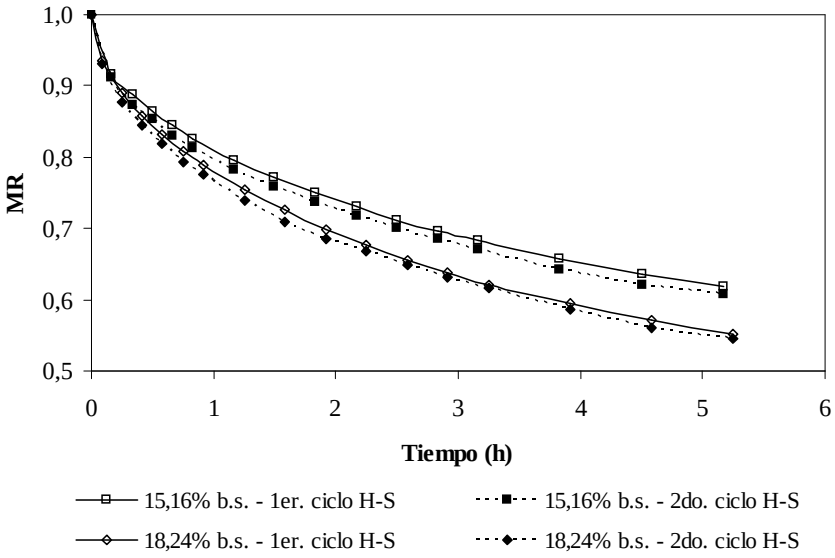


Figura 3: Curvas de secado de cebada cervecera variedad Scarlett a temperatura de 38°C y velocidad de aire de 0,8 m/s, para humedades iniciales de 15,16 y 18,24% b.s., sometidas a 1 y 2 ciclos de humidificación-secado (H-S).

Por ejemplo, ante un tiempo de secado de 4,5 h el test 15,16% b.s.- 38ºC - 0,8 m/s alcanzó una humedad adimensional MR de 0,636 y luego del segundo ciclo de rehidratación-secado (H-S) una MR de 0,620. Asimismo, para el test de igual humedad inicial y temperatura pero con una velocidad de secado de 1,5 m/s, el primer secado luego de 4,17 h logró una MR de 0,635 y su correspondiente curva de 2do. ciclo H-S, una MR de 0,631.
Los ensayos con mayor humedad inicial (18,24% b.s.) también se comportaron de forma similar, siendo luego de 4,58 h de secado la MR 0,57 para el test 18,24% b.s.- 38ºC -0,8 m/s y para su curva de 2do. ciclo H-S, una MR de 0,56; en tanto se obtuvo una MR de 0,563 y 0,549 para el test 18,24% b.s.- 38ºC - 1,5 m/s y su correspondiente rehidratado-secado (H-S), respectivamente.

CONCLUSIÓN

El estudio del efecto del secado sobre la calidad del grano de cebada cervecera variedad Scarlett demostró que el secado se debe realizar a una temperatura no mayor a los 20°C para granos con un contenido de humedad inicial entre 15% y 18% b.s. independientemente del flujo de aire que se utilice a fin de mantener el poder germinativo por encima del valor mínimo de comercialización (95%), siendo el diámetro equivalente y la densidad real afectados significativamente por la temperatura de secado, el contenido de humedad inicial y la velocidad del aire. En tanto que la repetición de un ciclo de procesos de humidificación y secado no influye sobre la cinética de secado del grano.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMBAINC. 2008. American Malting Barley Association, Inc. Institute for Barley and Malt Sciences, North Dakota State University Harvesting, Drying, and Storing Malting Barley. http://www.ambainc.org/pub/Production/Harvesting.pdf, 7 págs. Última visita: 25/02/2008.

ASAE. 1999. ASAE Standards, Standards Engineering Practices Data, ASAE. St. Joseph, MI, USA.

Akton Associates Incorporated. 1996. Akton Psychrometric Chart. Akton Associates Incorporated Engineering Software & Services, CA, USA.

CABCBAU. 2008. Norma V - Anexo C, Norma de Calidad para la Comercialización de Cebada Cervecera Seleccionada para Malteria. http://www.cabcbue.com.ar/Normas/N05C-CebadaMalteria. htm. Última visita: 25/02/08.

Gupta RK, Das SK 1997. Physical Properties of sunflower seed. Journal Agricultural Engineering, 66: 1-8.

Kachru RR, Gupta RK, Alam A. 1994. Physico – Chemical Constituents & Engineering – Properties of food crops. Editorial Scientific Publishers, Jodhpur, India.

Langrell DE, Edney MJ. 2006. Quality of western Canadian malting barley 2006. http://www.grainscanada.gc.ca/Quality/Methods/barley methods-e.pdf, pag. 25. Último acceso: 1/3/2008.

SAGPyA. 2008. Noticias de la SAGPyA 2008. http://www.sagpya.mecon.gov.ar/new/0-0/nuevositio /comunicados/leer.php?nombre = noti_archivo/2008/02/08-02-08.txt. Último acceso: 5/08/2008.

Sun DW, Woods JL. 1994. Low temperature moisture transfer characteristics of barley: thin-layer models and equilibrium isotherms. J. Agric. Engng Res., 59: 273-283.

Wilkinson L. 1990. Systat: The System for Statistics, Systat, Inc., Evanston, IL, USA.

Tolerancia a la acidez de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en jugo concentrado de manzana

Acid tolerance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in concentrated apple juice

Soto S (1), Oteiza J (1, 2)*, Blagonich M (1)

[1]Centro de Investigación y Asistencia Técnica a la Industria (CIATI). Villa Regina. Río Negro. Argentina. Tel/Fax: (54-2941) 46-2810.
[2] Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA). CONICET - Fac. Cs. Exactas. Universidad Nacional de La Plata. Argentina Tel/Fax: (54-221) 424-9287.
* email: jmoteiza@cidca.org.ar

RESUMEN

Argentina es el segundo país en el mundo exportador de jugo concentrado de manzana. Uno de los principales problemas de estos alimentos, a nivel internacional, es la presencia de microorganismos de deterioro, principalmente del género *Alicyclobacillus*, los cuales poseen esporos que pueden tolerar los procesos de pasteurización. *Alicyclobacillu. acidoterrestris* es la especie que mayor impacto presenta en la industria debido a la capacidad de producir compuestos que conllevan al deterioro del producto, modificando las propiedades de off-flavor y off-odour (como el 2-metoxifenol o guayacol). El objetivo de trabajo fue analizar la tolerancia a la acidez, de esporos de *A. acidoterrestris* inoculados en jugos concentrados de manzana. Se realizaron ensayos de inoculación sobre jugo concentrado de manzana (70º Brix, pH 3.53 y 19.64 g/kg de acidez), empleando dos cepas de *A. acidoterrestris*: una aislada de jugo de manzana, perteneciente a la colección GMCC (DMS 2498) y otra aislada y caracterizada, por el grupo de trabajo, a partir de muestras de agua de proceso industrial (SSMB 1). Se prepararon seis fracciones de jugos de manzana con valores de pH comprendidos entre 3.70 y 1.55 (obtenidos por la adición de ácido málico o NaOH), los cuales fueron inoculados individualmente con una suspensión de esporos de *A. acidoterrestris* (cepa DSM 2948 o SSMB 1) de manera de obtener recuentos iniciales de 50 esporos/10 g. Las muestras inoculadas se almacenaron a 5ºC (temperatura utilizada durante el transporte y almacenamiento de jugos) y a 45ºC (temperatura óptima de desarrollo de *Alicyclobacillus* spp.) realizando periódicamente el recuento de esporos en función del tiempo de almacenamiento (80 días) empleando agar K y agar BAT según lo descripto por la Internacional Federation of Fruit Juice Producers. El almacenamiento refrigerado conjuntamente con la acidez del jugo no afectaría la viabilidad de *A. acidoterrestris*, ya que a 5ºC, no se observó una variación en el número de esporos en función del pH y de las condiciones de almacenamiento. Asimismo, no se observaron diferencias en el empleo de agar K y agar BAT como medio de recuperación de *A. acidoterrestris.* Para el caso de las muestras almacenadas a 45ºC, en las fracciones de jugo de manzana de alta acidez, (pH <3) no se observó desarrollo microbiano a partir del día 5 en comparación con el resto de las fracciones (pH >3), lo que indicaría una acción de tipo letal o sub-letal, del pH conjuntamente con la temperatura de almacenamiento. En todos los casos, no se observó diferencia en el comportamiento frente a las condiciones de acidez de los jugos de manzana para las cepas de *A. acidoterrestris* ensayadas. De estos resultados se desprende la importancia del control de *A. acidoterrestris* en jugos concentrados de manzana almacenados a temperaturas de refrigeración.

