

Efecto del nivel de urea y pasta de soya en la concentración de proteínas durante la fermentación en estado sólido de manzana de desecho (*Malus domestica*)

C. Rodríguez-Muela¹, D. Díaz¹, F. Salvador¹, O. Ruiz¹, C. Arzola¹, A. Flores¹, O. La O² y A. Elías²

¹Facultad de Zootecnia y Ecología. Universidad Autónoma de Chihuahua. Periférico Francisco R. Almada, Km. 1. Chihuahua, México

Correo electrónico: crmuela@gmail.com

²Instituto de Ciencia Animal, Apartado Postal 24, San José de Lajas, La Habana

Para evaluar el efecto del nivel de urea y pasta de soya en la fermentación en estado sólido (FES) de manzana de desecho molida se realizaron dos experimentos a temperatura controlada (28 y 36 °C). Para el primero se utilizaron niveles de urea (UR) de 1.5 y 2 %, y de pasta de soya (PS) de 0.0 y 3.5 %. Para el segundo, los niveles fueron de 1.5 y 2 % de UR y de 3.5 y 7 % de PS. A las muestras de ambos experimentos se les adicionó 0.2 % de sulfato de amonio y 0.5 % de un suplemento mineral y vitamínico. Las variables evaluadas fueron pH, levaduras totales, proteína bruta (PB) y proteína verdadera (PV). Los resultados mostraron incremento en el pH a partir de las 48 h de inicio de la fermentación, y solo se encontró efecto de adición de pasta de soya ($P < 0.01$) con valores de 4.9 y 5.7, para 0 y 3.5 % de pasta de soya en la mezcla, respectivamente. La adición de urea no mostró efecto en esta variable. El mayor conteo de levaduras se logró con la combinación en la mezcla de 2.0 % de urea y 3.5 % de pasta de soya, alcanzando valores de aproximadamente 4.0×10^8 cel. ml⁻¹, a las 168 h después de iniciada la fermentación. La PB al final de la fermentación mostró diferencias ($P < 0.01$) en ambos experimentos por efecto de la adición de UR y PS. La PV evidenció interacción en los dos experimentos, y mostró mayor valor cuando PS fue de 3.5 %. Esto indicó que hay una respuesta favorable en la producción de PV por la adición de 3.5 % de PS a la mezcla, solo cuando el nivel de UR en la misma es de 1.5 %. Se concluye que, cuando la fermentación se realiza a 28 °C, el mayor contenido de proteína verdadera se obtiene con la combinación de 1.5 y 3.5 % de urea y pasta de soya, respectivamente. Sin embargo, cuando el proceso se efectúa a 36 °C, el mayor contenido se logra con 2.0 % de urea y 3.5 % de pasta de soya. Se sugiere realizar investigaciones futuras para determinar otros valores de insumos y temperaturas que demuestren mayor eficiencia productiva y económica.

Palabras clave: levaduras, proteína, fermentación.

La fermentación en estado sólido (FES) es un proceso microbiológico que ocurre comúnmente en la superficie de materiales sólidos que absorben y contienen el agua, con o sin nutrientes solubles. Este proceso puede llevarse a cabo a escalas industriales, siendo una alternativa potencial para el uso económico de residuos agroindustriales, así como para disminuir el flujo de contaminantes al ambiente. Permite además, la obtención de alimentos para la producción animal (Pandey *et al.* 2001).

Durante el proceso de fermentación de sustratos ricos en azúcares y celulosa, la biomasa microbiana se duplica, debido a que utiliza la energía contenida en estos compuestos químicos, unida al nitrógeno no proteico adicionado para el crecimiento de la microflora. Como resultado, se incrementa la población de bacterias y levaduras, aún en la fase de secado, sin la utilización de inóculo en el sistema (Valiño *et al.* 1994).

A pesar de considerarse una fuente de energía barata, la utilización del desecho de manzana ha recibido muy poca atención. Debido a su alto contenido de humedad (70-80 %), que permite una rápida fermentación, el desecho de manzana puede ser aprovechado por la flora microbiana nativa y elevar potencialmente su valor nutritivo mediante la adición de otros nutrientes, como el nitrógeno no proteico (Elías 2004).

