



# Biotecnia

Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud editada por la Universidad de Sonora



indexada en



IC Journal Master List

e-revist@s



THOMSON REUTERS

Miembro de



Pertenece al Sistema de Clasificación de Revistas Mexicanas de Ciencia y Tecnología del CONACYT



<http://biotecnia.unison.mx>

**BIOTECNIA, 2021, 23, Issue 2** (May – August), is a quarterly electronic publication edited by the University of Sonora, through the Division of Biological and Health Sciences, with address at Blvd. Luis Encinas y Rosales s/ n, Col Centro, Hermosillo, Sonora, México, C.P.83000, <https://www.biotecnia.unison.mx>, e-mail: [biotecnia.difusion@unison.mx](mailto:biotecnia.difusion@unison.mx). Editor responsible for the issue: Enrique Márquez Ríos.

Reservation of Rights to Exclusive Use 004-2022-061515171200-102. ISSN: 1665-1456; both awarded by the National Copyright Institute. The opinions expressed by the authors do not necessarily reflect the position of the editor of the publication. Total or partial reproduction of the contents and images in this publication is authorized, as long as the editor's authorization is obtained and the source is fully cited.



Biotecnia is licensed under the Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International license (CC BY-NC-SA 4.0)

## Content

Type	Pages	Article
Original	pp 5-10	<i>Pinus greggii</i> inoculation with the ectomycorrhizal fungi <i>Laccaria laccata</i> enhances native population of plant-growth-promoting rhizobacteria
Original	pp 11-21	Chemical and nutritional characterization of high quality protein maize ( <i>Zea mays</i> L.) varieties developed in Yucatan, México
Original	pp 22-29	Physicochemical characterization and bioactive compounds in coconut ( <i>Cocos nucifera</i> L.) and its oil: Effect of the cultivar and growing region
Original	pp 30-38	Chayotextle flour as raw material of prebiotic gluten-free cookies added with <i>Agave angustifolia</i> Haw fructans
Original	pp 39-46	<i>Pleurotus ostreatus</i> growth and laccase enzymes production during the degradation process of bisphenol a
Original	pp 47-54	Prediction of the <i>Escherichia coli</i> O157: H7 thermal resistance in ground beef as a function of temperature, carvacrol and fat concentrations
Original	pp 55-64	Heat treatment effect on oat flour used in the substitution of wheat flour for bread- making
Original	pp 65-72	Optimization of lipophilic compounds in tortillas from native pigmented maize obtained from flours by the lime cooking extrusion process
Review	pp 73-80	Comparative study of the production of biomass and omega 3 and 6 in <i>Thraustochytrium Kinney</i>
Original	pp 81-88	Diurnal and seasonal hsp70 gene expression in a cryptic reef fish, the bluebanded goby <i>Lythrypnus dalli</i> (Gilbert 1890)
Original	pp 89-95	Effect of dehydrated nopal ( <i>Opuntia spp</i> ) powder on physicochemical and sensory properties of Vienna sausages
Original	pp 96-102	Mixing effect on prolamins solubility and rheological properties of corn dough during processing for tortilla production
Original	pp 103-112	Effect of the extruded amaranth flour addition on the nutritional, nutraceutical and sensory quality of tortillas produced from extruded creole blue maize flour

Original	pp 113-119	Mexican tea ( <i>Chenopodium ambrosioides</i> L.) growth analysis under greenhouse conditions
Original	pp 120-126	Physicochemical, aromatic, sensory properties and antioxidant activity of roasted coffee ( <i>Coffea arabica</i> L.) treated with cold plasma technology
Original	pp 127-133	Evaluation of biochemical, chemical, physical and microbiological quality of tilapia ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) muscle during 0 and 5 °C storage
Original	pp 134-140	Supplementation of corn tortilla with freeze-dried jumbo squid muscle flour: physicochemical properties and microbiological stability during storage
Original	pp 141-148	Effect of hypoxia on purine metabolism in human skeletal muscle cells
Original	pp 149-160	Coriander ( <i>Coriandrum sativum</i> L.) response to blue and red LED light
Original	pp 161-170	Pruning effect on biomass and protein production in <i>Moringa oleifera</i> Lam. in the central area of Veracruz





# La inoculación de *Pinus greggii* con el hongo ectomicorrízico *Laccaria laccata* favorece a las comunidades nativas de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal

*Pinus greggii* inoculation with the ectomycorrhizal fungi *Laccaria laccata* enhances native population of plant-growth-promoting rhizobacteria

Maryeli Aguirre-Zamora<sup>a</sup>, Jesús Pérez-Moreno<sup>a</sup>, Nguyen Esmeralda López-Lozano<sup>b</sup>, José Luis Barragán Soriano<sup>a</sup> y Julián Delgadillo-Martínez<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Edafología, Área de Microbiología. Km. 36.5 Carretera Federal México- Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado de México. C.P. 56230.

<sup>b</sup> División de Ciencias Ambientales, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C. Camino a la Presa San José No. 2055. Col. Lomas 4<sup>a</sup>. Secc. San Luis Potosí, San Luis Potosí. C.P. 78216.

## RESUMEN

La simbiosis pino-hongo ectomicorrízico es de gran importancia ecológica debido a la interacción microbiana establecida en la micorrizósfera y a las condiciones edáficas favorables creadas por la descomposición de la materia orgánica. El objetivo de este trabajo fue estimar el efecto de la colonización del hongo ectomicorrízico *Laccaria laccata* sobre el crecimiento de *Pinus greggii*, así como la abundancia de microorganismos en sus raíces, en condiciones de invernadero. Para lo cual se realizó con un diseño experimental completamente al azar, compuesto por dos tratamientos: *P. greggii* inoculado con *L. laccata* y testigo. Se evaluó la actividad metabólica microbiana (AMM), diversidad metabólica microbiana, altura, peso seco, abundancia de bacterias fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fosfatos. Por medio de ANOVA se observó que, un año después de la siembra y 6 meses después de la inoculación, *L. laccata* mejoró el crecimiento de *P. greggii*; además, aumentó la AMM, mas no se presentaron diferencias en la diversidad respecto al testigo. También, se encontró mayor abundancia de bacterias solubilizadoras de fosfatos y fijadoras de nitrógeno en la rizósfera de las plantas inoculadas. Lo cual sugiere que estos organismos se ven favorecidos en las condiciones que propicia la presencia de *L. laccata*.

**Palabras clave:** Pinos, Biolog EcoPlates, diversidad microbiana, solubilización de fosfatos, fijación de nitrógeno.

## ABSTRACT

The pine-ectomycorrhizal symbiosis is of great ecological importance due to the microbial interaction established in mycorrhizosphere and the favorable edaphic conditions created by the decomposition of organic matter. The objective of this work was to estimate the effect of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata* colonization on the growth of *Pinus greggii*, as well as the abundance of microorganisms in its roots under greenhouse conditions. For which we used a completely randomized experimental design, composed of two treatments: *P. greggii* inoculated with *L. laccata* and con-

trol. Microbial metabolic activity (AMM), microbial metabolic diversity, height, dry weight, abundance of nitrogen-fixing and phosphate-solubilizing bacteria were evaluated. By means of ANOVA we observed that, one year after sowing and 6 months after inoculation, *L. laccata* improved the growth of *P. greggii*; Furthermore, the AMM increased, but there were no differences in diversity with respect to the control. Also, a greater abundance of phosphate solubilizing and nitrogen fixing bacteria was found in the rhizosphere of the inoculated plants. This suggests that these organisms are favored under the conditions propitiated by the presence of *L. laccata*.

**Keywords:** Pines, Biolog EcoPlates, microbial diversity, phosphate solubilization, nitrogen fixation.

## INTRODUCCIÓN

Los hongos ectomicorrízicos son un componente fundamental en el funcionamiento de los bosques (Baldrian, 2017), ya que favorecen la absorción de nutrientes; primordialmente N y P en suelos con baja fertilidad y contribuyen de forma significativa en el ciclo del carbono por medio de la descomposición de la materia orgánica en el suelo (Phillips *et al.*, 2013; Shah *et al.*, 2015). Además, ayudan a los árboles a desarrollarse en condiciones de estrés abiótico, como la sequía, y a protegerse de fitopatógenos. Debido a estos beneficios, las tecnologías de producción de árboles en vivero contemplan el establecimiento de la simbiosis árbol-hongo ectomicorrízico desde las primeras etapas fenológicas de las plantas; para que, de esta manera, se acrecienten las posibilidades de éxito de las plantas llevadas a su sitio definitivo de crecimiento. En el siglo pasado, la práctica habitual para poner en contacto a los hongos ectomicorrízicos con las plántulas era con el uso de "tierra de monte" en los sustratos (Aucina *et al.*, 2007). De esta manera, las plántulas también se exponían a sus fitopatógenos; favoreciendo la presencia de enfermedades vegetales (Menkis *et al.*, 2016).

Las técnicas modernas de producción de plantas en vivero incluyen el uso de sustratos solarizados o esterilizados

\*Autor para correspondencia: Julián Delgadillo-Martínez  
Correo electrónico: juliandm@colpos.mx

Recibido: 7 de julio del 2020

Aceptado: 13 de octubre de 2020

junto con la inoculación (Casique *et al.*, 2018); la cual implica la introducción de grandes cantidades de microorganismos en el suelo o sustrato y generalmente, en la proximidad de las radículas de las plántulas. Esta biotecnología permite la producción de plantas con crecimiento acelerado y resistentes ante factores bióticos y abióticos adversos habituales en los sitios a reforestar (Berruti *et al.*, 2016). La inoculación micorrízica provoca efectos diversos de acuerdo a la especie vegetal; reportándose que las mayores posibilidades de éxito se presentan en coníferas, no-leguminosas arbustivas y pastos C4 (Hoeksema *et al.*, 2010). Para acrecentar las posibilidades de éxito de la inoculación micorrízica, se recomienda conocer y manejar las principales interacciones entre los componentes de la microbiota que coloniza la rizosfera, endosfera y filosfera y, de esta manera, mejorar la sanidad vegetal y la productividad en los viveros (Vandenkoornhuysen *et al.*, 2015; Hassani *et al.*, 2018).

La esterilización de los sustratos, además de incrementar el crecimiento de las plantas por la eliminación de fitopatógenos, favorece el establecimiento de un microbioma diverso, representado por microorganismos benéficos (Marschner y Rumberger, 2004; Li *et al.*, 2019). Estos microorganismos pueden ser bacterias fijadoras de nitrógeno y/o solubilizadoras de fosfatos, controladoras de enfermedades radicales y, en general, promotoras del crecimiento vegetal (Troelstra *et al.*, 2001). Con base en lo anterior, el presente trabajo tuvo como finalidad determinar el papel de la esterilización del sustrato y de la inoculación de *Pinus greggii* Engelm. con esporomas del hongo ectomicorrízico *L. laccata* en el establecimiento de diversos organismos, representados por rizobacterias benéficas para el crecimiento vegetal.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El germoplasma de *P. greggii* se colectó en el corredor de los volcanes Iztaccíhuatl y Popocatepetl, Puebla, México (límite extremo norte 98° 40' 18" y 19° 28' 2"; límite extremo oeste 98° 46' 40" y 19° 20' 29"; límite extremo este 98° 37' 28" y 19° 16' 16"; límite extremo sur 98° 40' 27" y 19° 14' 36"). Las semillas se esterilizaron con 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 20 min. El inóculo se preparó con esporomas de *L. laccata* provenientes de un bosque de pinos en San Pedro Nexapa, Ozumba, Estado de México (19° 8' 12" N y 98° 39' 12" O). Se separaron los estípiteos de los píleos, estos últimos se deshidrataron a 35 °C en un horno deshidratador de tipo bandeja (Jersa®) durante 4 días. Posteriormente, se molieron en un molino eléctrico (Thomas Scientific®, Modelo 4 Wiley Mill, EE.UU.) y pasó a través de un tamiz de abertura de 1 mm para obtener un tamaño de partícula homogéneo. El inóculo se almacenó a 5 °C. El experimento se estableció en condiciones de invernadero en las instalaciones del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Estado de México.

### Diseño de tratamientos

Se establecieron 2 tratamientos: 1) testigo, *P. greggii* sin inocular y 2) *P. greggii* inoculado con *L. laccata*; en un diseño completamente al azar con 10 repeticiones.