ABSTRACT

Argentina is the second country in the world that export concentrated apple juice.
One of the principal problems of this food, worldwide, is the presence of endospore forming spoilage microorganisms, principally of the genus *Alicyclobacillus*. The spores are highly resistant to heat and can survive during the usual pasteurization regimes used in the juice industry. *Alicyclobacillus acidoterrestris* is the species with the major impact in the food industry due to the ability to produce an undesirable off-flavor and off-odour, associated with the production of 2-metoxifenol or guaiacol.
The aim of this work was to analyze the acid tolerance of *Alicyclobacillus* spores inoculated in concentrated apple juice. The tests of inoculation were realized on concentrated apple juice (70° Brix,

pH 3,53 and 19,64 g/Kg of acidity) , using two strains of *A. acidoterrestris*: DSM 2498, isolated from concentrated apple juice, and SSMB1, isolated by CIATI from water of industrial process.
Six fractions of concentrated apple juice with pH values between 3,70 and 1,55 were prepared, and then inoculated with individually suspension of *A. acidoterrestris* spores (strain DSM 2498 or SSMB1), in order to achieve a concentration of 50 spores/10g. Inoculated samples were storaged at 5°C (temperature normally used in the transport and storage of fruit juices) and 45°C (optimal growth temperature of *Alicyclobacillus* spp) realizing spores counts on function of the storage time (80 days) using both K agar and BAT agar according to International Federation of Fruit Juice Producers.
The storage al low temperature together with acidity, will not affected the *A. acidoterrestris* viability, since at 5°C, was not observed a variation in the spores concentration on pH function and the storage conditions. In the same way, were not observed differences both K and BAT agar as culture media for *A. acidoterrestris.* In the case of samples that were storaged at 45°C, in the fractions of apple juice of high acidity, (pH < 3) was not observed growth since 5 day compared with the other fractions (pH > 3), which could be indicate a letal or sub- letal effect, of pH together with the storage temperature.
In all cases, there was no difference in the acid tolerance between the two tested strains.
The results show the importance of the control of *A. acidoterrestris* in concentrated apple juice storage at refrigeration temperature.

PALABRAS CLAVE: *Alicyclobacillus acidoterrestris, jugo concentrado de manzana, acidez.*

KEYWORDS: *Alicyclobacillus acidoterrestris, concentrated apple juice, acidity.*

INTRODUCCIÓN

Argentina es el segundo país en el mundo exportador de jugo concentrado de manzana y pera. Aproximadamente exporta entre 90.000 y 100.000 toneladas/año de estos jugos. El 95% de su producción tiene como principal comprador a los EE.UU., abasteciendo algo más del 30% de dicho mercado.
Uno de los principales problemas de estos alimentos, a nivel internacional, es la presencia de microorganismos de deterioro. Es sabido que, debido al bajo pH, la microflora potencialmente presente se restringe a mohos, levaduras, bacterias ácido lácticas y bacterias acidófilas principalmente del género *Alicyclobacillus*.
El género *Alicyclobacillus* pertenece a un grupo de bacterias acidófilas, termófilas y esporoformadoras que pueden aislarse de frutas, vegetales, jugos simples y concentrados, purés, jarabes, té, bebidas isotónicas deportivas y otros alimentos de bajo pH (Murray y col., 2007) así como de muestras de suelo y agua (Parish y col., 2005). Son de morfología bacilar, Gram positivos o variable, aerobios estrictos, y requieren elevadas temperaturas (entre 40 a 70ºC) y condiciones de bajo pH (entre 2.0 a 6.0) para su desarrollo (IFU, 2004). Dichos microorganismos poseen esporos que pueden sobrevivir a los tratamientos de pasteurización utilizados en la industria (Eguchi y col., 1999), los cuales en algunos casos llegan a sobrevivir a temperaturas de 120ºC por 15 segundos.
En el año 1984, en Alemania, se produjo el primer informe relacionado con el deterioro de néctar de manzana pasteurizado relacionado con *A. acidoterrestris* (Cerny y col, 1984). Posteriormente, varios autores informaron aislamientos de *A. acidoterrestris* a partir de jugos ácidos de fruta deteriorados por guayacol en países como EE.UU., Japón, Inglaterra y Turquía entre otros (Splittstoesser y col., 1994; Yamazaki y col., 1996; Walker y col., 2008; Savas y col., 2005).
El género *Alicyclobacillus* no ha sido aún vinculado con episodios de enfermedad o riesgo para la salud, es decir que solo es considerado como un microorganismo que causa alteración en los jugos de fruta y con esto grandes pérdidas económicas. Las características del deterioro descriptas en la literatura son: presencia de off-flavor y off-odour (descrito como olor medicinal), producidas principalmente por la presencia de 2-6 dibromofenol (en ppb), 2-metoxifenol (en ppt, conocido como guayacol) (Gocmen y col., 2005). De todas las especies del género, *A. acidoterrestris* es la que mayor impacto tiene en la industria productora de jugos de distinto tipo. Trabajos realizados por Walls (1998) demostraron que la presencia de 1 a 10 esporos por ml de jugo, es suficiente para causar su deterioro.
La exigencia mundial con respecto a la presencia de *Alicyclobacillus* en los jugos concentrados es variable, sin embargo aproximadamente el 62% de los importadores exige la ausencia de dicho microorganismo en el lote de jugo adquirido. La detección de *Alicyclobacillus* en un lote de jugo de

fruta recibido en el país de origen repercute en una pérdida económica, sumado a la desconfianza que esto genera por parte de los compradores hacia los proveedores, de ahí la importancia de su control.
El objetivo del presente trabajo fue analizar la tolerancia a la acidez, de esporos de *A. acidoterrestris* inoculados en jugos concentrados de manzana, determinando, si existiese, un valor crítico de pH en el cual el crecimiento de dicho microorganismo sea inhibido.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención del jugo

Se utilizaron 2.5 kg de jugo concentrado de manzana, cedido por la empresa JUGOS S.A. (Villa Regina, Río Negro), el cual presentaba las siguientes características físico-químicas: pH 3.53 (el cual se determinó empleando un pHmetro digital con electrodo de vidrio), acidez titulable: 19.64 g de ácido málico/kg de jugo (determinada mediante el método potenciométrico) y contenido de sólidos solubles: 70ºBrix (determinado mediante el empleo de un refractómetro tipo Abbe, Bellingham).

Obtención de las fracciones de jugo

Para llevar a cabo los ensayos de inoculación y almacenamiento, se prepararon seis fracciones de 400 g jugo concentrado cada una. Los mismos fueron ajustados, mediante el agregado de ácido málico o NaOH, de manera de obtener los valores de pH final que se observan el la **Tabla 1**.

Tabla 1. Valores de pH de las 6 fracciones de jugo concentrado de manzana utilizadas en los ensayos de inoculación con esporos de *A .acidoterrestris*.

Jugo concentrado de manzana	**Fracciones**					
	1	2	3	4	5	6
pH final	3.70	3.53	3.02	2.53	2.09	1.55

Posteriormente, cada una de las fracciones preparadas, fueron inoculados individualmente con una suspensión de esporos de *A. acidoterrestris* preparada como se menciona a continuación.

Preparación de la suspensión de esporos de *A. acidoterrestris*

Se emplearon 2 cepas de *A. acidoterrestris* de diferente origen: una de ellas, la DMS 2498, perteneciente a la German Collection of Microorganisms and cell (origen jugo de fruta) y la otra, SSMB1, perteneciente a la colección CIATI (origen: agua de proceso industrial).
Los cultivos fueron mantenidos en agar *Bacillus acidoterrestris thermophilic* (BAT, Merck KGaA) a 4ºC hasta el momento de su uso. Cada inóculo inicial (N_0) se preparó transfiriendo una ansada del cultivo a un tubo conteniendo 10 ml de buffer fosfato de manera de obtener un inóculo denso. El mismo fue homogeneizado en vortex para lograr una correcta distribución. Posteriormente, se realizó un choque térmico a 80 ºC durante 10 minutos, enfriando en baño de hielo, con el objetivo de eliminar las células en fase vegetativa procediendo a la activación de los esporos. Asimismo, se realizó una dilución 1:1000 empleando agua destilada estéril como diluyente, colocando, en condiciones de esterilidad, una alícuota de la misma en una bolsa de stomacher estéril, conteniendo 400g de jugo concentrado de manzana de diferente pH (Fracciones 1 a 6) de manera de alcanzar valores de N_0 de entre 40-50 esporos/10 g de jugo concentrado. La mezcla fue homogeneizada por 3 min. en stomacher (Model 400, Seward Medical, London, UK) logrando así una correcta distribución del inóculo en la matriz densa. En cada una de las fracciones de jugo inoculadas (Fracciones 1 a 6), se procedió al recuento inicial (N_0) de esporos, empleando: agar K (Biotrace) y agar BAT como medios de cultivo de manera de corroborar los valores reales de N_0, así como determinar la eficiencia de recuperación de ambos medios de cultivo.