La manzana de desecho, al igual que los subproductos que aporta la industrialización de esta fruta, representa una importante fuente de alimento para los animales.

Además de su bajo costo, tiene la ventaja de poseer nutrientes altamente fermentables por microorganismos, como son las levaduras y bacterias. Como resultado de la FES de estos subproductos, puede producirse proteína microbiana, que es de gran utilidad en la nutrición animal. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de diferentes niveles de urea y pasta de soya, con el propósito de aumentar el valor nutritivo de este subproducto destinado a la alimentación animal.

Materiales y Métodos

Tratamientos y diseño experimental. Se desarrollaron dos experimentos en el laboratorio de nutrición animal de la Facultad de Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua, México.

En el experimento 1 se utilizaron dos niveles de pasta de soya (0 y 3.5 %) y dos niveles de urea (1.5 y 2.0 %), a temperatura de incubación de 28 °C durante 192 h. En el experimento 2 se utilizaron dos niveles de pasta de soya (3.5 y 7 %) y dos de urea (1.5 y 2.0 %), a una temperatura en la incubadora de 36 °C durante 180 h.

En ambos experimentos se utilizaron 24 muestras en total y seis repeticiones por tratamiento. Estas consistían en recipientes de aluminio, con 1 kg de la mezcla. En los dos experimentos, a todas las muestras se les adicionó 0.2 % de sulfato de amonio y 0.5 % de premezcla de vitaminas y minerales trazas, para favorecer el crecimiento de levaduras (tabla 1). El diseño utilizado en ambos experimentos fue completamente al azar,

con arreglo factorial 2 x 2. Los efectos principales fueron dos niveles de urea y dos de pasta de soya.

Tabla 1. Contenido de minerales y vitaminas de la mezcla mineral GANATEC 25^{MR} empleada en la realización de los dos experimentos

Nutriente	Cantidad
Proteína cruda (PC), %	60.0
Fósforo, g	500.0
Calcio, g	4.30
Sodio, g	1.79
Azufre, g	130.0
Magnesio, g	180.0
Potasio, g	70.0
Manganeso, g	37.50
Zinc, g	37.50
Hierro, g	50.0
Cobre, g	7.50
Yodo, mg	750.0
Selenio, mg	150.0
Cobalto, mg	150.0
Bicarbonato de Sodio, g	3.00
Monensina sódica al 10%, g	28.5
Antibiótico, g	10.0
Vitamina A, UI	4 500.00
Vitamina D3, UI	750.00
Vitamina E, UI	1.800

Metodología del trabajo. La materia prima para cada experimento consistió en 25 kg de manzana de desecho de la variedad Golden delicious, molida en un molino de martillos sin criba. Posteriormente, se prepararon porciones de 1 kg por recipiente. Durante el período de fermentación de la manzana, se tomaron seis muestras por tratamiento en diferentes tiempos (0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 132, 144, 156, 168, 180 h para el primero y segundo experimento, más 192 h solo para el primer experimento). Se determinó el pH y el conteo de levaduras por microscopía, con ayuda de la cámara de Neuvauer. Durante la toma de muestras, se realizó un mezclado manual en los recipientes para favorecer la oxigenación y el secado de las mezclas.

Las muestras recolectadas, de aproximadamente 10 g, se depositaron en bolsas de plástico y se almacenaron en un congelador a una temperatura de -5 °C, para su posterior evaluación. Los análisis bromatológicos realizados fueron: humedad, proteína bruta y proteína verdadera. Se utilizaron para ello las técnicas descritas por AOAC (2000).

Análisis estadístico. Los valores de PB y PV se determinaron al finalizar la fermentación, mientras que el conteo de levaduras y pH se realizó durante los muestreos. La información obtenida se procesó según el procedimiento General Linear Models. Para la com-

paración de medias se usó Least Squares Means, del programa SAS (2004).