### Preparación del sustrato e inoculación

El sustrato consistió en una mezcla de arena, corteza de pino y suelo forestal en una proporción 2:2:1, se esterilizó tres veces (con un día de descanso entre cada esterilización), con vapor a una presión de 1.3 kg·cm<sup>-2</sup> a 125 °C durante 5 h. Las semillas se sembraron en tubos de plástico negro de 125 cm<sup>3</sup> con el sustrato descrito. A las plantas del tratamiento inoculado se les adicionaron 10<sup>8</sup> esporas de *L. laccata por planta*, determinada esta concentración por observación al microscopio (60X) y con hematocitómetro. Se hicieron dos inoculaciones de esporas del hongo: la primera simultáneamente con la siembra y la segunda 60 días después. Las plantas fueron regadas diariamente con agua destilada estéril, durante seis meses.

### Variables evaluadas

#### Altura y peso seco de las plantas

A los 180 días después de la siembra, se cortaron las plantas y se determinó su longitud desde la base hasta la última acícula. Se colocaron en bolsas de papel y se secaron en un horno (Jersa® deshidratador de tipo bandeja, México) a 70 °C, durante 3 días, para posteriormente ser pesadas en una balanza analítica (Sartorius, Entris II 1 mg).

#### Perfil metabólico de comunidades microbianas

Los perfiles metabólicos de las comunidades microbianas cultivables de ambos tratamientos (testigo e inoculado con *L. laccata*), se determinaron con las microplacas Biolog™ EcoPlates (BIOLOG Inc., Hayward, CA) que contienen diferentes fuentes de carbono. Se utilizó el procedimiento adaptado de Garland y Mills (1991), posteriormente se realizaron diluciones seriadas desde 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-4</sup>. Se utilizó la dilución 10<sup>-3</sup>, de esta se tomó una alícuota de 150 µL y se depositó en cada uno de los pocillos, en el pozo A1 únicamente se le agregó 150 µL de agua destilada. Las placas se incubaron a 28 °C y la absorbancia fue leída a 590 nm., usando un lector de microplacas (Synergy2 MCA Bio-Tek). Las mediciones se realizaron a las 24, 48, 72 y 96 h de la incubación.

#### Abundancia de bacterias fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fosfatos

Se utilizó el procedimiento adaptado de Garland y Mills (1991) para obtener la solución madre, de la cual, realizaron diluciones seriadas de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-6</sup>. Para el conteo de bacterias fijadoras de nitrógeno se utilizaron las diluciones 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup> y 10<sup>-5</sup>, mientras que para las solubilizadoras de fosfatos se usaron 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> y 10<sup>-4</sup>. En ambos casos se tomaron 100 µL de cada dilución y se sembraron en placas de Petri con un total de cinco repeticiones por dilución. Los medios de cultivo utilizados fueron fuente combinada de carbono y Pikovskaya para fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fosfatos, respectivamente. Se incubaron por 3 y 10 días a 27 °C, respectivamente.

Para el conteo de bacterias, en ambos medios de cultivo se seleccionó la dilución 10<sup>-4</sup>, por contener entre 30 y 300 colonias por caja de Petri. En medio Rennie se contaron

las colonias totales, mientras que para las bacterias solubilizadoras de fosfatos se tomaron en cuenta aquellas que presentaron un halo de solubilización.

### Análisis estadístico

Para el perfil metabólico de comunidades microbianas el promedio del desarrollo del color y el índice de Shannon-Weaver fueron analizados por ANOVA. Todos los análisis estadísticos sobre los microorganismos se realizaron con SAS versión 9.0 para Windows (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA).

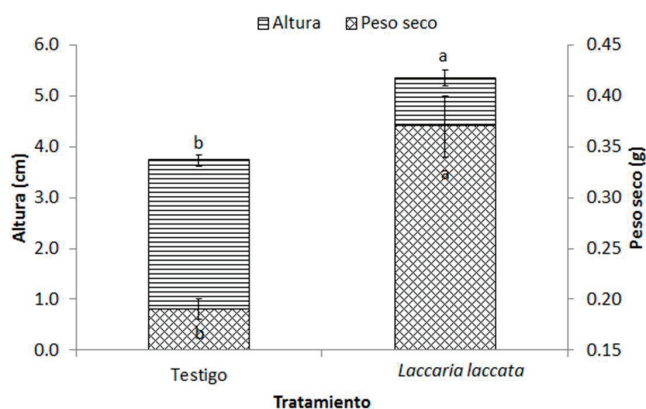
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Altura y peso seco de las plantas

A los 180 días después de la siembra, las plantas del tratamiento inoculado con hongos ectomicorrícicos superaron en altura a las del testigo; con 5.4 y 3.7 cm ( $p < 0.05$ ), respectivamente. Mientras que en el peso seco se generaron valores de 0.19 g para el testigo y 0.37 g para el inoculado, como se muestra en la Figura 1. La inoculación con *L. laccata* aumenta el crecimiento de *P. greggii*; esto se ve reflejado en la altura y peso seco de las plantas. Un fenómeno similar en la altura de *P. greggii* fue observado por Rentería-Chávez *et al.* (2017), usando la misma técnica (inóculo a partir de esporomas deshidratados) y carga microbiana en la inoculación (concentración de  $10^7$  a  $10^8$  esporas por g de inóculo) donde, después de 12 y 24 meses de la inoculación hubo diferencias estadísticas entre el tratamiento *L. laccata* y el testigo, en un sustrato con las mismas proporciones usadas en este trabajo. Lo cual indica que la influencia de la inoculación sobre el crecimiento de las plantas es constante en diversos estudios. Además, las plantas inoculadas son más resistentes al cambio de las condiciones ambientales que ocurren al trasplantarlas en campo, aumentando su índice de supervivencia (Valdés, 1986; Gómez-Romero *et al.*, 2013).

### Perfil metabólico de comunidades microbianas

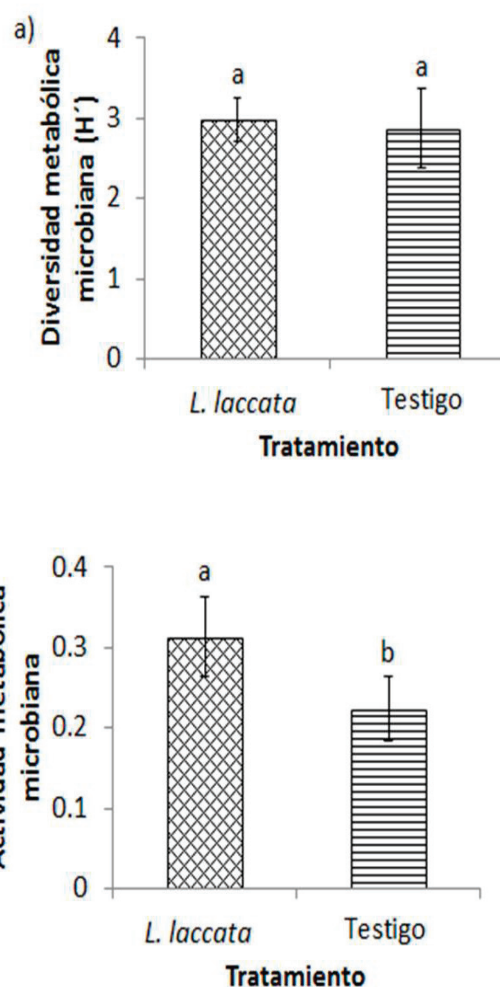
La diversidad metabólica microbiana, evaluada con el índice de Shannon-Weaver ( $H'$ ) a las 48 h de incubación, no



**Figura 1.** Altura y el peso seco de *Pinus greggii* en los tratamientos inoculado con *Laccaria laccata* y testigo sin inocular (Tukey  $p < 0.05$ ).  
**Figure 1.** *Pinus greggii* height and dry weight in *Laccaria laccata* - and uninoculated control groups (Tukey  $p < 0.05$ ).

mostró diferencias significativas entre tratamientos: 2.97 en el inoculado con *L. laccata* y 2.87 en el testigo (Figura 2a). Sin embargo, la inoculación con *L. laccata* afectó claramente la actividad metabólica microbiana (AMM). En general, la AMM fue mayor en el tratamiento inoculado, con una lectura de 0.3 comparada con 0.22 en el testigo, ambas a 590 nm (Figura 2b).

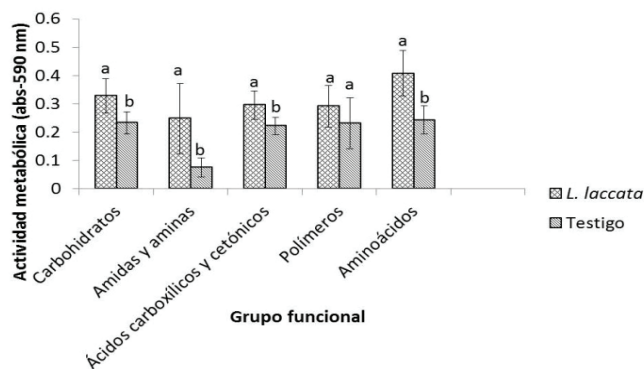
Se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, para la mayoría de los grupos funcionales, a excepción de los polímeros. Para ambos tratamientos, las fuentes de carbono más utilizadas fueron las que se encuentran dentro del grupo funcional de los aminoácidos, seguidas de los carbohidratos, ácidos carboxílicos y cetónicos; mientras que las menos usadas en ambos casos, fueron los polímeros y las amidas y aminas (Figura 3).



**Figura 2.** Diversidad ( $H'$ ) y actividad metabólica microbiana en la rizósfera de *Pinus greggii* inoculado con *Laccaria laccata* y en el testigo sin inocular. Letras diferentes representan diferencia estadísticamente significativa (Tukey,  $\alpha = 0.05$ ).

**Figure 2.** Diversity ( $H'$ ) and microbial metabolic activity (AMM) in the rhizosphere of *Pinus greggii* inoculated with *Laccaria laccata* and in the uninoculated control. Different letters represent statistically significant difference (Tukey,  $\alpha = 0.05$ ).





**Figura 3.** Actividad metabólica microbiana expresada en el uso de fuentes de carbono correspondientes a cinco grupos funcionales en la rizósfera de *Pinus greggii* inoculado con *Laccaria laccata* y en el testigo sin inocular. Letras diferentes representan diferencia estadísticamente significativa (Tukey,  $\alpha = 0.05$ ).

**Figure 3.** Microbial metabolic activity expressed in the use of carbon sources corresponding to five functional groups in the rhizosphere of *Pinus greggii* inoculated with *Laccaria laccata* and in the uninoculated control. Different letters represent statistically significant differences (Tukey,  $\alpha = 0.05$ ).

De acuerdo con Setälä (2000), las plantas ectomicorizadas transfieren mayores cantidades de fotosintatos al suelo comparado con las no micorizadas; lo cual se encuentra relacionado con el crecimiento de la mayoría de los microorganismos en la rizósfera. Esto coincide con los resultados del presente trabajo, donde hubo mayor abundancia de microorganismos en los pinos inoculados con *L. laccata* en comparación con los testigos. Además, la ectomicorriza, entre sus múltiples funciones, ayuda a la formación y descomposición de materia orgánica que puede ser aprovechada por los microorganismos rizosféricos. Esto confirma que la materia orgánica en el suelo y/o sustrato, podría mejorar el acceso a nutrientes y energía para la proliferación de biomasa microbiana, lo que conduce a que los microorganismos degraden con mayor facilidad las fuentes de carbono (Wang *et al.*, 2019). Tian *et al.* (2016) mencionan que los microorganismos con la capacidad de utilizar aminoácidos como fuente de carbono, inducen cambios en la actividad peptidasa del suelo, lo que acelera la descomposición de las proteínas de la materia orgánica, agilizando la rotación de nitrógeno orgánico. Efecto que se puede observar tanto en la altura como en la producción de biomasa del pino en este experimento.