Almacenamiento de los jugos inoculados

Las diferentes fracciones de jugo concentrado de manzana, previamente inoculadas, se almacenaron durante 80 días a dos temperaturas: 5ºC (de refrigeración, simulando las condiciones utilizadas durante el transporte y almacenamiento de los jugos de fruta) y 45ºC (de abuso térmico, la cual coincide con la TºC óptima de desarrollo de *Alicyclobacillus*). Periódicamente, se realizaron recuentos de esporos (por el método de filtración por membrana, analizando 10 g de muestra en cada caso) en función del tiempo de almacenamiento, empleando dos medios de cultivo: agar K y agar BAT (45ºC, 5 días); siguiendo el

protocolo descrito por la Internacional Federation of Fruit Juice Producers (IFU, 2004). Los ensayos se realizaron por duplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las diferentes fracciones de jugo de manzana inoculadas, los recuentos iniciales (N_0) de *A. acidoterrestris*, variaron entre 47 y 52 esporos/10 g de jugo. No se observaron diferencias entre dichos valores para los 2 medios de cultivo utilizados (agar BAT y agar K), así como para las 2 cepas analizadas (DMS 2498 y SSMB1).

Supervivencia de esporos de *A. acidoterrestris* en jugo concentrado de manzana almacenado a 5ºC

La **Figura 1** muestra el recuento de esporos (Log N/N_0) de *A. acidoterrestris*, DMS 2498, inoculado en cada una de las 6 fracciones de jugo de manzana conteniendo valores de pH comprendidos entre 3.70 y 1.55 y almacenadas a 5ºC durante 80 días.

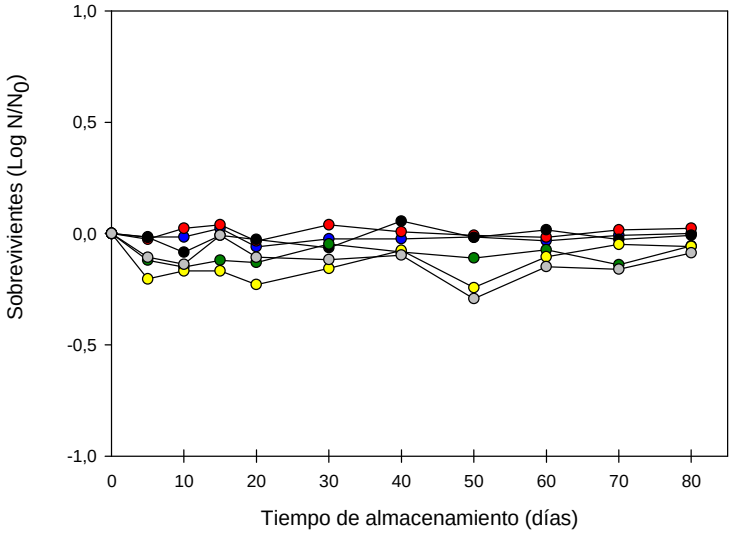


Figura 1. Recuento de esporos de *A. acidoterrestris* (DMS 2498) inoculado en diferentes fracciones de jugo concentrado de manzana (1 a 6), almacenadas a 5ºC durante 80 días. Medio de cultivo empleado para el recuento de sobrevivientes: agar *Bacillus acidoterrestris thermophilic* (BAT, 45ºC durante 5 días). Se informan los valores medios de los recuentos. Símbolos: • Fracción 1 (pH= 3.70); • Fracción 2 (pH= 3.53); • Fracción 3 (pH= 3.02); • Fracción 4 (pH= 2.53); • Fracción 5 (pH= 2.09); • Fracción 6 (pH= 1.55).

En todas las condiciones experimentales analizadas, no se observaron variaciones en el número de esporos inoculados en jugo de manzana en función del tiempo de almacenamiento, manteniéndose los valores similares al N_0. Asimismo, no se observaron diferencias en los recuentos de sobrevivientes mediante el empleo ya sea de agar K como de agar BAT como medios de recuperación de *A. acidoterrestris.*

Resultados similares fueron obtenidos para el caso de la cepa SSMB1 (datos no mostrados).

De ello se desprende, que el almacenamiento refrigerado conjuntamente con la acidez del jugo no afectarían la viabilidad de *A. acidoterrestris*.

Supervivencia de esporos de *A. acidoterrestris* en jugo concentrado de manzana almacenado a 45ºC

La **Figura 2** muestra el recuento de esporos (Log N/N_0) de *A. acidoterrestris*, SSMB1, inoculados en cada una de las 6 fracciones de jugo de manzana conteniendo valores de pH comprendidos entre 3.70 y 1.55 y almacenadas a 45ºC (considerada de abuso térmico, la cual coincide con la TºC óptima de desarrollo de *Alicyclobacillus*).

En este caso, los resultados obtenidos mostraron que en las fracciones de mayor acidez, 4, 5 y 6 (pH 2.53, 2.09 y 1.55 respectivamente) no se observó desarrollo microbiano (valores de recuento iguales a <1 esporos/10g) a partir del quinto día de almacenamiento a 45ºC. Este efecto observado del pH conjuntamente con la temperatura, podría ser tanto de tipo letal como subletal (injuria).

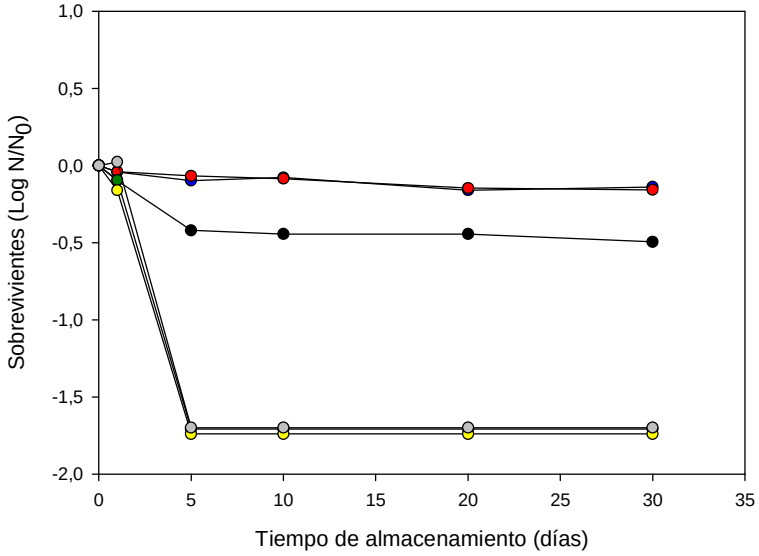


Figura 2. Recuento de esporos de *A. acidoterrestris* (SSMB1) inoculado en diferentes fracciones de jugo concentrado de manzana (1 a 6), almacenadas a 45ºC. Medio de cultivo empleado para el recuento de sobrevivientes: agar *Bacillus acidoterrestris thermophilic* (BAT, 45ºC durante 5 días). Se informan los valores medios de los recuentos. Símbolos: • Fracción 1 (pH= 3.70); • Fracción 2 (pH= 3.53); • Fracción 3 (pH= 3.02); • Fracción 4 (pH= 2.53); • Fracción 5 (pH= 2.09); • Fracción 6 (pH= 1.55).