Resultados y Discusión

En el primer experimento, la pérdida de humedad de las muestras durante la fermentación fue constante, desde las 0 h hasta las 180 h de fermentación. A medida que disminuyó el porcentaje de manzana molida en las mezclas, la pérdida de humedad fue más lenta, ya que al adicionar urea y pasta de soya, el contenido de materia seca de la mezcla aumentó.

Los resultados mostraron incremento en el pH, a partir de las 48 h de inicio de la fermentación. Solo se encontró efecto de adición de pasta de soya ($P < 0.01$), con valores de 4.9 y 5.7, para los niveles de 0 y 3.5 % de pasta de soya en la mezcla, respectivamente. La adición de urea no mostró efecto en esta variable (tabla 2).

Tabla 2. Efecto del nivel de la urea y la pasta de soya en el pH de muestras de manzana de desecho, a las 48 h de fermentación y a 28° C de temperatura

Tratamientos	pH
Pasta de soya, %	
0.0	4.9
3.5	5.7
EE ±	0.17***
Urea, %	
1.5	5.5
2.0	5.1
EE ±	0.17

*** $P < 0.01$

Elías y Lezcano (2000) obtuvieron valores de pH similares en la fermentación de caña de azúcar, cuando utilizaron niveles de urea inferiores a los evaluados en este trabajo. Estos autores informaron cifras de 4.18 y 5.8, para niveles de urea de 1 y 1.5 %, con temperatura de 37 °C. Los resultados del presente trabajo sugieren que las variaciones de pH parecen relacionarse con los niveles de urea y pasta de soya utilizados, por lo que en los mayores valores de pH pudo haber influido la presencia de algunas especies de levaduras y bacterias que se desarrollan a temperatura de 28 °C (Elías y Lezcano 2000).

Al final de la fermentación, la proteína bruta de la mezcla mostró diferencias ($P < 0.01$), por efecto de la adición de pasta de soya, con valores de 76.18 y 55.57 % de proteína cruda con 0 y 3.5 % de pasta de soya en la mezcla fermentada, respectivamente (tabla 3).

La disminución de proteína bruta, al aumentar el por ciento de pasta de soya en la mezcla, pudo estar provocada por la sobrepoblación de bacterias como *Staphylococcus epidermidis*, *Acinetobacter calcoacético* y *Proteus vulgaris*, que desempeñan una fun-

Tabla 3. Efecto de la urea y la pasta de soya en el contenido de proteína bruta de muestras de manzana de desecho a las 192 h de fermentación y 28°C de temperatura

Tratamientos	PB, %
Pasta de soya, %	
0.0	76.18
3.5	55.57
EE ±	0.39***
Urea, %	
1.5	61.90
2.0	69.85
EE ±	0.39***

***P < 0.01

ción importante en la hidrólisis de la urea con la producción de NH₃, metabolito importante en la síntesis celular de algunas de estas especies, lo que produce incremento de biomasa total en el producto (Valiño *et al.* 1994).

La proteína bruta aumentó con la adición de urea a la mezcla (P < 0.01), de 61.90 a 69.85 % (tabla 3), para los niveles de 1.5 y 2 % de urea en la mezcla, respectivamente. Esto se debe a que, generalmente, durante la fermentación en estado sólido se ha informado que la proteína bruta del sustrato se incrementa con la adición de nitrógeno no proteico (Ibarra *et al.* 2002, Rodríguez-Muela *et al.* 2007 y Becerra *et al.* 2008).

La proteína verdadera se incrementa durante la fermentación en estado sólido de diversos tipos de sustrato (Rodríguez *et al.* 2001a e Ibarra *et al.* 2002). Sin embargo, en este experimento a temperatura de fermentación de 28 °C, hubo interacción entre los efectos principales para la proteína verdadera. Esto indicó una respuesta favorable en la producción de proteína verdadera, con la adición de 3.5 % de pasta de soya a la mezcla, solo cuando el nivel de urea en la misma fue de 1.5 %, alcanzando valores de 37.9 % (tabla 4).