Varios estudios han demostrado que los hongos ectomicorrícicos aumentan la formación de agregados del suelo, a través de exudados fúngicos y la hidrofobicidad del micelio (Zheng *et al.*, 2014). Esta capacidad se encuentra relacionada con la atracción de microorganismos al micelio extraradical (Zheng *et al.*, 2014; Viollet *et al.*, 2017). Wang *et al.* (2019), observaron que la actividad metabólica microbiana de los ácidos carboxílicos, carbohidratos y amoniácidos es más elevada en los suelos que tienen mayor cantidad de agregados. Lo anterior sugiere que los hongos ectomicorrícicos no aportan dichos beneficios edáficos de manera aislada, sino en conjunto con el microbioma que se forma

a partir de su inoculación. En resumen, tanto la diversidad como la actividad metabólica microbiana son indicadores de la calidad del suelo (Wang *et al.*, 2019). Por medio de esta información se pueden plantear estrategias de rehabilitación mediante incorporación de plantas vivas inoculadas con microorganismos adaptables al ambiente y; a su vez, realizar el seguimiento para evaluar la efectividad de la intervención (Ge *et al.*, 2018).

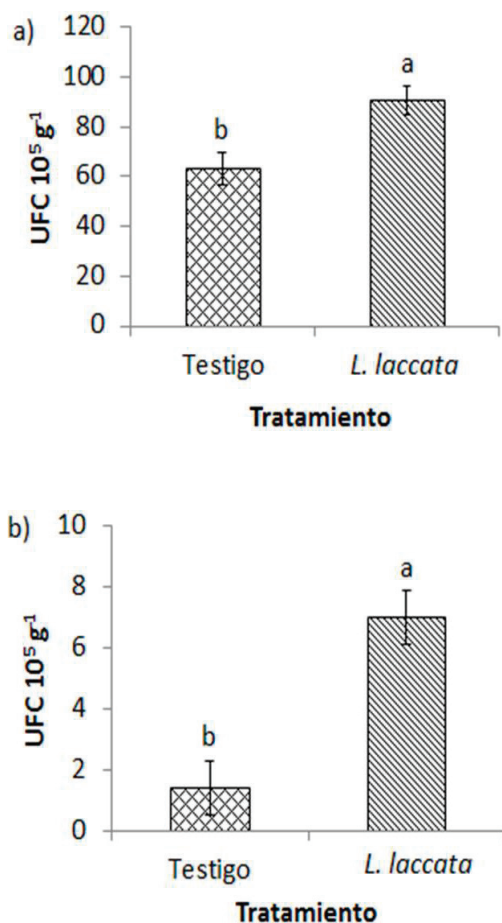
### Abundancia de bacterias fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fosfatos

Dentro de los microorganismos que habitaban en ambos tratamientos, los de mayor importancia por su función, fueron las bacterias fijadoras de nitrógeno y las solubilizadoras de fosfatos. Los resultados señalaron diferencia significativa entre tratamientos, el tratamiento con inoculación tuvo mayor abundancia de bacterias fijadoras de nitrógeno que el testigo, con  $90.4$  y  $63.2 \times 10^5$  UFC  $g^{-1}$  de suelo, respectivamente. Comportamiento similar en el caso de las bacterias solubilizadoras de fosfatos, con  $7 \times 10^5$  UFC  $g^{-1}$  de suelo en el inoculado y  $1.4 \times 10^5$  UFC  $g^{-1}$  en el testigo (Figura 4). Se sabe que hay un efecto positivo sobre la abundancia de bacterias cuando las plantas son ectomicorizadas. No obstante, hay poco conocimiento acerca de los mecanismos de atracción que se llevan a cabo las raíces. Cumming *et al.* (2015) mencionan que se forma una comunicación tripartita (planta-hongo-bacteria), con el objetivo de mejorar el acceso a los nutrientes del suelo. Por ejemplo, la exudación de algunas sustancias orgánicas como ácido cítrico y ácido oxálico del micelio, promueve la colonización bacteriana en la micorrizósfera (Olsson y Wallander, 1998), mientras que las bacterias generan exudados como el auxofurano que estimulan el crecimiento del hongo y por ende de la planta (Cumming *et al.*, 2015). Por ello, se dice que las raíces ectomicorizadas influyen sobre la selección y abundancia de estas bacterias, debido a que el micelio recibe altas cantidades de carbohidratos provenientes de la fotosíntesis que realizan las plantas, lo cual genera una gran área de superficie para la colonización bacteriana (Marupakula *et al.*, 2017).

A pesar de que las bacterias no fueron inoculadas directamente, se infiere que se encontraban en los esporomas de los hongos ectomicorrícicos al momento de su inoculación, puesto que no se realiza un proceso de desinfección a los cuerpos fructíferos, ya que esto impediría el desarrollo de ectomicorriza en las plantas. Kuppardt *et al.* (2018) mencionan que las raíces de las plantas seleccionan comunidades fúngicas y bacterianas que tienen efectos sobre su desarrollo y productividad. Además, algunas bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno, como *Gluconacetobacter diazotrophicus* pueden encontrarse en varias especies de pinos, ayudándolos a desarrollarse en suelos pobres en este compuesto (Carrell y Frank, 2014).

Tomando en cuenta que el nitrógeno y el fósforo son los nutrientes que ocasionan mayores limitaciones en el crecimiento de las plantas, parece predecible que los hongos ectomicorrícicos atraigan bacterias con la capacidad de asi-





**Figura 4.** Tamaño de la población de bacterias solubilizadoras de fosfatos (a) y fijadoras de N atmosférico de vida libre (b) en la rizosfera de *Pinus greggii* inoculado con *Laccaria laccata* y en el testigo sin inocular (Tukey,  $\alpha = 0.05$ ).  
**Figure 4.** Population size of phosphate solubilizing bacteria (a) and free-living atmospheric N-fixing (b) in the rhizosphere of *Pinus greggii* inoculated with *Laccaria laccata* and in the uninoculated control (Tukey,  $\alpha = 0.05$ ).

milar dichos nutrientes. Marupakula *et al.* (2017) mencionan que al estudiar el microbioma asociado a las raíces de *P. sylvestris* colonizadas por diversos hongos ectomicorrícicos, algunos de los géneros representativos encontrados fueron *Burkholderia* y *Bradyrhizobium*; que tienen la capacidad de fijación de nitrógeno y/o solubilización de fosfatos (Bolívar-Anillo *et al.*, 2016; Nápoles *et al.*, 2018). Asimismo, Ekblad y Huss-Danell (1995), observaron que la influencia de la ectomicorriza aumenta la transferencia de nitrógeno a los pinos. Esto puede indicar que, en términos generales, los hongos ectomicorrícicos atraen especies bacterianas con la facultad de promoción del crecimiento vegetal.

## CONCLUSIONES

El hongo ectomicorrícico *L. laccata* tiene efectos positivos sobre el desarrollo de *P. greggii* (altura y peso seco). Además, esta simbiosis aumenta la AMM de la rizósfera pero no influye en la diversidad de la misma. Las fuentes de carbono más utilizadas por los microorganismos rizosféricos de *P.*

*greggii*, sin importar la inoculación, fueron los pertenecientes a los grupos funcionales aminoácidos, carbohidratos, y ácidos carboxílicos y cetónicos; mientras que los menos usados fueron los polímeros y las aminas y amidas. La simbiosis ectomicorrícica proporciona el ambiente idóneo para la proliferación de bacterias fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fosfatos, las cuales promueven el crecimiento del pino.

## REFERENCIAS

- Aucina, A., M. Rudawska, T. Leski, A. Skridaila, E. Riepsas y M. Iwanski. 2007. Growth and mycorrhizal community structure of *Pinus sylvestris* seedlings following the addition of forest litter. *Applied and Environmental Microbiology*. 73(15): 4867-4873.
- Baldrian, P. 2017. Forest microbiome: diversity, complexity and dynamics. *FEMS Microbiology Reviews*. 41: 109-130.
- Berruti, A., Lumini E., Balestrini, R. y Bianciotto, V. 2016. Arbuscular mycorrhizal fungi as natural biofertilizers: Let's benefit from past successes. *Frontiers in Microbiology*. 6:1559-103389.
- Bolívar-Anillo, H.J., Contreras-Zentella, M.L. y Teherán-Sierra, L.G. 2016. *Burkholderia tropica* una bacteria con gran potencial para su uso en la agricultura. *Tip* 19: 102-108.
- Carrell, A.A. y Frank, A.C. 2014. *Pinus flexilis* and *Picea engelmannii* share a simple and consistent needle endophyte microbiota with a potential role in nitrogen fixation. *Frontiers in Microbiology*. 5: 1-11.
- Casique R., R. Mendoza, F. Galindo, S. González y S. Sánchez. 2018. Improved parameters of *Pinus greggii* seedling growth and health after inoculation with ectomycorrhizal fungi. *Southern Forests: a Journal of Forest Science*. 81(1): 1-11.
- Cumming, J.R., Zawaski, C., Desai, S. y Collart, F.R. 2015. Phosphorus disequilibrium in the tripartite plant-ectomycorrhiza-plant promoting rhizobacterial association. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. 15: 464-485.
- Ekblad, A.L.F. y Huss-Danell, K.E.R.S.T.I.N. 1995. Nitrogen fixation by *Alnus incana* and nitrogen transfer from *A. incana* to *Pinus sylvestris* influenced by macronutrients and ectomycorrhiza. *New Phytologist*. 131: 453-459.
- Garland, J.L. y Mills, A.L. 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Applied and Environmental Microbiology*. 57: 2351-2359.
- Ge, Z., Du, H., Gao, Y. y Qiu, W. 2018. Analysis on metabolic functions of stored rice microbial communities by BIOLOG ECO microplates. *Frontiers in Microbiology*. 9: 1375.
- Gómez-Romero, M., Villegas, J., Sáenz-Romero, C. y Lindig-Cisneros, R. 2013. Efecto de la micorrización en el establecimiento de *Pinus pseudostrobus* en cárcavas. *Madera y Bosques*. 19: 51-63.
- Hassani, M.A., Durán, P. y Hacquard, S. 2018. Microbial interactions within the plant holobiont. *Microbiome*. 6: 1-16.
- Hoeksema, J.D., Chaudhary, V.B., Gehring, C.A., Johnson, N.C., Karst, J., Koide, R.T., Pringle, A., Zabinski, C., Bever, J.D. y Moore, J.C. 2010. A meta-analysis of context-dependency in plant response to inoculation with mycorrhizal fungi. *Ecology Letters*. 13:394-407.
- Kuppardt, A., Fester, T., Härtig, C. y Chatzinotas, A. 2018. Rhizosphere Protists Change Metabolite Profiles in *Zea mays*. *Frontiers microbiology*. 9: 169-178.