Asimismo, en la fracción 3 (pH 3.02) se observó una disminución en el recuento de esporos a medida que aumentó el tiempo de almacenamiento, en comparación con las Fracciones 1 y 2 (pH 3.70 y 3.53 respectivamente) en las cuales la viabilidad de los esporos no se vio drásticamente afectada.
Comparando los resultados con los obtenidos en el almacenamiento refrigerado (**Figura 1**), se observó que a bajas temperaturas el efecto del pH sobre la viabilidad de los esporos de *Alicyclobacillus* es menor, comparado con los jugos que fueron almacenados a 45ºC, en el cual dicho efecto se manifiesta a partir de jugos de manzana con valores de pH <3.02.
Por otra parte, resultados similares fueron obtenidos para el caso de la cepa DMS 2498 (datos no mostrados).
Actualmente, no existen datos bibliográficos acerca de la supervivencia de esporos de *Alicyclobacillus* en jugo concentrado de manzana. Por otra parte, son pocos los datos que existen relacionados con el efecto del pH sobre los esporos de *Alicyclobacillus* en jugos de fruta.
En Argentina, Maldonado y col (2006), analizaron el efecto del pH sobre los parámetros de resistencia térmica de esporos de *Alicyclobacillus* inoculados en jugo concentrado de limón. Dichos autores observaron que a medida que aumentaba el pH en los jugos, la resistencia térmica se veía disminuida.
Con el objetivo de profundizar acerca de si la acción observada del pH de los jugos concentrados de manzana, almacenados a 45ºC, es de tipo letal o subletal, se realizaron ensayos de detección de esporos de *Alicyclobacillus* por el método de enriquecimiento (según lo descrito por la IFU), en las fracciones en las que no se observó desarrollo microbiano (Fracciones 4, 5 y 6) en función del tiempo de almacenamiento.
Para ello, se tomaron en cada caso 10 g de muestra pertenecientes a las diferentes fracciones de jugo, y se colocaron en frascos de vidrio conteniendo 90 ml de caldo BAT. Se incubó la muestra durante 5 días a 45ºC permitiendo de este modo la recuperación de las posibles células dañadas por el efecto conjunto del ácido y la TºC de almacenamiento (45ºC). Posteriormente se sembró una anzada del caldo enriquecido en placas conteniendo agar BAT. Las mismas fueron incubadas durante 3 días a 45ºC procediendo a la lectura e interpretación de los resultados.
En todos los casos analizados, para ambas cepas, se observó la ausencia de desarrollo bacteriano en las fracciones analizadas. Dichos resultados demostrarían que el efecto observado anteriormente por parte del pH ácido, resultaría ser de tipo letal, con lo cual la exposición a la acidez conjuntamente con el calor, provocarían la muerte celular.
Es sabido que diversos microorganismos tales como *Salmonella* y *E. coli* O157:H7 pre-adaptadas a condiciones ácidas (cepas que tuvieron un contacto previo con un medio ácido), inoculadas en

diferentes matrices (medios de cultivo, sidra de manzana y jugos de fruta entre otros) presentan una mayor resistencia a otros factores de estrés (como el calor o el estrés osmótico), así como una mayor supervivencia en medios ácidos (jugos de fruta por ejemplo). Por otra parte, no existe bibliografía acerca de la adaptación a dicho estrés en *Alicyclobacillus*.
En el presente trabajo no se observaron diferencias en el comportamiento frente a la acidez (supervivencia) de ambas cepas empleadas, una aislada de jugo de fruta (ácido-adaptada) y otra aislada de agua de proceso industrial (no ácido-adaptada). Esto podría indicar que la tolerancia a las condiciones ácidas podría ser una característica propia del género *Alicyclobacillus* (o al menos de la especie *acidoterrestris*).
De estos resultados se desprende la importancia del control de *A. acidoterrestris* en jugos concentrados de manzana almacenados a temperaturas de refrigeración.

CONCLUSIONES

1) Se determinó que tanto el agar BAT como el agar K, serían medios de cultivo apropiados para la recuperación de esporos de *A. acidoterrestris* a partir de jugos concentrados de manzana.
2) Se comprobó la tolerancia de *A. acidoterrestris* frente a la acidez de jugos concentrados de manzana. Asimismo, la acidez de los jugos de manzana, conjuntamente con el almacenamiento refrigerado (5°C) no afectaría la viabilidad de los esporos, ya que los mismos se mantuvieron sin cambios en el número por un período de al menos 80 días. Sin embargo, en jugos de manzana con valores de pH <3 almacenados a 45ºC, los esporos de *A. acidoterrestris* poseen una viabilidad menor a los 5 días.
3) No se observaron diferencias en el comportamiento frente a las condiciones de acidez de los jugos de manzana de las cepas de *A. acidoterrestris* ensayadas, provenientes de diferente origen. Esto indicaría que la tolerancia a las condiciones ácidas podría sería una característica propia de la especie *acidoterrestris*.
4) Se determinó la importancia del control de *A. acidoterrestris* en jugos concentrados de manzana almacenados a temperaturas de refrigeración.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la contribución a este trabajo brindada por El Centro de Investigación y asistencia Técnica a la Industria (CIATI), así como al Concejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Cerny G, Hennlich W, Poralla K. 1984. Spoilage of fruit juice by bacilli: isolation and characterization of the spoiling microorganisms. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und –Forschung, 179, 224–227.

Eguchi SY, Manfio GP, Pinhatti ME, Azuma E, Variane SF. 1999. Acidothermophilic sporeforming bacteria (ATSB) in orange juices: detection methods, ecology, and involvement in the deterioration of fruit juices. Associacao Brasileira dos exportadores de cítricos. ABECITRUS. Campinas. Brasil. Repor of the research project, Vol 3, 1-52.

Gocmen D, Elston A, Williams T, Parish M, Rouseff RL. 2005. Identification of medicinal off-flavours generated by *Alicyclobacillus* species in orange juice using GC-olfact-ometry and GC-MS. Letters in Applied Microbiology, 40, 173–177.

International Federation of Fruit Juice Producers (IFU), 2004. First standard IFU method on the detection of *Alicyclobacillus* in fruit juices. IFU Method, No. 12. Revised march 2007.

Maldonado M, Belfiore C, Navarro A. 2008. Temperature, soluble solids and pH effect on *Alicyclobacillus acidoterrestris* viability in lemon juice concentrate. Journal of Industry Microbiology and Biotechnology, 35, 141-144.

Murray MB, Gurtler JB, Ryu JH, Harrison MA, Beuchat LR. 2007. Evaluation of direct plating methods to enumerate *Alicyclobacillus* in beverages. International Journal of Food Microbiology, 115, 59-69.

Parish ME, Goodrich RM. 2005. Recovery of presumptive *Alicyclobacillus* strains from orange fruit surfaces. Journal of Food Protection, 68, 2196–2200.

Savas B, Gokmen K, Acar J. 2005. Occurrence of *Alicyclobacillus acidoterrestris* on apples and in apple juice concentrates and effects of process technology on *A. acidoterrestris* spores in apple juice. Fruit Processing, 15, 328-331.

Splittstoesser D, Charley J, Lee C. 1994. Some factors affecting growth of aciduric sporeforming bacilli in fruit juices. Journal of Food Protection, 57, 1080–1083.

Walker ME, Phillips CA. 2008. *Alicyclobacillus acidoterrestris:* a threat to the fruit juice industry? International Journal of Food Science and Technology, 43, 250-260.

Walls I, Cheater R. 1998. *Alicyclobacillus* — historical perspective and preliminary characterizations study. Dairy Food and Environmental Sanitation, 18, 499–503.

Yamazaki K, Teduka H, Shinano, H. 1996. Isolation and identification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from acidic beverages. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 60, 543–545.

Estudio de operaciones combinadas de poscosecha de cebada cervecera

Study of combined post-harvest operations for malted barley

Ordóñez MR (2), Gely MC (2), Pagano AM (1,2)

(1) Programa Institucional Alimentos UNICEN
(2) UNCPBA Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química, TECSE Avenida del Valle 5737, B7400JWI. Olavarría, Provincia de Buenos Aires, Argentina @mail: cgely@fio.unicen.edu.ar.

RESUMEN

La producción Argentina de cebada se concentra en la cebada cervecera apta para malterías debiendo en consecuencia cumplir estrictos requerimientos de calidad. En función de la importancia de adecuadas condiciones de secado y almacenamiento para asegurar la calidad del grano, en este trabajo se evaluó la influencia de operaciones combinadas de poscosecha: secado/almacenamiento sobre características de calidad del grano de cebada cervecera variedad Scarlett, relacionadas con el proceso de obtención de malta. El ensayo experimental granos con un contenido de humedad inicial (M0) de 15.5 y 18% en base seca (bs) se secaron en estufa de convección forzada a temperaturas (T) de 28°C, 38°C y 54°C, hasta alcanzar el contenido de humedad de seguridad del 12% b.s. Posteriormente se ensilaron evaluándose el efecto de los procesos sobre el contenido de humedad (M), el poder germinativo del grano (PG) y la capacidad de remojado correspondiente al proceso de obtención de la malta. En cuanto al efecto del secado sobre PG, si bien los resultados estadísticos indican no significancia de T ni de M0, se pudo observar que las muestras secadas a 54°C estarían fuera del estándar de aceptabilidad del grano (PG inferior al 98%). El remojado de los granos se realizó utilizando la técnica estándar en dos etapas realizando pesadas periódicas a fin de analizar la evolución de la humedad del grano. En este aspecto es importante destacar que no se observó efecto de T ni de M0 sobre el porcentaje de ganancia de agua en el proceso de remojado, estando este valor entre 228 y 179%. A posteriori del proceso de secado, los granos fueron almacenados durante 90 días, período durante el cual se realizó un seguimiento de las variables contenido de humedad, PG y capacidad de absorción de agua en el remojado. Se observó una disminución no significativa de PG por efecto del almacenamiento, pero esta tendencia permitiría estimar tiempos máximos de almacenamiento para las condiciones de estudio. El grano que mantiene el PG por encima del estándar (98% mínimo) durante más tiempo (80 días de almacenamiento) es el de menor M0 (15.5% b.s.) secado a la menor T (28°C). En cuanto al incremento en M por efecto del almacenamiento, este resultó no significativo ($F_{(4;1;0.95)}$=1.9375). Se estudió la cinética del proceso de remojado de los granos durante el almacenamiento por diferentes modelos matemáticos; entre ellos, el modelo de Peleg (M=(M0+t)/(K1+K2 t)) donde t: tiempo de almacenamiento, K1 y K2: constantes) fue el más preciso para representar los datos experimentales con R^2 superior a 0.88 para todos los casos analizados, pudiéndose adicionalmente detectar un sensible efecto de T sobre K2.