Elías y Lezcano (2000) informaron que en la elaboración de Sacchasoya, a medida que se incrementó el

Tabla 4. Efecto de la urea y la pasta de soya en el contenido de proteína verdadera en muestras de manzana de desecho a las 192 h de fermentación y 28°C de temperatura

Pasta de soya, %	Urea, %	
0.0	24.43 ^a	31.77 ^b
3.5	37.90 ^c	27.27 ^{ab}
EE ±	0.32***	

^{abc} Valores con letras no comunes difieren a P < 0.01

***P < 0.01

nivel de urea y se redujo el nivel de soya en la caña de azúcar molida, la proteína verdadera disminuyó de 10.1 a 4.8 %. Encontraron además, que al sustituir la pasta de soya con urea se afectó la producción de proteína. Rodríguez *et al.* (2001b) mencionan que la PV es el indicador más importante de la síntesis microbiana. Estos autores encontraron que, en el caso de la FES de mezclas de bagazo de caña y boniato, el incremento de PV se produce de las 0 a las 96 h.

El mayor conteo de levaduras se consiguió con la combinación en la mezcla de 2.0 % de urea y 3.5 % de pasta de soya, alcanzando valores de aproximadamente 4.0 x 10⁸ cel. ml⁻¹, a las 168 h después de iniciada la fermentación. Esto indica que la menor temperatura de incubación retrasó el crecimiento de levaduras.

En el segundo experimento, la proteína bruta se incrementó en la mezcla (P < 0.01) en aproximadamente 10 %, tanto por la adición de urea como por la adición de pasta de soya (tabla 5). Esto concuerda con lo informado por varios autores, pues en los procesos de fermentación en estado sólido la proteína bruta del sustrato se incrementa con la adición de nitrógeno no proteico (Ibarra *et al.* 2002, Rodríguez-Muela *et al.* 2007 y Becerra *et al.* 2008).

Tabla 5. Efecto de la urea y la pasta de soya en el contenido de proteína bruta de muestras de manzana de desecho a las 180 h de fermentación y 36°C de temperatura

Tratamientos	PB, %
Pasta de soya, %	
3.5	42.87
7.0	47.06
EE ±	0.21***
Urea, %	
1.5	42.94
2.0	46.99
EE ±	0.21***

***P < 0.01

La proteína verdadera mostró interacción entre los efectos principales (P < 0.01), aumentando de 33.77 a 43.47 %, cuando la urea se incrementó en la mezcla de 1.5 a 2.0 %, pero solo cuando la pasta de soya se agregó en 3.5 % (tabla 6). Esto indicó efecto favorable en el crecimiento de levaduras con la adición de nitrógeno no proteico, no siendo así cuando se agregó nitrógeno en forma de proteína verdadera.

La mejora en la calidad nutritiva de algunos sustratos fermentados se puede atribuir, en gran parte, al incremento de la población de levaduras, pues se conoce desde hace décadas que su concentración

Tabla 6. Efecto del nivel de urea y pasta de soya en el contenido de proteína verdadera en muestras de manzana de desecho a las 180 h de fermentación y 36°C de temperatura

Pasta de soya, %	Urea, %	
0.0	33.77 ^b	43.47 ^c
3.5	33.67 ^b	30.70 ^a
EE ±	0.32***	

^{abc} Valores con letras no comunes difieren a $P < 0.01$

*** $P < 0.01$

de proteína es alta, y como concentrado proteico las levaduras pueden ser comparables a la pasta de soya, aún cuando tienen bajo contenido de metionina (Klose y Fevold 1945).