- Li, K., DiLegge, M.J., Minas, I.S., Hamm, A., Manter, D. y Vivanco, J.M. 2019. Soil sterilization leads to re-colonization of a healthier rhizosphere microbiome. *Rhizosphere*. 12: 100176.
- Marupakula, S., Mahmood, S., Jernberg, J., Nallanchakravarthula, S., Fahad, Z.A. y Finlay, R.D. 2017. Bacterial microbiomes of individual ectomycorrhizal *Pinus sylvestris* roots are shaped by soil horizon and differentially sensitive to nitrogen addition. *Environmental Microbiology*. 19: 4736-4753.
- Marschner, P. y Rumberger, A. 2004. Rapid changes in the rhizosphere bacterial community structure during re-colonization of sterilized soil. *Biology and Fertility of Soils*. 40:1-6.
- Menkis, A., D. Burokienė, J. Stenlid y E. Stenström. 2016. High-throughput sequencing shows high fungal diversity and community segregation in the rhizospheres of container-grown conifer seedlings. *Forests* 7(2): 44.
- Nápoles M.C., Cabrera, J.C., Wegria, G., Onderwater, R., Wattiez, R., Hernández, I. y González, G. 2018. Inducción de señales en la interacción *Mesorhizobium cicerii*-*Cicer arietinum* L. *Cultivos Tropicales*. 39: 101-107.
- Olsson, P.A. y Wallander, H. 1998. Interactions between ectomycorrhizal fungi and the bacterial community in soils amended with various primary minerals. *FEMS Microbiology Ecology*. 27: 195-205.
- Phillips, L.A., Ward, V. y Jones, M.D. 2013. Ectomycorrhizal fungi contribute to soil organic matter cycling in sub-boreal forests. *The ISME Journal*. 8: 699-713.
- Rentería-Chávez, M.C., Pérez-Moreno, J., Cetina-Alcalá, V.M., Ferrera-Cerrato, R. y Xoconostle-Cázares, B. 2017. Transferencia de nutrientes y crecimiento de *Pinus greggii* Engelm. inoculado con hongos comestibles ectomicorrízicos en dos sustratos. *Revista Argentina de Microbiología*. 49: 93-104.
- Setälä, H. 2000. Reciprocal interactions between Scots pine and soil food web structure in the presence and absence of ectomycorrhiza. *Oecologia*. 125: 109-118.
- Shah, F., Nicolás, C., Bentzer, J., Ellström, M., Smits, M., Rineau, F. y Braesel, J. 2015. Ectomycorrhizal fungi decompose soil organic matter using oxidative mechanisms adapted from saprotrophic ancestors. *New Phytologist*. 209: 1705-1719.
- Tian, J., Wang, J., Dippold, M., Gao, Y., Blagodatskaya, E. y Kuzyakov, Y. 2016. Biochar affects soil organic matter cycling and microbial functions but does not alter microbial community structure in a paddy soil. *Science of the Total Environment*. 556: 89-97.
- Troelstra, S.R., Wagenaar, R., Smant, W. y Peters, B.A.M. 2001. Interpretation of bioassays in the study of interactions between soil organisms and plants: participation of nutrient factors. *New Phytology*. 150: 697-706.
- Valdés, M. 1986. Supervivencia y crecimiento de pinos con ectomicorizas específicas después de 3 años en un sitio altamente erosionado. *Revista Canadiense de Botánica*. 64: 885-888.
- Vandenkoornhuyse, P., Quaiser, A., Duhamel, M., Le Van, A. y Dufresne, A. 2015. The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytologist*. 206: 1196-1206.
- Viollet, A., Pivato, B., Mougél, C., Cleyet-Marel, J.C., Gubry-Rangin, C., Lemanceau, P. y Mazurier, S. 2017. *Pseudomonas fluorescens* C7R12 type III secretion system impacts mycorrhization of *Medicago truncatula* and associated microbial communities. *Mycorrhiza*. 27: 23-33.
- Wang, S., Li, T., Zheng, Z. y Chen, H.Y. 2019. Soil aggregate-associated bacterial metabolic activity and community structure in different aged tea plantations. *Science of The Total Environment*. 654: 1023-1032.
- Zheng, W., Morris, E.K. y Rillig, M.C. 2014. Ectomycorrhizal fungi in association with *Pinus sylvestris* seedlings promote soil aggregation and soil water repellency. *Soil Biology and Biochemistry*. 78: 326-331.



## Caracterización química y nutrimental de variedades de maíz (*Zea mays* L.) de alta calidad de proteína (QPM) desarrolladas en Yucatán, México

Chemical and nutritional characterization of high quality protein maize (*Zea mays* L.) varieties developed in Yucatan, México

Manuel Chan-Chan<sup>a</sup>, Yolanda Moguel-Ordóñez<sup>b</sup>, Santiago Gallegos-Tintoré<sup>a</sup>, Luis Chel-Guerrero<sup>a</sup>, David Betancur-Ancona<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Facultad de Ingeniería Química. Universidad Autónoma de Yucatán. Periférico Norte Km. 33.5, Tablaje Catastral 13615, Colonia Chuburná de Hidalgo Inn, 97203, Yucatán, México.

<sup>b</sup> Campo Experimental Mocochoá, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo experimental Mocochoá, C.P. 97454. Yucatán, México.

### RESUMEN

La desnutrición es un problema que afecta a las comunidades rurales. El maíz es alimento básico cuya ingesta es esencial para el crecimiento y desarrollo de los infantes. La calidad proteínica del maíz es pobre debido a la deficiencia de aminoácidos como lisina y triptófano, por lo cual, se han desarrollado maíces de calidad de proteína (denominados QPM). Por lo que en el presente estudio, se realizó la caracterización química y nutrimental de los granos de maíz híbrido Sac Béh y Chichén Itzá, determinando la composición químico proximal, los minerales Ca, Fe, K, Mg, Na y P; el perfil de ácidos grasos y de aminoácidos. Se evaluó la calidad de la proteína mediante la digestibilidad "in vitro" y cómputo químico, aminoácido limitante, la puntuación de aminoácidos corregido con digestibilidad de proteínas (PDCAAS), la relación de eficiencia de proteína calculada (c-PER) y el valor biológico (VB). Se demostró un aumento de proteínas y alto contenido de aceite con 7 % de lípidos. Se encontró un mayor contenido de ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) que saturados (SFA) y se mantuvo el contenido mineral. La calidad de la proteína fue superior con respecto a los predecesores, con mayores niveles de lisina, triptófano, fenilalanina e isoleucina, mayor digestibilidad y el doble de valor biológico.

**Palabras clave:** Maíz, híbridos, valor nutrimental, calidad de proteína, minerales

### ABSTRACT

Malnutrition is a problem that affects rural communities worldwide. Maize is a food whose intake and nutritional quality is essential for the growth and development of infants. Maize protein quality is poor due to amino acid deficiencies such as lysine and tryptophan, which has generated the development of the so-called quality protein maize (QPM). Chemical and nutritional characterization of the Sac Béh and Chichén Itzá maize hybrids was performed. The proximal analysis, minerals Ca, Fe, K, Mg, Na and P, fatty acid and amino acid profiles were determined. Protein quality was also evaluated by the determination of *in vitro* digestibility and chemical score, limiting amino acid, protein digestibility-

corrected amino acid score (PDCAAS), calculated protein efficiency ratio (c-PER), and the biological value (BV). In hybrid varieties, an increase in protein was demonstrated. They were high oil corn (HOC) with 7 % lipids. A higher content of monounsaturated fatty acids (MUFA) than saturated fatty acids (SFA) was found with an improvement in the quality of the oil, and the mineral content maintained. The protein quality was superior with respect to the native predecessors, with higher levels of lysine, tryptophan, phenylalanine and isoleucine, with greater digestibility and with double biological value.

**Keywords:** maize; hybrids; nutritional value; protein quality; minerals

### INTRODUCCIÓN

El maíz (*Zea mays* L.) es una de las fuentes de alimento más importantes del mundo consumidas por humanos y animales, ya que aporta alrededor del 50 % de la proteína y varios nutrimentos que complementan la dieta habitual, como minerales, fibra dietética y grasas insaturadas. Sin embargo, el maíz tiene algunas limitaciones, como baja calidad de su proteína (Li y Vassal, 2016). Se considera que sus proteínas se encuentran desequilibradas nutricionalmente ya que las zeínas, sus proteínas de almacenamiento más abundantes, no poseen las cantidades suficientes de aminoácidos esenciales como lisina, triptófano y metionina (Gayral *et al.*, 2016). La desnutrición infantil es uno de los problemas que afectan a la población debido a la falta de proteína de calidad en la alimentación e inaccesibilidad a alimentos con alto valor nutritivo; principalmente por parte del sector de la población con un nivel socioeconómico bajo, situación que ha ocasionado problemas en el desarrollo de los infantes (Salazar y Magaña, 2016).

La deficiencia de aminoácidos esenciales en el maíz ha llevado a dos estrategias para subsanarla. La primera consiste en incorporar en los productos hechos de maíz, como la tortilla, proteínas cuya composición de aminoácidos sea complementaria, como por ejemplo la proteína de leguminosas. La segunda consiste en suplementar dichos produc-

\*Autor para correspondencia: David Betancur Ancona  
 Correo electrónico: bancona@correo.uady.mx

Recibido: 22 de julio de 2020

Aceptado: 16 de noviembre de 2020

tos con L-aminoácidos libres como lisina y triptófano en las concentraciones requeridas (Akalu *et al.*, 2010). De optarse por la primera opción, debe considerarse que las características sensoriales cambian con la adición de otra fuente de proteína. Con la segunda alternativa será necesario controlar la adición aminoácidos debido a que, una suplementación excesiva puede producir efectos tóxicos o antagonismo aminoacídico.

Durante la década de 1960 y 1970, fueron identificadas mutaciones naturales de genes de maíz, como opaco-2 (*o2*), fluory-2 (*fl2*), opaco-7 (*o7*), opaco-6 (*o6*) y fluory-3 (*fl3*) que generan variedades con mayores niveles de lisina y triptofano. El gen opaco-2 fue llamado así, porque confiere a los granos una apariencia opaca y amilácea. El genotipo original del maíz portador del gen *o2* está asociado con bajo rendimiento de granos, endospermo blando y calcáreo, alta susceptibilidad a la ruptura y daños causados por plagas y hongos. El maíz opaco-2 posee el gen mutante recesivo (*o2*), que limita la síntesis de zeína y aumenta el contenido de las otras fracciones proteicas como las albúminas y las globulinas. Como resultado, se genera una matriz proteica con diferente distribución de aminoácidos y la duplicación del contenido de Lis y Trp. De esta manera, la expresión de este gen permite que el valor nutricional de este maíz sea superior al maíz normal (Hasjim *et al.*, 2009).

La incorporación de este gen en las variedades maíz se puede lograr mediante cruza y retrocruza dando lugar a nuevas variedades de maíz que poseen cantidades superiores de lisina y triptófano (Tang *et al.*, 2013). Se han realizado investigaciones interdisciplinarias a través de programas de mejoramiento de maíces convencionales aceptables agrónomicamente y nutricionalmente mejorados llamados "Maíz de Alta Calidad de Proteína" (Quality Protein Maize, QPM, por sus siglas en inglés). Los QPM se desarrollaron para las regiones donde el maíz forma parte de la canasta básica de alimentos, y diversos estudios han indicado que dichos maíces han tenido impacto positivo en el aumento de peso de aves y cerdos (Tiwari *et al.*, 2013). En los últimos años el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) ha desarrollado en diferentes regiones de México, semillas de alta calidad genética, fisiológica, sanitaria y física, en combinación con un alto rendimiento y por consecuencia mayor rentabilidad en el proceso de multiplicación de simientes. En especial, han sido dirigidos hacia las áreas marginales del Sureste de México, principalmente, para generar materiales que atiendan el problema de la desnutrición. Entre estas variedades desarrolladas se encuentran el Sac Béh (maíz blanco) y Chichén Itzá (maíz amarillo), las cuales tienen un 75 % de germoplasma criollo y un 25 % del donador de calidad proteínica. También, son de ciclo intermedio tardío, poseen características innatas de los maíces criollos, como su adaptación a las condiciones del sistema roza-tumba-quema o milpa; asimismo, pretenden ser una opción más para mejorar la producción de los campesinos, coadyuvar a satisfacer el requerimiento de maíz anual y mejorar el nivel de vida de las familias (Aguilar-Castillo *et al.*, 2010). Sin embargo, aunque

estas variedades cuentan con características como resistencia a plagas, estrés hídrico y buen desarrollo durante la siembra, mismas que favorecen su uso en el sector agrícola, no se habían caracterizado en cuanto a sus propiedades físico-químicas y a su valor nutrimental. Dicha caracterización es importante debido a que fueron desarrollados para consumo humano con el objetivo de aminorar el efecto de la desnutrición en aquellas zonas de la población donde aún se cultiva el maíz para autoconsumo y que dependen mayormente de este alimento. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue caracterizar química y nutrimentalmente las dos variedades de maíz híbrido Sac Béh y Chichén Itzá desarrollados en el sureste de México.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Granos y harinas

Se utilizaron granos de maíz QPM de las variedades híbridas Sac Béh, Chichén Itzá y dos variedades control, que consistieron en los predecesores nativos de cada variedad, respectivamente, las cuales fueron proporcionadas por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), y cosechadas en Yucatán, México. La caracterización química y nutrimental de las variedades, se realizó a partir de la harina por lo que previamente se llevó a cabo la molienda de los granos. Primero en un molino manual para granos y posteriormente en un molino de impacto ciclónico Cyclotec 1093 Foss (Tecator, Sweeden) para obtener una harina más fina (malla 60, 250  $\mu$ m). Finalmente, las harinas obtenidas se almacenaron a -10 °C hasta la evaluación.