ABSTRACT

In Argentina, the barley production is principally concentrated in beer barley to malting plants; then, quality requirements must been unquestionably observed. Because the importance of adequate drying and storing conditions to maintain the grain quality, in this work the influence of the combined drying/storage post harvest operations on the quality of barley grains Scarlett variety, related to the malting process, was evaluated. In the experimental assay, grains with 15.5 and 18% dry basis (d.b.) initial moisture content were dried in a forced convective oven at temperatures (T) of 28°C, 38°C and 54°C until the moisture content for safe storage was reached (12% d.b.). Then the grains were stored in silos and the effect of the processes on the moisture content (M), power germination (PG) and capability of water absorption during the soaking in the malting process were evaluated. Statistical results indicated no significant effect of T either M0 on the PG; however, it was observed that samples dried at 54°C were outside the grain suitability standard (PG lower than 98%). Grain soaking was carried out by the two-steps standard method, and the grain mass was periodically weighted in order to analyze their moisture content evolution. Related this aspect, was not observed effect of T each M0 on

the percent water gain, resulting values between 228 and 179%. After drying process, grains were stored during 90 days, time in which the variables M, PG and capability of water absorption in the soaking process were screened. No significant decreasing on PG along the storage time was observed; however, this tend could be useful to estimate the maximum time for safe storage at the conditions of this study. The sample which preserved their PG upper the standard level (98% minimum) during more time (80 days of storage) was grain with the lower M0 (15.5% d.b.) dried at the lower T (28°C). Related to the influence of storage on M, no significant effect was observed. Kinetics of grains soaking at predefined storage intervals was studied and modeled by different mathematical equations; between them, the Peleg model (M=(M0+t)/(K1+K2*t) where t: storage time, K1 and K2: constants) was the most accurate for experimental data description, presenting values of R^2 greater than 0.88 for all the test. Additionally, sensible effect of T on K2 was detected.

PALABRAS CLAVE: *cebada, poscosecha, calidad, germinación, remojado.*

KEYWORDS: *barley, post harvest, quality, germination, soaking.*

INTRODUCCIÓN

La cebada es un cultivo que se encuentra ampliamente difundido en todo el mundo, ocupando el cuarto lugar en superficie sembrada, después del trigo, el maíz y el arroz. (Yalungo 2006, Aacrea 2007). Mundialmente la cebada se cultiva para destino forrajero y una pequeña proporción de la misma, que reúne las condiciones de alta calidad requeridas por la industria maltera, recibe como premio un precio superior. La producción argentina de cebada se concentra en la producción de cebada cervecera apta para malterías, siendo insignificante la superficie destinada originalmente a forraje (Yalungo 2006, Infoagro 2007).

La industria maltera requiere ser abastecida con tonelajes suficientes en forma continua, debiendo cumplir la materia prima entregada por los productores, con estrictos requerimientos de calidad exigidos por este sector industrial. Uno de los parámetros de relevancia para la industria maltera es la capacidad germinativa cuyo valor no debe ser inferior al 98% (Wehehahne 2007, BCR 2007(a), Senasa 2008). La cebada no se puede utilizar directamente para la producción de cerveza, ya que no tiene desarrollado el sistema enzimático encargado de transformar el almidón en azúcares, transformación vital, ya que las levaduras encargadas de la fermentación la necesitan para su crecimiento y multiplicación. Las levaduras no son capaces de atacar directamente al almidón (Hough 1982). Durante la germinación, las proteínas, el almidón y otras sustancias se liberan facilitando el trabajo posterior de las levaduras. Asimismo, se desarrolla el complejo enzimático encargado de atacar al almidón (Mendoza 2006, Rossi 2008). Otro aspecto de calidad relevante para la elaboración de la malta es la capacidad de rehumectación del grano, dado que, durante el proceso de malteado, la cebada almacenada con contenidos de humedad no superiores al 13.5% b.s. debe rehumectarse previamente a la germinación en depósitos aireados durante 40-60 horas.

La máxima calidad del grano se logra mediante un proceso integral de manejo de la producción agropecuaria. Este enfoque integral del proceso productivo de un cultivo involucra necesariamente analizar el sistema de producción desde la siembra hasta la utilización de los productos, pasando por todas las etapas agronómicas (crecimiento, reproducción y maduración), y por las etapas de cosecha y poscosecha, hasta que el producto llegue al consumidor (Yanucci 1986).

La cebada cervecera es cosechada habitualmente con niveles de humedad por encima del 13.5% b.s. Por ende, es imprescindible el secado artificial para su adecuada conservación y posterior comercialización previniendo de esta manera el riesgo de contaminación con hongos, ácaros e insectos (Bakker-Arkema *et al.* 1987, Llorca 1999, Ryniecki *et al*. 2007, SGRL 2007) siendo el contenido de humedad de seguridad de aproximadamente 12% b.s. a 21ºC y 60% de humedad relativa (HR) (Langrell y Edney 2006, Agrip 2008).

El secado debe ser realizado con precaución para mantener la calidad durante el almacenamiento; las altas temperaturas en el secado, si no son correctamente supervisadas, pueden reducir el peso del grano y la germinación, y además causar grietas en los granos propensos a fracturas (Far 1999, Jayas *et al.* 2003). La cebada cervecera es secada a temperaturas óptimas de 40ºC y la máxima temperatura de secado empleada en las plantas de acopio es de 54°C (Praire Grains 2003).

El tiempo de almacenaje seguro es aproximadamente duplicado por cada 2 puntos de reducción del porcentaje de humedad y por cada 10ºC de la reducción de temperatura (Agrip 2008).
Dado que se considera que los procesos de secado y almacenamiento revisten la mayor importancia desde el punto de vista de la calidad de los granos de cebada, es en estos procesos en los que se hace hincapié en el presente estudio. El objetivo principal es evaluar la influencia de operaciones combinadas de poscosecha secado/almacenamiento sobre características de calidad del grano de cebada cervecera relacionadas con el proceso de obtención de malta.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Se trabajó con granos de cebada cervecera variedad Scarlett con un contenido de humedad inicial de 9.7% b.s. (AOCS 1998).
Para la realización de los ensayos de secado a fin de estudiar los procesos de secado y almacenamiento se humidificó la muestra original a niveles de 15.5% b.s. y 18% b.s. mediante rociado con agua destilada. Luego de agregar la cantidad necesaria de agua se dejó la muestra en reposo durante 48 h durante las cuales se permitió la homogeneización de la humedad en el interior del grano.

Poder Germinativo (PG)

Las determinaciones del PG se realizaron por duplicado colocando 100 granos de cebada entre dos capas de papel de filtro Whatman Nº1 y sobre una placa de Petri de 9 cm de diámetro, y a continuación se rociaron con 4 mL de agua destilada. Las muestras se mantuvieron a 20ºC y 90% de humedad relativa en una cámara de germinación. Se logró mantener una humedad del 90% mediante el empleo de una solución saturada de ClK en el interior de los germinadores. Se realizó un recuento a las 24 h separándose los granos germinados; luego se repitió el procedimiento a las 48 h, haciéndose un recuento final a las 72 h (ASBC Barley 3C 2007).

Remojado de los granos

Se utilizó el método estándar de remojado consistente en dos etapas. En la primera de ellas se colocó la masa de granos en un recipiente agregándose el doble en volumen de agua y llevando a reposo durante 10 h. Luego, se retiró el agua del recipiente y se dejaron los granos expuestos al aire ambiente por 18 h. Posteriormente, en segunda etapa se incorporó el mismo volumen de agua que en la primera y se dejó en reposo durante 8 h. Finalmente se extrajo el agua y se dejó en exposición al aire durante 12 h (Langrell y Ednell 2006). Se estudió la evolución en el contenido de humedad de los granos durante el proceso de remojado realizando las prácticas por duplicado.