En este experimento, la mejor respuesta en el crecimiento de levaduras se obtuvo cuando se adicionó 7 % de pasta de soya y 2 % de urea, con lo que se alcanzó una producción de levaduras de 4.0×10^8 cel. ml^{-1} , a las 96 h de iniciada la fermentación. Sin embargo, los niveles de 1.5 % mantuvieron un conteo de aproximadamente 3.0×10^8 cel. ml^{-1} , entre las 96 y 144 h de iniciar la fermentación. Esta situación pudo originarse porque el tratamiento que contó con los niveles máximos de los dos efectos principales, sobre todo de urea, propició mayor disponibilidad de nitrógeno, y cuando tuvo una temperatura mayor, las levaduras mostraron una respuesta positiva a los nutrientes adicionados, por lo que encontraron sus requerimientos para el crecimiento. Esto coincide con lo informado por Elías y Lezcano (2000).

De los resultados anteriores se concluye que, cuando la fermentación se realiza a 28 °C, el mayor contenido de proteína verdadera se obtiene con la combinación de 1.5 y 3.5 % de urea y pasta de soya, respectivamente. Sin embargo, cuando el proceso se efectúa a 36 °C, esto sucede con 2.0 % de urea y 3.5 % de pasta de soya. Es preciso realizar investigaciones futuras para determinar otros valores de los insumos y temperaturas que muestren mayor eficiencia productiva y económica.

Referencias

- AOAC 2000. Official Methods of Analysis. 17th Ed. Ass. Off. Anal. Chem. Washington, D.C.
- Becerra, A., Rodríguez, C., Jiménez, J., Ruiz, O., Elías A. & Ramírez, A. 2008. Urea y maíz en la fermentación aeróbica de bagazo de manzana para la producción de proteína. *Tecnociencia Chihuahua* 2:7
- Elías A. 2004. Procesos biotecnológicos para la producción y utilización de alimento animal. Simposium internacional, tendencias actuales de la producción de carne en zonas áridas. Chihuahua, México. p. 138
- Elías, A & Lezcano, O. 2000. Inclusión de niveles de harina de soya desgrasada y sin desgrasar en la fermentación de la caña de azúcar en estado sólido Sacchasoya. *Rev. Cubana Cienc. Agric.* 34:143

Revista Cubana de Ciencia Agrícola, Tomo 44, Número 1, 2010.

- Ibarra, A., García, Y., Valiño, E., Dustet, J., Albelo, N. & Carrasco, T. 2002. Influencia de la aireación en la biotransformación del bagazo de caña por *Trichoderma viride* M5-2 en un biorreactor estático de fermentación sólida. *Rev. Cubana Cienc. Agric.* 36:152
- Klose, A.A. & Fevold, H. L. 1945. Nutritional Value of Yeast Protein to the Rat and the Chick. *J. Nutrition* 29:421
- Pandey, A., Soccol, C. R., Rodríguez, J.A & Nigam., P. 2001. *Solid State Fermentation in Biotechnology*. Asiatech Publishers, Inc. New Delhi, India
- Rodríguez-Muela, C., A. Becerra, O. Ruiz, A. Ramírez, A. Flores and A. Elías. 2007. Use of solid state fermentation to increase nutritius value of apple byproducts. *J. Anim. Sci.* 85:284
- Rodríguez, Z., Bocourt, R., Elías A. & Madera, M. 2001a. Dinámica de Fermentación de Mezclas de Caña (*Saccharum officinarum*) y Boniato (*Ipomoea batata*). *Rev. Cubana Cienc. Agric.* 35:147
- Rodríguez, Z., Elías, A., Bocourt R. & Núñez, O. 2001b. Efectos de los niveles de nitrógeno ureico en la síntesis proteica durante la fermentación de mezclas de caña (*Saccharum officinarum*) y Boniato (*Ipomoea batata* Lam.). *Rev. Cubana Cienc. Agric.* 35:29
- SAS 2004. User's Guide: Statistics. Statistical Analysis System Institute, Cary, N.C. U.S.A.
- Valiño, E., Elías, A., Álvarez, E., Quintana M. & Montes de Oca, N. 1994. Composición de especies de bacterias aisladas del proceso de obtención de la Saccharina. I. Bacterias Gram negativas. *Rev. Cubana Cienc. Agric.* 28:69

Recibido: 15 de diciembre de 2008