### Composición química proximal

La composición proximal de las harinas de maíz QPM y sus predecesores, fue determinada mediante las metodologías propuestas por la AOAC (2012). La humedad (método 925.10) consistió en el secado de 2 g de muestra en estufa a 110 °C hasta lograr peso constante. Las cenizas (método 923.03) consistió en la incineración de 3-5 g de muestra en una mufla a 550 °C. La grasa cruda (método 2003.06) consistió en la extracción de materia soluble en hexano utilizando un equipo Soxtec (Tecator, Sweeden). El nitrógeno (método 2001.11) se realizó de acuerdo con el método Kjeldahl, usando cobre como catalizador usando el sistema Kjeltex (Tecator, Sweeden). La proteína cruda se expresó con un factor de conversión de nitrógeno a proteína de 6.25. La fibra cruda (método 962.09) se determinó como el residuo orgánico combustible e insoluble después de una digestión ácida y alcalina utilizando un equipo Fibertec (Tecator, Sweeden). Los carbohidratos totales fueron estimados como extracto libre de nitrógeno (ELN) restando a 100 los porcentajes de humedad, ceniza, grasa cruda, proteína cruda y fibra cruda.

### Cuantificación de minerales: Ca, Fe, K, Mg, Na, P

Para la determinación de minerales de las harinas de maíz QPM y sus predecesores, se empleó el método 985.01 de la AOAC (2012) por medio de espectroscopia de emisión



atómica con adaptación de plasma inductivamente acoplado a plasma de microondas (Agilent Technologies, CA, USA). Las muestras se analizaron en el espectrofotómetro con las condiciones específicas para cada elemento: Longitud de onda (nm): Ca, 393.37; Fe, 371.99; K, 766.49; Mg, 285.21; Na, 588.99; P, 213.62; considerando un rango de flujo del nebulizador de 0.9-1.9 L/min, un tiempo de lectura de 3 s, tiempo de estabilización de 15 s, una velocidad de la bomba de 15 rpm y se realizaron tres réplicas por muestra. La cuantificación de los minerales se realizó por el método de estándar externo mediante el uso de curvas de calibración a las concentraciones de 0, 0.5, 1, 3, 5, 7, 10, 13, 15 ppm para cada elemento, para ello se empleó una solución intermedia de 50 ppm que fue elaborada a partir de una solución madre de 500 ppm.

### Perfil de ácidos grasos

El perfil de ácidos grasos de las harinas de maíz QPM y sus predecesores, se determinó de acuerdo con el método 996.06 de la AOAC (2012) por cromatografía de gases capilar posterior a la formación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos (FAMES) usando trifluoruro de boro en metanol. Se utilizó un equipo Agilent Technologies (modelo 7890A, CA, USA), se empleó un inyector Split a una temperatura de 225 °C, el detector a 285 °C y la columna SP2560 a temperatura inicial de 100 °C, usando una rampa de 3°C/min hasta llegar a una temperatura final de 240 °C, donde se mantuvo por 15 min. Se utilizó helio como gas acarreador a una velocidad de flujo 0.75 mL/min, velocidad lineal 18 cm/s y como detector el espectrómetro de masas. Para la identificación de los ácidos grasos en la muestra se empleó el espectro de masas de cada componente eluido y se comparó con el de la biblioteca de espectros del National Institute of Standards and Technology (NIST). Los ácidos grasos se cuantificaron en función del área del pico por el método de normalización del área.

### Perfil de aminoácidos

El perfil de aminoácidos de las harinas de maíz QPM y sus predecesores, se determinó a través del método propuesto por Alaíz *et al.* (1992) por cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC) en fase reversa en un equipo Agilent (Santa Clara CA, USA). Posterior a la derivatización con etoximetilnomalonato de dietilo, a excepción del triptófano que se realizó con tratamiento alcalino y sin derivatización. Los aminoácidos se separaron usando una columna Nova Pack C18 4 µm de 300 mm x 3.9 mm D.I. y un gradiente binario de una solución 25 mM de acetato de sodio con 0.02 % de azida de sodio ajustado a pH 6 (solvente A) y acetonitrilo grado HPLC (solvente B) con un flujo de 0.9 mL/min con el detector UV-Vis a una longitud de onda de 280 nm y a una temperatura de 18°C. La determinación del triptófano se realizó de acuerdo con Yust *et al.* (2004). La cuantificación de los aminoácidos se realizó por el método del estándar interno mediante el uso de curvas de calibración.

### Calidad de la proteína

Se evaluó la calidad de proteína de las harinas de maíz QPM y sus predecesores por medio de la digestibilidad *in vitro*, usando el sistema enzimático tripsina-quimotripsina-peptidasa. Luego considerando el perfil de aminoácidos se obtuvieron parámetros de interés como el cómputo químico, el aminoácido limitante, PDCAAS, C-PER y el VB estimado de la proteína.

Digestibilidad *in vitro* de la proteína. La digestibilidad de la proteína se evaluó por el método propuesto por Hsu *et al.* (1977) por medio del sistema enzimático tripsina porcina (tipo IX Sigma T-0134 con 14.190 unidades BAEE/ mg de proteína), α-quimotripsina (tipo II Sigma C-4129 con 60 unidades /mg de polvo) y peptidasa (grado III Sigma P-75000 con 40 unidades /g de polvo). Se evaluó la actividad usando caseína como referencia.

Puntaje químico y aminoácido limitante. Se calculó de acuerdo con lo propuesto por Friedman (1996) en donde el puntaje químico se obtuvo como el cociente del contenido de cada aminoácido indispensable de la proteína de prueba, entre el contenido del mismo aminoácido en un patrón de referencia establecido por FAO/FINUT (2017). El aminoácido limitante fue el aminoácido esencial en la proteína de estudio, que mostró la mayor diferencia en la concentración del mismo aminoácido en la referencia.

Puntuación de Aminoácidos Corregida con Digestibilidad de Proteínas (PDCAAS). El PDCAAS se calculó como describe Schaafsma (2005) según la siguiente fórmula:

$$PDCAAS (\%) = \frac{\text{mg del primer aminoácido limitante en 1g de proteína de muestra}}{\text{mg de del mismo aminoácido en la proteína de referencia}} \times \text{Digestibilidad} (\%) \quad \text{Ec. 1}$$

Relación de eficiencia de proteína calculada. Los valores de c-PER fueron calculados utilizando la composición de aminoácidos y las ecuaciones desarrolladas por Lee *et al.* (1978):

$$PER_7 = 0.08084 [X_7] - 0.1094$$

$$PER_{10} = 0.06320 [X_{10}] - 0.1539$$

Donde,  $X_7$  es la suma del contenido (g/ 100 g de proteína) de los aminoácidos treonina (Tre), valina (Val), metionina (Met), isoleucina (Ile), leucina (Leu), fenilalanina (Fen) y lisina (Lis), y  $X_{10}$  es la suma de  $X_7$  y los contenidos (g/100 g de proteína) de histidina (His), arginina (Arg) y triptófano (Trp). Ambas ecuaciones son aceptadas para la estimación de c-PER; sin embargo, como se puede observar la ecuación de  $PER_{10}$  podría ser la más apropiada porque involucra una mayor cantidad de aminoácidos para su cálculo.

Valor biológico estimado. El VB estimado fue calculado de acuerdo con Morup y Olesen (1976) utilizando la siguiente ecuación:

$$VB = 10^{2.15} \times Lys^{0.41} \times (Phe + Tyr)^{0.60} \times (Met + Cys)^{0.77} \times Thr^{2.4} \times Trp^{0.21} \quad \text{Ec. 2}$$

Donde cada símbolo de aminoácido representa la relación entre el porcentaje del aminoácido respecto al patrón de referencia de la FAO.

## Diseño y análisis estadístico

La evaluación estadística de los datos se realizó con un análisis de varianza de una vía, empleando una comparación de medias por el método de Duncan para los resultados obtenidos para las dos variedades de maíz mejoradas y las dos variedades predecesoras utilizando el paquete estadístico Statgraphics Centurion XVI.II (Montgomery, 2008).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Composición proximal de las variedades de maíz

La composición proximal de las variedades predecesoras y los QPM se indica en la Tabla 1. La humedad en las variedades mejoradas resultó ser menor ( $p < 0.05$ ) que el de las nativas, lo cual favorecería el almacenamiento de los granos pues podría disminuir el riesgo de aparición de hongos y otro tipo de contaminación microbiana. Es posible afirmar esto puesto que, la norma del maíz para procesos de nixtamalización NMX-FF-034/1-SCFI-2002 establece un límite del 14 % para minimizar dichos efectos. En contraste a otras variedades de maíz, los valores obtenidos fueron menores a los reportados por Gutiérrez *et al.* (2009) para híbridos QPM blanco y amarillo cuyos valores oscilaron entre el 13.6 % y 14.3 % para las variedades H-431, A-Pantera y P-30G54; esto indica que para las variedades en estudio al presentar menos humedad se podría reducir uno de los efectos que sufren los maíces QPM, que comúnmente son susceptibles a plagas y a hongos, en donde el contenido de humedad es un factor determinante.

Comparando los valores de cenizas de cada grano híbrido con su control, no se encontraron diferencias estadísticas ( $p > 0.05$ ). Los valores obtenidos en este estudio fueron ligeramente menores a los obtenidos por Gutiérrez *et al.* (2009) para híbridos QPM cuyos valores estuvieron comprendidos entre 1.6 y 1.7 % para variedades de maíz amarillo y blanco, respectivamente. La cantidad de cenizas

**Tabla 1.** Composición química proximal de las variedades de maíz híbrido y predecesor (% B.S.).

**Table 1.** Proximal chemical composition of the hybrid and predecessor corn varieties (% B.S.).

Variedad	Predecesor Chichén Itzá	Predecesor Sac Béh	Híbrido Chichén Itzá	Híbrido Sac Béh
Humedad	8.48 ± 0.19 <sup>a</sup>	7.69 ± 0.02 <sup>b</sup>	6.68 ± 0.07 <sup>c</sup>	6.77 ± 0.07 <sup>c</sup>
Cenizas	1.36 ± 0.04 <sup>b</sup>	1.50 ± 0.06 <sup>a</sup>	1.29 ± 0.06 <sup>b</sup>	1.49 ± 0.01 <sup>ab</sup>
Grasa cruda	5.01 ± 0.04 <sup>b</sup>	5.05 ± 0.08 <sup>b</sup>	6.93 ± 0.05 <sup>a</sup>	7.07 ± 0.15 <sup>a</sup>
Proteína cruda	10.78 ± 0.20 <sup>b</sup>	9.77 ± 0.03 <sup>c</sup>	11.12 ± 0.01 <sup>a</sup>	11.37 ± 0.02 <sup>a</sup>
Fibra cruda	3.09 ± 0.04 <sup>a</sup>	2.87 ± 0.04 <sup>a</sup>	2.42 ± 0.22 <sup>a</sup>	2.71 ± 0.029 <sup>a</sup>
ELN*	79.76 ± 0.09 <sup>b</sup>	80.81 ± 0.20 <sup>a</sup>	78.24 ± 0.12 <sup>c</sup>	77.36 ± 0.43 <sup>d</sup>

<sup>a-d</sup> Letras diferentes en la misma fila indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). Los valores son promedios ± desviación estándar. \* ELN (Extracto Libre de Nitrógeno).

de la variedad amarilla Chichén Itzá (1.3 %) en comparación con otras variedades amarillas locales del estado de Yucatán en México fue menor al de Xmejen nal (1.7 %), T'síit bakal (1.5 %) e Xnuuk nal (1.6 %). La variedad Sac Béh con 1.5 % de ceniza comparado con variedades de maíz blanco fue mayor que la variedad *Nal t'eel* (1.4 %), similar a Xmejen nal (1.5 %) e Xnuuk nal (1.5 %) y menor que T'síit bakal (1.8 %) (Cázares *et al.*, 2015).

Respecto al contenido de fibra cruda, no se encontraron diferencias estadísticas significativas ( $p > 0.05$ ), indicando que no existieron cambios en cuanto a la proporción de este componente entre las variedades estudiadas, que en promedio fue 2.7 %. Los valores hallados fueron mayores a los reportados por Cázares *et al.* (2015) para variedades blancas y amarillas nativas de Yucatán (*Nal t'eel*, Xmejen nal, T'síit bakal e Xnuuk nal) con contenidos menores al 2 %, indicando que el consumo de éstos maíces, aportarán más fibra que otras variedades de la misma región con los beneficios fisiológicos y metabólicos que tiene el consumo de éste componente alimentario.