Secado de las muestras de granos de cebada cervecera

Se realizó el proceso de secado en estufa a temperaturas de 28°C, 34°C y 54°C. Se eligieron estos niveles debido a que están comprendidos entre un rango bajo (definido como la temperatura máxima recomendada para secar cebada para maltería que es 28°C) hasta un rango medio-alto (determinado por la temperatura máxima de secado típicamente empleada en las plantas de acopio, 54°C) (Praire Grains 2003). El proceso de secado se realizó para cada una de las condiciones de temperatura y humedad inicial enunciadas previamente siguiendo el esquema que se muestra en la **Tabla 1**, a velocidad de aire constante (0.045 m/s) hasta alcanzar el contenido de humedad de seguridad de 12% b.s. (Agrip 2008). Se empleó una estufa de tiro forzado secándose simultáneamente 3 bandejas de 60 cm $\times$ 20 cm por corrida de secado entre las que se distribuyeron en forma uniforme 7 kg de granos que posteriormente se destinaron a los silos de almacenamiento.
Durante el procedimiento de secado, se hizo un seguimiento del peso en una de las bandejas para determinar el punto final de secado realizándose pesadas periódicas para analizar la pérdida de peso (y en consecuencia la evolución en el contenido de humedad) a fin de determinar el tiempo de secado, es decir el momento en que la masa de granos alcanza un contenido de humedad de un 12% b.s.
Se utilizó un psicrómetro aspirado (Papst modelo ZP 611) para determinar las propiedades (temperatura de bulbo seco y húmedo) del aire circundante al equipo con el fin de calcular la humedad relativa del ambiente y del aire de secado.

Cálculo de la humedad adimensional (MR) y de la humedad de equilibrio (Me)

El cálculo de la humedad de equilibrio se realizó mediante la ecuación de Chung-Pfost (ASAE 1999):

$$Me = -\frac{1}{C_2}\ln\left[-\frac{(T+C_3)\ln(RH)}{C_1}\right] \quad (1)$$

donde T: temperatura de secado de bulbo seco (°C), RH: humedad relativa decimal, C_1, C_2 y C_3: constantes para cada material.

Los valores de las constantes C_1, C_2 y C_3 de la ecuación utilizados fueron 475.12, 0.148 y 71.996, respectivamente (ASAE 1999). Este procedimiento permitió obtener la humedad de equilibrio (Me) para cada una de las condiciones experimentales del trabajo. Los datos experimentales fueron expresados como humedad adimensional (MR) en función del tiempo y se calcularon como:

$$MR = \frac{(M - M_e)}{(M0 - M_e)} \quad (2)$$

Almacenamiento del grano en silos sin aireación

Para el almacenamiento se utilizaron 6 silos cilíndricos a escala piloto de 20 cm de radio y 60 cm de altura, uno por cada corrida de secado, los cuales se cargaron con grano seco y se colocaron a la intemperie durante 90 días. Se realizó un muestreo periódico (cada 15 días) de los granos extrayendo muestras de 150 g que se almacenaron en recipientes herméticos hasta su análisis. Se estudió la evolución en el tiempo del contenido de humedad, del PG y de la capacidad de remojado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la **Tabla 1** se encuentran las condiciones experimentales para las 6 corridas de secado.

Tabla 1. Condiciones de secado.

Corrida	M0 (% b.s.)	HR ambiente (%)	HR aire de secado (%)	Temperatura de secado (ºC)
1	15.5	48.9	30.2	28
2	15.5	66.6	23.7	38
3	15.5	59.2	9.3	54
4	18	48.6	32.9	28
5	18	54.0	19.7	38
6	18	61.4	10.1	54

En la **Figura 1** se puede observar la evolución del contenido de humedad con el tiempo para cada una de las corridas experimentales realizadas, correspondiendo las mayores pérdidas de humedad (mayores velocidades de secado) a las máximas temperaturas utilizadas.

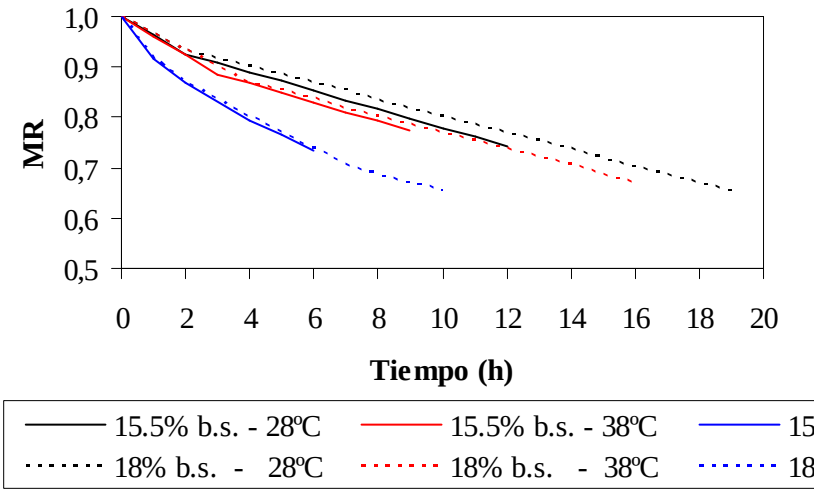


Figura 1. Evolución del contenido de humedad con el tiempo para las diferentes corridas experimentales.

Los análisis del PG previos al proceso de secado indicaron que las muestras de cebada humectadas a 15.5% b.s. y 18% b.s. presentaron valores de PG del 100%. En la **Tabla 2** se presenta el valor correspondiente al PG para las muestras secadas en cada una de las condiciones de trabajo.

Tabla 2. Análisis del efecto del proceso de secado sobre el poder germinativo**.**

M0 (% b.s.)	Contenido de humedad final (% b.s.)	Temperatura de secado (°C)	PG (%)
15.5	12	28	100 ± 0
15.5	12	38	100 ± 0
15.5	12	54	90 ± 0
18	12	24	100 ± 0
18	12	38	98 ± 1.414
18	12	54	90 ± 2.828

Los resultados obtenidos indican ausencia de efecto de la humedad inicial sobre PG para la menor temperatura de secado utilizada. Sin embargo se observa una disminución de un 10% en el PG al incrementar la temperatura hasta 54°C para ambas humedades iniciales. No obstante, los resultados estadísticos indican que este efecto es no significativo dado que F(1;2;0.95)= 4.265 < Ftabla= 19.246 para el contenido de humedad del 15.5% b.s. y F(4;2;0.95)= 5.071 < Ftabla=19.246 para el contenido de humedad del 18%.

La Norma de calidad para cebada cervecera presenta un nivel de tolerancia para el poder germinativo, siendo el valor del mismo del 98%. A valores de PG inferiores al 98%, la muestra es rechazada por las plantas elaboradoras de malta (Izydorczyk 2004, BCR 2007(b), Senasa 2008). Según este criterio, si bien no se observó efecto significativo de T sobre PG, la muestra con 15.5% b.s secada a 54°C y las muestras con humedad del 18% b.s. secadas a 38 y 54°C estuvieron fuera de estándar por presentar un valor de germinación inferior al 98%.

En cuanto a la ganancia de humedad, previo al secado las muestras con humedad inicial de 15.5% b.s. presentaron valores de ganancia de humedad de 225%, mientras que las de 18% b.s. alcanzaron un 193%. En la **Figura 2** se observa la ganancia de humedad en función de la temperatura de secado para cada contenido de humedad inicial M0. Los valores oscilaron entre un 215% (M0=15.5% b.s., T=54°C) y 179% (M0=18% b.s., T=28°C). En la **Figura 2** se observa que a temperatura constante al incrementar la humedad inicial del grano (de 15.5. a 18% b.s.) hay un decrecimiento en la ganancia de humedad, es decir, que las muestras con menor humedad inicial presentan la mayor capacidad de absorción de agua luego del proceso de secado. No obstante, los resultados de un análisis estadístico ANOVA indicaron diferencias no significativas entre las muestras con un contenido de humedad inicial del 15.5% b.s y 18% b.s. dado que F(2;1;0.95)= 4.5 < Ftabla=19 para el contenido de humedad del 15.5 % b.s. y F(2;1;0.95)= 4.5 < Ftabla=19 para el contenido de humedad del 18% b.s.