Para el contenido de grasa se encontró que los maíces híbridos fueron estadísticamente iguales entre ellos ( $p > 0.05$ ), pero superiores a sus variedades predecesoras, teniendo estos últimos valores de 5 % semejantes a los reportados para maíz normal cuyo contenido ha sido reportado entre el 3-5 % (Gutiérrez *et al.*, 2009; Sanjeev *et al.*, 2014; Mohammad *et al.*, 2018). Las variedades híbridas en cambio incrementaron el contenido de grasa a un 7 % que resultaron ser mayores a los encontrados por Gutiérrez *et al.* (2009) que obtuvo 5 % para dos híbridos blancos y 4.39 % para un híbrido amarillo. Esto posiblemente fue resultado del efecto del desarrollo del gen opaco-2, lo cual podría ser beneficioso para la salud debido a la composición de ácidos grasos presentes en los lípidos del maíz.

Los resultados de proteína mostraron diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre los granos híbridos y sus respectivos predecesores nativos. En el caso del Chichén Itzá presentó un incremento de 0.34 % entre el nativo y el híbrido y en el caso de Sac Béh incrementó 1.6 %. Con respecto a otras variedades nativas, los porcentajes obtenidos se encuentran entre valores aceptables, pues en el estudio realizado por Cázares *et al.* (2015) se reportaron porcentajes de proteína que comprendían entre el 9.3 y 12.5 % para las variedades blancas y amarillas de *Nal t'eel*, Xmejen nal, T'síit bakal e Xnuuk nal. Los híbridos del presente estudio demostraron un mayor contenido de proteína en comparación al estudio realizado por Gutiérrez *et al.* (2009) en donde los híbridos QPM comprendían valores entre 8.2 y 9.4 %.

El maíz predecesor del Chichén Itzá (amarillo) presentó 79.76 % de carbohidratos, porcentaje similar a la variedad Xmejen nal (80.66 %) y menor a T'síit bakal (82.12 %) e Xnuuk nal (82.76 %) que son nativas de Yucatán, México. Por otra parte, el híbrido Chichén Itzá presentó valores menores a las variedades anteriormente mencionadas con 78.23 %. La variedad predecesora del maíz Sac Béh (blanco) presentó 80.81% de carbohidratos, similar a Xmejen nal (81.11 %) y

menor a Nal t'eel (82.23 %), T'siit bakal (83.21 %) e Xnuuk nal (82.63 %), en cambio el híbrido Sac Beh presentó un 77.35 %, el cual fue menor a las variedades blancas mencionadas con anterioridad (Cázares *et al.*, 2015). Los valores inferiores obtenidos para los híbridos pueden explicarse debido a que el aumento de lípidos y proteína tiene un efecto contrario en la cantidad de almidón de los granos de maíz, estimados en el ELN.

Al comparar la composición proximal en la conversión de variedades de maíz nativo a maíz QPM, se encontró principalmente tendencias a un aumento del contenido de grasa y disminución de carbohidratos (Tabla 1), se ha reportado por Val *et al.* (2009) que aquellas variedades que poseen mayor contenido de aceite generalmente poseen mayores cantidades de proteína y lisina. Se podría asociar que con la modificación con el gen opaco-2, se logra un incremento en el contenido de aceite, y específicamente en los maíces Sac Béh y Chichén Itzá también presentaron un aumento en proteína comparado con su origen nativo, por lo que la redistribución en la composición químico proximal fue un indicativo que se logró la conversión de las variedades nativas.

### Minerales Ca, Fe, K, Mg, Na, P

En la tabla 2 se presenta el contenido de minerales hallado en las variedades de maíz Sac Béh y Chichén Itzá, donde a excepción de Fe y Mg, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ) entre las variedades híbridas y nativas.

Los principales minerales del maíz fueron P, K y Mg al ser los más abundantes en el grano, puesto que generalmente se encuentran como sales de ácido fítico, y los elementos menos abundantes fueron Na, Ca y Fe al estar en cantidades mínimas; sin embargo, el contenido de Ca suele incrementarse después del proceso de nixtamalización donde se emplea CaO (Gwartz y García, 2014). El contenido mineral de las va-

riedades en estudio presentó similitudes con la composición de los minerales mayoritarios P, K y Mg hallado por Bódi *et al.* (2008) para maíz rojo y azul, no siendo de la misma manera para los demás elementos como Ca, Fe y Na. Para maíz rojo, estos autores reportan 310.56 mg/100 g para P, 264.78.8 mg/100 g para K y 101.81 mg/100g para Mg. En tanto, el contenido de Ca para las variedades amarillas y blancas de este estudio fueron menores respecto a lo reportado (12.69 mg/100g). También se observa un mayor contenido de Na en las variedades de dicho estudio con 12.8 mg/100 g y por último, en el caso de Fe (3.58 mg/100 g) sólo las variedades híbridas y el nativo Chichén Itzá fueron similares, pues el nativo Sac Béh resultó con mayor contenido. En comparación con las variedades de maíz azul (Bódi *et al.*, 2008), se observó la misma tendencia con respecto a lo reportado para P y K (352.77 y 314.82 mg/100 g, respectivamente). Para Mg se observó una cantidad ligeramente menor en los maíces en estudio respecto a lo reportado (121.96 mg/100g), en tanto el contenido de Ca resultó menor a lo hallado con 11.63 mg/100g. Los niveles de Na resultaron mayores a los de dicho estudio (13.97 mg/100 g) y en caso del Fe se observa el mismo comportamiento comparado a lo reportado.

Sólo la variedad nativa Sac Béh presentó mayor contenido de Fe y Na en comparación del resto que resultaron ser estadísticamente iguales entre sí ( $p > 0.05$ ). Dicho comportamiento podría ser explicado con base en lo señalado por Menkir (2008) y Martínez *et al.* (2017) respecto a que el contenido mineral depende de la genética, ya que los nutrientes difieren de una variedad a otra, y probablemente de las condiciones ambientales en las que se encuentran cultivadas como los nutrientes del suelo. Se puede suponer que al estar en las mismas condiciones se obtuvo un contenido mineral similar.

### Perfil de ácidos grasos

Los híbridos Chichén Itzá y Sac Béh, al presentar un contenido de aceite superior al 6 % pueden ser considerados como maíz de alto aceite (HOC por sus siglas en inglés de High-Oil Corn). Algunas características importantes observadas en las variedades HOC son su mayor contenido de proteína y mayor cantidad de algunos aminoácidos esenciales como Lys, Thr y Met (Singh *et al.*, 2013; Preciado *et al.*, 2018). El aumento de grasa indica que puede haber cambios en la composición de ácidos grasos, como lo observado en la tabla 3, en donde hay un aumento en el total de ácidos grasos insaturados y por consiguiente una disminución en los ácidos grasos saturados. De manera específica se observó menor contenido de ácido palmítico para Sac Béh y Chichén Itzá. En el caso de Sac Béh también se da el mismo efecto para el ácido esteárico; por el contrario, se aprecia mayor contenido de ácido oleico indicando que el efecto del gen opaco-2 o más bien con el mejoramiento genético de las variedades, se podrían dar cambios en la síntesis de ácidos grasos en el grano que involucran mayormente al ácido palmítico y oleico. Por otra parte, los ácidos grasos insaturados de mayor interés fueron el ácido linoleico y linolénico y de manera general

**Tabla 2.** Contenido de minerales (mg/100 g) de las variedades de maíz híbrido y predecesor.

**Table 2.** Minerals content (mg / 100 g) of the hybrid and predecessor maize varieties.

Muestra	Predecesor Chichén Itzá	Predecesor Sac Béh	Híbrido Chichén Itzá	Híbrido Sac Béh
Ca	8.80±0.51 <sup>a</sup>	9.96±2.49 <sup>a</sup>	10.29±2.52 <sup>a</sup>	9.45±0.55 <sup>a</sup>
Fe	3.65±0.03 <sup>b</sup>	5.15±0.51 <sup>a</sup>	4.03±0.30 <sup>b</sup>	4.28±0.67 <sup>b</sup>
K	255.74±8.12 <sup>a</sup>	299.35±29.17 <sup>a</sup>	261.61±8.85 <sup>a</sup>	268.78±27.47 <sup>a</sup>
Mg	100.99±4.07 <sup>a</sup>	106.20±1.61 <sup>a</sup>	108.11±3.68 <sup>a</sup>	103.94±3.32 <sup>a</sup>
Na	35.06±1.60 <sup>b</sup>	54.55±3.13 <sup>a</sup>	41.51±6.40 <sup>b</sup>	37.22±4.02 <sup>b</sup>
P	337.56±8.04 <sup>a</sup>	352.72±0.34 <sup>a</sup>	337.09±15.96 <sup>a</sup>	334.90±12.39 <sup>a</sup>

<sup>a-b</sup> Letras diferentes en la misma fila indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). Los valores son promedios ± desviación estándar, Ca: Calcio, Fe: Hierro, K: Potasio; Mg: Magnesio, Na: Sodio, P: Fósforo

**Tabla 3.** Perfil de ácidos grasos de las variedades de maíz híbrido y predecesor.  
**Table 3.** Fatty acid profile of the hybrid and predecessor maize varieties.

Ácido graso (%)	Abreviatura	Predecesor Chichén Itzá	Predecesor Sac Béh	Híbrido Chichén Itzá	Híbrido Sac Béh
Ac. Palmítico	C16:0	20.14±0.58 <sup>a</sup>	19.52±0.73 <sup>ab</sup>	18.34±0.26 <sup>b</sup>	18.49±0.10 <sup>b</sup>
Ac. Palmitoleico	C16:1	0.08±0.00 <sup>b</sup>	0.08±0.01 <sup>b</sup>	0.06±0.01 <sup>c</sup>	0.10±0.01 <sup>a</sup>
Ac. Margárico	C17:0	0.09±0.01 <sup>a</sup>	0.08±0.01 <sup>ab</sup>	0.07±0.01 <sup>bc</sup>	0.05±0.01 <sup>c</sup>
Ac. Esteárico	C18:0	5.26±0.17 <sup>a</sup>	5.00±0.19 <sup>a</sup>	5.03±0.21 <sup>a</sup>	4.21±0.11 <sup>b</sup>
Ac. Oleico	C18:1	33.77±0.34 <sup>b</sup>	31.70±0.70 <sup>c</sup>	35.88±0.29 <sup>a</sup>	33.65±0.16 <sup>b</sup>
Ac. Linoleico	C18:2	38.53±0.08 <sup>b</sup>	41.52±0.33 <sup>a</sup>	38.64±0.26 <sup>b</sup>	41.87±0.37 <sup>a</sup>
Ac. Araquidíco	C20:0	0.62±0.02 <sup>a</sup>	0.64±0.01 <sup>a</sup>	0.65±0.01 <sup>a</sup>	0.54±0.04 <sup>b</sup>
Ac. Eicosenoico	C20:1	0.18±0.01 <sup>a</sup>	0.15±0.03 <sup>a</sup>	0.16±0.04 <sup>a</sup>	0.12±0.01 <sup>a</sup>
Ac. Linolénico	C18:3	0.84±0.04 <sup>a</sup>	0.82±0.03 <sup>a</sup>	0.78±0.05 <sup>a</sup>	0.66±0.01 <sup>b</sup>
Ac. Behénico	C22:0	0.20±0.05 <sup>a</sup>	0.20±0.02 <sup>a</sup>	0.17±0.01 <sup>a</sup>	0.15±0.01 <sup>a</sup>
Ac. Lignocérico	C24:0	0.29±0.03 <sup>a</sup>	0.29±0.04 <sup>a</sup>	0.23±0.01 <sup>ab</sup>	0.18±0.01 <sup>b</sup>
SFA		26.60±0.30 <sup>a</sup>	25.74±0.97 <sup>ab</sup>	24.48±0.46 <sup>bc</sup>	23.61±0.23 <sup>c</sup>
MUFA + PUFA		73.40±0.30 <sup>ac</sup>	74.26±0.97 <sup>bc</sup>	75.52±0.46 <sup>ab</sup>	76.39±0.23 <sup>a</sup>
MUFA		34.03±0.34 <sup>ab</sup>	31.93±0.67 <sup>c</sup>	36.10±0.24 <sup>a</sup>	33.86±0.15 <sup>b</sup>
PUFA		39.37±0.03 <sup>ab</sup>	42.34±0.30 <sup>a</sup>	39.42±0.21 <sup>b</sup>	42.53±0.38 <sup>a</sup>

<sup>a-c</sup> Letras diferentes en la misma fila indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). Los valores son promedios  $\pm$  desviación estándar SFA= Ácidos grasos saturados, MUFA=ácidos grasos monoinsaturados, PUFA=ácidos grasos poliinsaturados.

permanecieron sin cambios, a excepción en el linolénico específicamente en la variedad Sac Béh que disminuyó un 20 %.

Ignjatovic *et al.* (2015) determinaron el perfil de ácidos grasos de variedades de maíz con alto contenido de aceite encontrando valores en común con los híbridos del presente estudio, salvo la diferencia en contenido de ácido palmítico y esteárico. En dicho estudio, se encontró entre 1.5-3.3 % de ácido palmítico y de 9-13 % de ácido esteárico valores inferiores a los encontrados en las variedades Chichén Itzá y Sac Béh; el contenido de los ácidos oleico, linoleico y linolénico oscilaron entre los valores de 23.9-45.2 %, 40-62 % y 0.52-0.82 % respectivamente semejantes a los resultados encontrados a los materiales del presente estudio. Los autores también reportaron ácidos grasos trazas como el palmitoleico, margárico, araquidíco, eicosenoico, behénico, lignocérico y eicosatrienoico. En un estudio realizado por Sanjeev *et al.* (2014) se encontró el perfil de ácidos grasos de variedades de maíz, en donde se destaca un grupo de híbridos QPM que contenían 15.14 % de ácido palmítico, 3.85 % de ácido esteárico, 33.54 % de ácido oleico y 44.19 % de ácido linoleico, lo cual indica que los híbridos y nativos de este estudio presentan mayor

contenido de los ácidos palmítico y esteárico, un contenido similar de ácido oleico y menor cantidad de ácido linoleico lo cual puede ser debido a la variedad.

El contenido de ácidos grasos insaturados resultó ser estadísticamente diferente ( $p < 0.05$ ) y se observó un aumento en las variedades híbridas, principalmente en MUFA donde se encontró diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre variedades y resultando mayores en los híbridos; por otra parte, las variedades Sac Béh y Chichén Itzá mantuvieron sus niveles de PUFA cuando se dio la conversión a QPM. Lo anterior es de beneficio para la salud ya que la FAO recomienda que es mejor consumir PUFA y MUFA en lugar de SFA para mejorar los niveles de colesterol HDL y prevenir enfermedades coronarias, además de que el ácido linoleico y linolénico (PUFA) son esenciales para el ser humano, es decir que no pueden ser sintetizados por el organismo humano y tienen efectos positivos para el crecimiento y desarrollo de los infantes; por otra parte, aunque el ácido esteárico (SFA) que tiene una abundancia de 5%, no afecta a la salud de manera negativa, pues existe evidencia de que no incrementa los niveles de colesterol asociado a las LDL.



**Perfil de aminoácidos**

El perfil de aminoácidos de los híbridos Chichén Itzá y Sac Béh, con sus respectivos controles (Tabla 4), puso en evidencia cambios estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ) por efecto del gen *opaco-2*. Se observó un aumento en el contenido de ciertos aminoácidos, como el caso de la His en la variedad híbrida Chichén Itzá que incrementó de forma significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto a su predecesor, de igual forma la Ile aumentó de forma significativa ( $p < 0.05$ ) aproximadamente 10 veces su valor en ambas variedades híbridas. Efecto similar ocurrió con la Fen ya que aumentó 13 veces en la variedad Chichén Itzá y 7 veces en la variedad Sac Béh lo cual mejora con respecto a la relación con la Tir, el cual es un aminoácido no esencial y que puede ser sintetizado a partir de Fen según Shewry (2007).

En cuanto a los aminoácidos Lis y Trp, se observaron cambios positivos al aumentar la Lis casi el doble y el Trp 10 veces más en comparación de lo que se halló en las variedades predecesoras. Lo anterior indica que las variedades híbridas cuentan con un mejor contenido de la mayoría de los aminoácidos esenciales respecto a las variedades predecesoras, por tanto, tienen una proteína de mejor calidad.

Este resultado es importante a pesar de que disminuyó el contenido de Val en un 29 % en la variedad Chichén Itzá y en un 88% en la variedad Sac Béh.

Lisina aumentó 1.8 en el maíz QPM, cubriendo casi el 50% del patrón de referencia de la FAO. En el caso de Trp, la concentración aumentó 8 veces en el híbrido Chichén Itzá y 12 veces en Sac Béh con respecto a sus predecesores, cubriendo así el 29.4 % y el 41.2 % del patrón de referencia respectivamente. El aumento de Lis y Trp pudiera atribuirse al desarrollo del gen *opaco-2*, el cual, inhibe de la síntesis de zeínas, que contienen en cantidades mínimas de ambos aminoácidos, principalmente Trp. De igual manera el gen *opaco-2* promueve la síntesis de otras fracciones proteicas (albúminas, globulinas y glutelinas), de tal forma que duplican el contenido de Lis y aumentan la cantidad de Trp en el grano (Shewry, 2007; Li y Vassal, 2010).

En contraste con otras variedades nativas del estado de Yucatán, se observa que la cantidad de Lis en los híbridos (2.54 g de AA/100 g de proteína Chichén Itzá y 2.72 g de AA/100 g de proteína Sac Béh) fue menor a la reportada por Cazáres *et al.* (2015) para las variedades nativas del estado de Yucatán Nal t'ee (2.78 g de AA/100 g de proteína), Xmejen

**Tabla 4.** Perfil de aminoácidos (g de AA/ 100g de proteína) de las variedades de maíz híbrido y predecesor.

**Table 4.** Amino acid profile (g of AA / 100g of protein) of the hybrid and predecessor maize varieties.

Aminoácido	Predecesor Chichén Itzá	Predecesor Sac Béh	Híbrido Chichén Itzá	Híbrido Sac Béh	Patrón FAO*
Histidina	1.72±0.09 <sup>c</sup>	7.45±0.24 <sup>a</sup>	2.60±0.12 <sup>b</sup>	2.48±0.14 <sup>b</sup>	2
Treonina	7.80±0.01 <sup>a</sup>	4.49±0.23 <sup>c</sup>	4.45±0.41 <sup>c</sup>	5.26±0.24 <sup>b</sup>	3.1
Valina	2.22±0.16 <sup>b</sup>	10.48±0.07 <sup>a</sup>	1.57±0.22 <sup>c</sup>	1.33±0.05 <sup>c</sup>	4.3
Metionina	13.01±0.09 <sup>a</sup>	7.21±0.25 <sup>c</sup>	10.26±0.36 <sup>b</sup>	6.37±0.13 <sup>d</sup>	-
Isoleucina	0.36±0.01 <sup>b</sup>	0.25±0.05 <sup>b</sup>	2.98±0.41 <sup>a</sup>	2.67±0.23 <sup>a</sup>	3.2
Leucina	11.79±0.05 <sup>a</sup>	8.78±0.27 <sup>d</sup>	11.01±0.01 <sup>b</sup>	10.07±0.20 <sup>c</sup>	6.6
Fenilalanina	0.33±0.01 <sup>b</sup>	0.57±0.18 <sup>b</sup>	4.42±0.99 <sup>a</sup>	3.87±0.25 <sup>a</sup>	-
Lisina	1.38±0.11 <sup>b</sup>	1.49±0.02 <sup>b</sup>	2.54±0.16 <sup>a</sup>	2.72±0.14 <sup>a</sup>	5.7
Triptófano	0.03±0.006 <sup>c</sup>	0.03±0.002 <sup>c</sup>	0.25±0.004 <sup>b</sup>	0.35±0.006 <sup>a</sup>	0.85
Cistina	3.54±0.73 <sup>a</sup>	3.05±0.14 <sup>ab</sup>	3.34±0.07 <sup>a</sup>	2.44±0.03 <sup>b</sup>	-
Tirosina	5.91±0.45 <sup>a</sup>	4.37±0.22 <sup>b</sup>	1.95±0.14 <sup>c</sup>	1.67±0.04 <sup>c</sup>	-
SAA	16.55±0.81 <sup>a</sup>	10.26±0.38 <sup>c</sup>	13.6±0.42 <sup>b</sup>	8.81±0.16 <sup>d</sup>	2.7
AAA	6.24±0.17 <sup>a</sup>	4.94±0.09 <sup>b</sup>	6.37±0.23 <sup>a</sup>	5.54±0.31 <sup>ab</sup>	5.2
AAE	48.08±1.72 <sup>a</sup>	48.17±1.50 <sup>a</sup>	45.36±1.89 <sup>c</sup>	39.24±1.50 <sup>d</sup>	
Arginina	5.59±0.28 <sup>c</sup>	1.44±0.06 <sup>d</sup>	14.47±0.85 <sup>a</sup>	8.39±0.10 <sup>b</sup>	
Serina	6.05±0.13 <sup>c</sup>	7.71±0.13 <sup>b</sup>	4.02±0.12 <sup>d</sup>	10.70±0.22 <sup>a</sup>	
Ac. Aspártico	19.08±0.48 <sup>a</sup>	9.07±0.43 <sup>c</sup>	11.79±0.93 <sup>b</sup>	8.92±0.37 <sup>c</sup>	
Ac. Glutámico	10.89±0.38 <sup>a</sup>	10.50±0.33 <sup>a</sup>	8.10±0.17 <sup>b</sup>	3.20±0.13 <sup>c</sup>	
Glicina	1.41±0.11 <sup>d</sup>	1.86±0.11 <sup>c</sup>	2.42±0.18 <sup>b</sup>	3.08±0.15 <sup>a</sup>	
Alanina	0.40±0.08 <sup>c</sup>	8.22±0.65 <sup>b</sup>	0.49±0.27 <sup>c</sup>	11.76±0.15 <sup>a</sup>	
Prolina	8.50±0.22 <sup>b</sup>	13.03±1.55 <sup>a</sup>	13.35±1.03 <sup>a</sup>	14.72±0.13 <sup>a</sup>	
AANE	51.91	51.83	54.64	60.76	
Total	100	100	100	100	

SAA= Aminoácidos azufrados (Met+Cis), AAA= Aminoácidos aromáticos (Fen+Tir), AAE=Total de aminoácidos esenciales según el patrón FAO/ONU/WHO, AANE=Total de aminoácidos no esenciales. Los valores son promedios ± desviación estándar <sup>a-d</sup> Letras diferentes dentro de la misma fila indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). \*Patrón FAO/WHO/ONU 2007 para niños de 6 meses a 3 años.

nal (2.92 g de AA/100 g de proteína), T'sít bakal (2.97 g de AA/100 g de proteína) e Xnuuk nal (2.97 g de AA/100 g de proteína), pero mayor a las predecesoras nativas Chichén Itzá (1.38 g de AA/100 g de proteína) y Sac Béh (1.49 g de AA/100 g de proteína). Por otra parte, el contenido de Trp fue menor al hallado en el estudio de Cazáres *et al.* (2015) cuyos valores fueron de 0.85 a 0.95 g de AA/100 g de proteína, pero mayor al de los predecesores. En un estudio realizado por Mendoza *et al.* (2006) para variedades QPM, se presentan cantidades de Lis similares a variedades QPM blanco denominadas QPMV<sub>5</sub> y QPMV<sub>6</sub> con 2.46 y 2.30 g de AA/100 g de proteína, y valores mayores al de maíz normal V<sub>1</sub> blanco con 2.05 g de AA/100 g de proteína y V<sub>2</sub> amarillo 1.64 g de AA/100 g de proteína, mostrando mejora sobre maíz normal, al igual que en este estudio. En el caso de Trp, los híbridos de este estudio presentan menores cantidades que incluso las variedades normales V<sub>1</sub> 0.41 y V<sub>2</sub> 0.44 g de AA/100 g de proteína; sin embargo, aunque se observó una mejora en las variedades Sac Béh y Chichén Itzá, es necesario realizar más esfuerzos en la búsqueda de amentar la calidad de la proteína del grano.