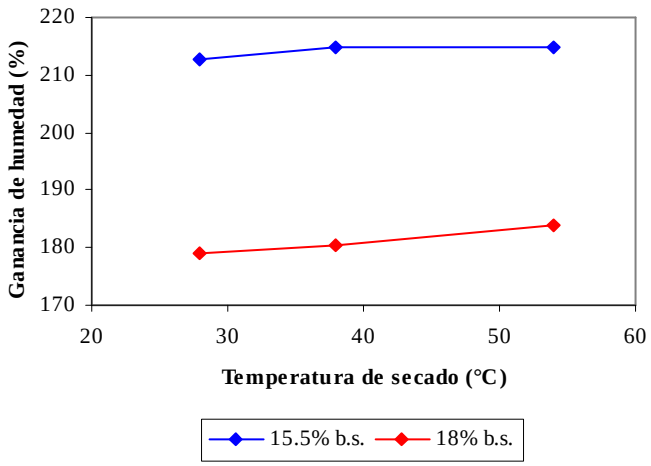


Figura 2. Ganancia de humedad (%) en función de la temperatura de secado.

Posteriormente al secado de los granos, éstos se almacenaron realizándose un seguimiento de las diferentes propiedades. En la **Figura 3** se observa la evolución del poder germinativo en el transcurso del almacenamiento para cada uno de los silos. El cambio del poder germinativo a través del tiempo de almacenamiento no fue estadísticamente significativo (F(5;1;0.95)= 0.048 < Ftabla=230.16).

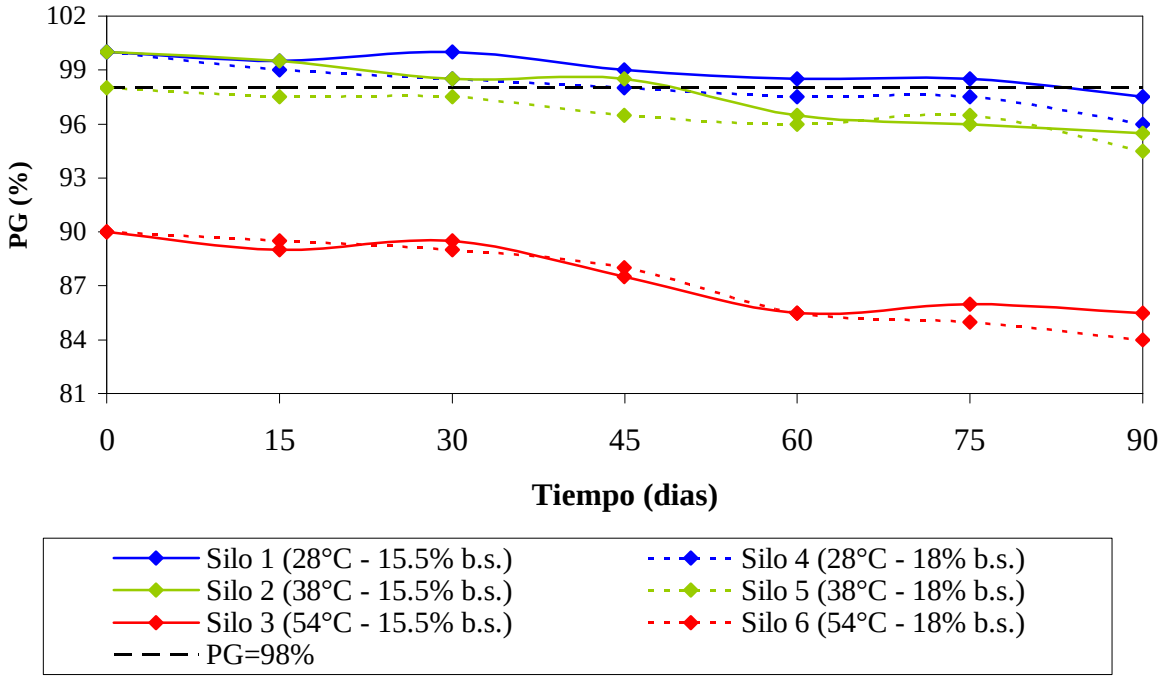


Figura 3. Datos experimentales del poder germinativo analizado a través del tiempo de almacenamiento para cada uno de los seis silos.

Si bien el análisis estadístico ANOVA realizado indica que no fue significativo el efecto del tiempo de almacenamiento sobre PG (F(5;1;0.95)= 0,048<Ftabla=230.16), los resultados podrían ser indicativos del máximo tiempo posible de almacenamiento de los granos según las condiciones de secado realizadas. El análisis de la **Figura 3** indica que el Silo 2 (38°C-15.5% b.s.) presenta valores de PG dentro del estándar, en los primeros 45 días de almacenamiento descendiendo luego a valores fuera de estándar. Sin embargo, el Silo 5 (38°C-18% b.s.) en los primeros 4 días de almacenamiento presenta un PG del 98% para posteriormente descender. El Silo 1 (28°C-15.5% b.s.) presentó valores superiores al 98% de germinación durante 80 días de almacenamiento, luego el mismo descendió por debajo del 98%. El Silo 4 (28°C-18% b.s.) presentó una reducción de un 50% en el tiempo de almacenamiento seguro dentro del cual el poder germinativo está dentro del estándar con respecto al Silo 1, siendo el mismo de 40 días.

El contenido de humedad de los granos durante el almacenamiento tiende a valores constantes comprendidos entre 11.91% b.s. (Silo 1, 28°C-M0=15.5% b.s.) y 11.79% b.s. (Silo 3, 54°C-M0=15.5% b.s.) no observándose efecto significativo del tiempo de almacenamiento sobre esta variable (F(4;1;0.95)=1.9375 < Ftabla=224.5833).

Evaluando la cinética de la rehumectación durante el almacenamiento de los granos se encontró que el modelo de Peleg (Ec. 3) ajusta adecuadamente los resultados experimentales con coeficientes de determinación superiores a 0.98.

$$M = \frac{M0 + t}{(K1 + K2\ t)} \tag{3}$$

donde t: tiempo de almacenamiento en horas, K1 y K2: constantes para cada material.

En la **Figura 4** se observa la relación entre la temperatura de secado y el tiempo de almacenamiento con los parámetros de Peleg durante las dos etapas de la rehumectación. Se evaluó mediante ANOVA

el efecto de las variables del proceso (contenido de humedad inicial, temperatura de secado, tiempo de almacenamiento) sobre los parámetros del modelo resultando que la temperatura de secado es una variable significativa sobre los parámetros de Peleg ($F_{(2;2;0.95)}$=276.152 > Ftabla=19 (K1 – Etapa 1); $F_{(2;2;0.95)}$=137.056 > Ftabla=19 (K2 – Etapa 1); $F_{(2;2;0.95)}$= 42.262 > Ftabla=19 (K1 – Etapa 2); $F_{(2;2;0.95)}$=35.560 > Ftabla=19 (K2 – Etapa 2).

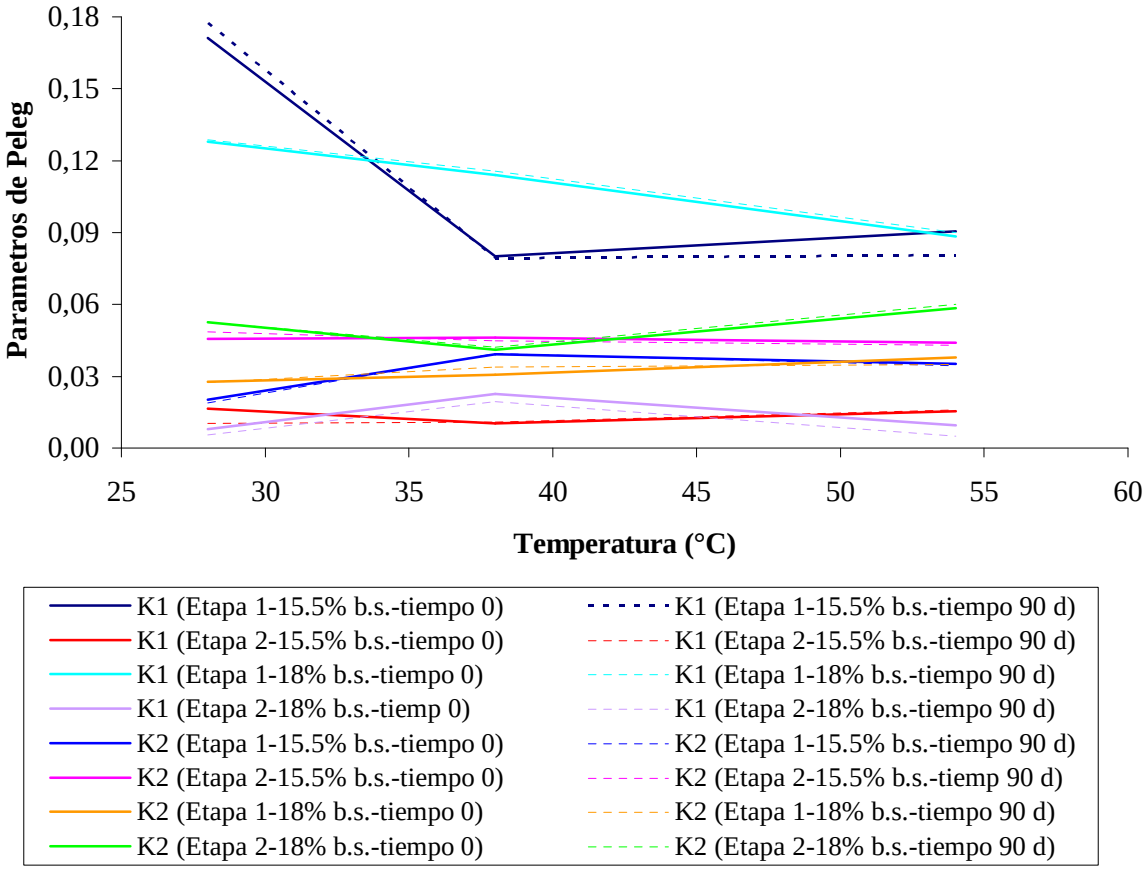


Figura 4. Comportamiento de los parámetros de Peleg (K1 y K2) en función de la temperatura (°C) para diferentes contenidos de humedad inicial de los granos de cebada en cada una de las etapas del proceso de remojado, evaluados al inicio (tiempo 0) y al fin del almacenamiento (tiempo 90 d).

El contenido de humedad inicial es una variable no significativa sobre los parámetros del modelo de Peleg dado que los resultados del ANOVA indican que $F_{(1;2;0.95)}$= 1.027 < Ftabla=18.5127 (K1 – Etapa 1); $F_{(1;2;0.95)}$= 1.64< Ftabla=18.5127 (K2 – Etapa 1); $F_{(1;2;0.95)}$= 0.476 < Ftabla=18.5127 (K1 – Etapa 2). Sin embargo, para el parámetro K2 – Etapa 2 del proceso de remojado el contenido de humedad es una variable significativa del parámetro de Peleg $F_{(1;2;0.95)}$= 49 > Ftabla= 18.5127.
También se vio que el tiempo de almacenamiento es una variable no significativa del modelo de Peleg, $F_{(1;2;0.95)}$= 1.027 < Ftabla=18.5127 (K1 – Etapa 1); $F_{(1;2;0.95)}$= 0.211 < 18.5127 (K2 – Etapa 1); $F_{(1;2;0.95)}$= 2.184 < Ftabla= 18.5127 (K1 – Etapa 2); $F_{(1;2;0.95)}$= 0.360 < Ftabla= 18.5127 (K2 – Etapa 2).

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el secado de granos de cebada cervecera mostraron que a contenido de humedad inicial constante, el tiempo de secado disminuye al aumentar la temperatura, mientras que a igual temperatura el tiempo de secado aumentó con la humedad inicial. Para ambos contenidos de humedad de partida (15.5% b.s. y 18% b.s.) el secado a 54°C generó granos fuera de estándar debido a que presentaron un poder germinativo del 90%. Las muestras secadas a 28ºC y 38º, con un contenido de humedad del 15.5 y 18% b.s estuvieron dentro del estándar respecto del poder germinativo ya que

superaron el 98%. La capacidad de rehumectación de las muestras con un 15.5% b.s. de humedad inicial fue superior a la correspondiente a las muestras con un 18% b.s.
En cuanto a la evaluación del efecto del almacenamiento sin aireación de los granos secados bajo diferentes condiciones hasta el valor de humedad de seguridad, se observó que el contenido de humedad no aumentó significativamente en el tiempo ensayado, y que si bien hubo variaciones en el PG al inicio del almacenamiento, éstas no fueron estadísticamente significativas.
Del estudio de la cinética de remojado de los granos durante el almacenamiento pudo concluir que los resultados experimentales pueden ser representados adecuadamente por el modelo de Peleg con coeficientes de determinación superiores a 0.98.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aacrea. 2007. Cebada Cervecera. Agroalimentos Argentinos II.

Agrip. 2008. Harvesting, Drying, and Storing Malting Barley. Http: //64.233.169.104/search?q=cache:MJu7Ke7jJf0J:www.ag.ndsu.edu/ibms/Harvesting1.pdf+http://www.ag.ndsu.edu/ibms/harvesting.pdf&hl=es&ct=clnk&cd=1&gl=ar. Ultimo acceso: 28/02/08.

Aocs. 1998. Official and Recommended Practices of the AOCS, 5th ed AOCS Press.

Asae. 1999. Standards engineering practices data. 46tn edition. Adopte and Publisher by: American Society of Agricultural Engineers.

Asbc Barley 3C. 2007. En www.grainscanada.gc.ca, último acceso 11/03/09.

Bakker-Arkema FW, Maier DE, Schisler IR. 1987. Drying rate and drying capacities of different seed grains. Drying Technology, 5(4): 527-540.

Bcr. 2007(a). Bolsa de Comercio de Rosario. Norma V-Cebada, Anexo A-Cebada Cervecera. Cámara Arbitral de Cereales, http://bcr.com.ar/pagcentrales/cac/pdfs/normas/NORMA%20V%20Cebada%20Cervecera.pdf. Ultimo acceso: 06/12/07.

Bcr. 2007(b). Bolsa de Comercio de Rosario. Norma V-Cebada, Anexo C-Cebada Cervecera Seleccionada para maltería. Cámara Arbitral de Cereales, http://www.bcr.com.ar/pagcentrales/cac/pdfs/normas/NORMA%20V%20Cebada%20Cervecera%20Seleccionada%20para%20Malteria.pdf..Último acceso: 06/12/07.

FAR. 1999. The guide to high moisture moisture harvest management, grain storage and handling. www.agric.wa.gou.au.

Hough JS. 1982. Biotecnología de la cerveza y de la malta. http://www.bibliotecas.unc.edu.ar/cgibin/LibreoOPAC?accion=ver_etiquetas&mfn=6. Ultimo acceso:08/10/08.

Infoagro. 2007. The barley growing. http://www.infoagro.com/herbaceos/forrajes/cebada.htm Ultimo acceso 20/02/2008.

Izydorczyk MS. 2004. Prediction of germination energy of malting barley during long-time storage. Project Report Executive Summary, Grain Research Laboratory, 1404−303 Main Street, Winnipeg, Canada, 8 pages.

Jayas DS y White NDG. 2003. Storage and drying of grain in Canada: low cost approaches. Food Control, 14 (4): 255-261.

Langrell DE y Edney MJ. 2006. Quality of western Canadian malting barley. Grain Research Laboratory Canadian Grain Comisión 1404-303 Main Street. Winnipeg MB R3C 3G8.

Llorca Marqués M. 1999. Modelización de la operación de secado de malta, por aire caliente, en lecho fijo y en capa profunda. ISBN 84-89727-64-3. Universitat de Lleida, Salamanca.

Mendoza MA. 2006. Proceso General de Fabricacion de Cerveza. Centro Universitario Anglo Mexicano (CUAM).

PRAIRE GRAINS. 2003. Grain Storage Tips. Tips to Maintain Quality When Drying Small Grains. http://www.smallgrains.org/springwh/June03/grain/grain.htm, Minnesota Association of Wheat Growers, Issue 54, 6 pages. Último acceso: 06/12/07.

Rossi . 2008. Proceso de elaboración de cerveza. www.upch.edu.pe/facien/fc/dcbf/bioaplicada/ CERVEZA.ppt .Última visita: 03/07/08.

Ryniecki A, Gawrysiak-Witulska M, Wawrzyniak J. 2007. Correlation for the automatic identification of drying endpoint in near-ambient dryers: Application to malting barley. Biosystems Engineering, 98:437-445.

Senasa. 2008. Norma de Calidad para Cebada Cervecera. http://www.senasa.gov.ar/Archivos/ File/File1144-anexos.pdf. Último acceso: 30/06/08

Sgrl. 2007. Moisture content limits for safe storage. CSIRO Australia, http://www.sgrl.csiro.au /storage/moisture/moisture_limits.html. Último acceso: 06/12/07.

Wehehahne L. 2007. Cebada cervecera: Evaluación de cultivares. AGRO BARROW. En www.inta.gov.ar/barrow/info/documentos/agrobarrow34/Sumario.pdf

Yanucci D. 1986. Manejo y Conservación de granos y semillas. Curso de Ciencias Agrarias. Educación a distancia.

Yalungo Y. 2006. Producción de cebada cervecera 2006. Dirección de Agricultura – Sagpya.