La modificación de las proteínas del endospermo (y con ello el perfil de aminoácidos) se puede ver gracias al desarrollo del gen *opaque-2*, resultando en la reducción de proteínas tipo zeína y por tanto produciendo mayores cantidades de Lis y Trp. De igual forma al haber una redistribución en el perfil de aminoácidos, se puede hipotetizar que se dio un aumento en el contenido de proteínas no-zeínas que contienen mayores concentraciones de estos aminoácidos esenciales y de otros como Ile y Fen.

### Calidad de la proteína

Digestibilidad "*in vitro*" de proteínas. Los resultados indicaron que hubo diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre las cuatro variedades evaluadas. De igual forma se encontró un incremento en la digestibilidad de aproximadamente 4 % en cada variedad híbrida con respecto a su variedad predecesora nativa. La variedad Chichén Itzá presentó un incremento en la digestibilidad de 71.14 a 75.15 % y Sac Béh de 72.07 a 76.48 % al pasar de nativo a QPM. Esto indica que adicional a la mejora de la calidad de proteína por el contenido de aminoácidos, también se mejoró la digestibilidad que se tiene de éstos. Asimismo, dicho valor debe incrementar cuando se sometan a procesos tecnológicos de transformación como cocción, nixtamalización o extrusión de los granos.

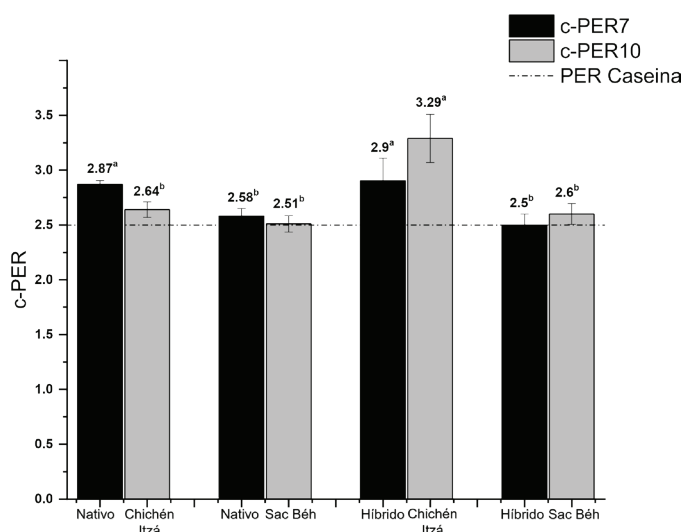
El porcentaje de digestibilidad "*in vitro*" hallado en este estudio para la variedad híbrida Chichén Itzá fue similar al reportado por Gutiérrez *et al.* (2009) para harina cruda de maíz QPM con un valor de 75.48 %, y en caso de Sac Béh resultó ser mayor que en ese mismo estudio. En comparación a otro estudio realizado Cuevas *et al.* (2006) para harina de maíz QPM, ambas variedades presentan valores menores de digestibilidad, pues en ese estudio se obtuvo una digestibilidad "*in vitro*" de 78.06 %. El aumento en la digestibilidad pudo deberse a una disminución de las proteínas tipo zeína, que son hidrofóbicas y menos digeribles por sistemas enzimáticos como la pepsina y tripsina/quimotripsina, por lo

cual, al aumentar las proteínas no-zeína que son más digeribles (principalmente las albúminas y globulinas del maíz) se observa una mayor digestibilidad en los híbridos que en las nativas ricas en zeína (Kriz, 2009).

Cómputo Químico. Se observó que las variedades híbridas cubrieron mejor los requerimientos del estándar FAO/WHO/ONU para niños de 6 meses a 3 años (Tabla 5). Esta afirmación es posible para las variedades híbridas Sac Béh y Chichén Itzá, pues se encontró que los aminoácidos His, Leu, aminoácidos azufrados, aminoácidos aromáticos y Tre se cubren en 100 %. En la variedad Chichén Itzá se logró un aumento del 86% al 100% en His al convertirse a QPM; este aumento en el cómputo químico fue muy evidente en Ile, ya que el maíz nativo Chichén Itzá pasó de cubrir el 11.25 % de las necesidades nutrimentales a 91.14 % con el maíz híbrido de esa variedad; y de 7.81 % a 85.53% del nativo al híbrido del Sac Béh. Por otra parte, se observa que el contenido de Val para Chichén Itzá y Sac Béh no se cubre al igual que ocurre con Lis y Trp.

Puntaje de aminoácidos corregido con digestibilidad de proteínas (PDCAAS). Los valores del PDCAAS es uno de los métodos recomendados por la FAO para evaluar la calidad de una proteína, ya que indican el aprovechamiento de los aminoácidos, principalmente los limitantes (Schaarfsma, 2005). El aminoácido limitante en las variedades predecesoras nativas Sac Béh y Chichén Itzá, así como en el híbrido Chichén Itzá fue el Trp. En caso del híbrido Sac Béh fue Val el aminoácido limitante, mismo que normalmente es cubierto para otras variedades de maíz. Gutiérrez *et al.* (2008) reportan un valor de PDCAAS de 54.2 % para la variedad QPM V-537 y 27 % para la harina de maíz comercial, siendo Lis el aminoácido limitante en ambos casos. Ambos valores reportados fueron superiores a los reportados en este estudio con 22.10 y 23.66 % para Sac Béh y Chichén Itzá QPMs, por lo que se puede decir que, a pesar del aumento de Lis y Trp en los híbridos, no logran satisfacer los requerimientos del patrón, ni presentan valores de PDCAAS mayores a otros híbridos QPM como V-537. Sin embargo, es evidente la mejora del PDCAAS ya que dichos valores fueron 9 veces mayores en las variedades híbridas con respecto a las nativas (2.51-2.54 %). Aunque el puntaje para el caso de Trp en los híbridos cubre cerca del 29 % y 41 % para Chichén Itzá y Sac Béh respectivamente, el aprovechamiento de este aminoácido se ve afectado por la digestibilidad, factor que influye en la utilización de la proteína y por ende de todos los aminoácidos que la conforman. De igual forma lo hallado indica que se requieren más esfuerzos en busca de mejorar los niveles de Lis, Trp y Val en estas variedades, pues el maíz es un alimento básico en las comunidades rurales y se debe tomar en cuenta el PDCAAS como parámetro para determinar si se está cubriendo el objetivo de satisfacer las necesidades nutrimentales en cuanto al requerimiento de proteínas.

Relación de eficiencia de proteína calculada (c-PER). En la Figura 1 se observan los resultados obtenidos de PER<sub>7</sub> y PER<sub>10</sub> que surgieron a partir de las ecuaciones de Lee *et al.* (1978).



**Figura 1.** Valores de PER<sub>7</sub> y PER<sub>10</sub> para las variedades de maíz híbrido y predecesor. <sup>a-b</sup> Letras diferentes indican diferencia significativa.

**Figure 1.** PER<sub>7</sub> and PER<sub>10</sub> values for hybrid and predecessor maize varieties. <sup>a-b</sup> Different letters indicate significant difference.

Los valores obtenidos para PER<sub>7</sub> resultaron ser estadísticamente iguales ( $p > 0.05$ ) debido probablemente a que esta ecuación toma en cuenta la sumatoria del contenido de siete aminoácidos esenciales sin considerar la proporción entre ellos. En el caso de PER<sub>10</sub>, la variedad híbrida Chichén Itzá obtuvo un mayor valor sobre la nativa, lo cual puede atribuirse al aumento en la concentración de Arg, His y Trp observados en el perfil de aminoácidos (Tabla 4). Por otra parte, los valores de PER<sub>10</sub> en Sac Béh resultaron ser estadísticamente iguales ( $p > 0.05$ ) entre la variedad híbrida y la nativa.

Los valores c-PER hallados en este estudio indican que son proteínas de buena calidad al ser superiores al valor de la caseína cuya PER es de 2.5 (patrón de referencia), pues un valor por encima de 2 se considera proteína de alta calidad y uno por debajo de 1.5 se considera de baja calidad (Zengin *et al.*, 2012); además, los valores de este estudio fueron superiores a los hallados por Gutiérrez *et al.* (2008) para la variedad QPM V-537 cuyo valor de PER fue de 2.47.

Valor biológico (VB) estimado de la proteína. La conversión de las variedades a QPM indujo un cambio positivo en cuanto a este parámetro, duplicando su valor. Las variedades predecesoras resultaron ser estadísticamente iguales entre sí, pero con valores menores respecto de las variedades híbridas, pues se encontró un aumento del VB en los maíces híbridos, pasando de 37.56 % a 78.63 % en la variedad Chichén Itzá y en Sac Béh de 39.15 % a 86.55 %, al darse la conversión a QPM. Este comportamiento fue el esperado ya que reportes como los de Upadyay *et al.* (2000); Tang *et al.* (2013) e Ignjatovic *et al.* (2015), indican que al convertir una variedad de maíz normal a QPM, aumenta su valor biológico aproximadamente de 45 % a 80 %, comportamiento similar observado para estas variedades. Podría atribuirse que el cambio observado en las variedades de estudio en el VB se debe a la redistribución de la proporción de aminoácidos esenciales que se observó en la tabla 5, principalmente por mayor cantidad de Lis y Trp en Chichén Itzá y mayor cantidad de aminoácido aromáticos, Lis y Trp en Sac Béh dando evidencia que junto con la incorporación del gen *opaque-2* se dieron efectos positivos en la calidad de la proteína.

**Tabla 5.** Cómputo químico y su relación con aminoácidos esenciales de las variedades de maíz híbrido y predecesor.

**Table 5.** Chemical score and its relation to essential amino acids in native and hybrid maize varieties.

Aminoácido (g AA/100g de proteína)	Niños 0.5 - 3 años*	Predecesor Chichén Itzá CQ (%)	Predecesor Sac Béh CQ (%)	Híbrido Chichén Itzá CQ (%)	Híbrido Sac Béh CQ (%)
Histidina	2.0	86.00±4.50 <sup>b</sup>	100.00±0.00 <sup>a</sup>	100.00±0.00 <sup>a</sup>	100.00±0.00 <sup>a</sup>
Isoleucina	3.2	11.25±0.31 <sup>b</sup>	7.81±1.53 <sup>c</sup>	93.14±9.99 <sup>a</sup>	83.53±7.16 <sup>a</sup>
Leucina	6.6	100.00±0.00 <sup>a</sup>	100.00±0.00 <sup>a</sup>	100.00±0.00 <sup>a</sup>	100.00±0.00 <sup>a</sup>
Lisina	5.7	24.21±1.91 <sup>b</sup>	26.14±0.28 <sup>b</sup>	44.56±2.7 <sup>a</sup>	47.72±2.44 <sup>a</sup>
SAA	2.7	100.00±0.00 <sup>a</sup>	100.00±0.00 <sup>a</sup>	100.00±0.00 <sup>a</sup>	100.00±0.00 <sup>a</sup>
AAA	5.2	100.00±0.00 <sup>a</sup>	95.00±4.52 <sup>b</sup>	100.00±0.00 <sup>a</sup>	100.00±0.00 <sup>a</sup>
Treonina	3.1	100.00±0.00 <sup>a</sup>	100.00±0.00 <sup>a</sup>	100.00±0.00 <sup>a</sup>	100.00±0.00 <sup>a</sup>
Triptófano	0.85	3.53±0.71 <sup>c</sup>	3.53±0.24 <sup>c</sup>	29.41±0.47 <sup>b</sup>	41.18±0.71 <sup>a</sup>
Valina	4.3	51.63±3.81 <sup>b</sup>	100.00±0.00 <sup>a</sup>	36.51±5.25 <sup>c</sup>	30.93±1.21 <sup>c</sup>

AA=Aminoácido, CQ=Cómputo químico, SAA=Aminoácidos azufrados, AAA=Aminoácidos aromáticos. \*Patrón FAO/ONU/WHO 2007. <sup>a-c</sup> Letras diferentes dentro de la misma fila indican diferencia significativa. Los valores son promedios ± desviación estándar.

## CONCLUSIONES

La incorporación del gen opaco-2 tuvo efectos sobre las características químicas y nutrimentales de las variedades de maíz híbrido Sac Béh y Chichén Itzá desarrollados en la Península de Yucatán en México. Se incrementó la cantidad de proteína y en mayor medida el contenido de aceite hasta cerca de 7 %, para ser considerados como "High-Oil Corn". Los minerales mayoritarios fueron fósforo, potasio y magnesio, y el contenido de éstos no presentó diferencias apreciables en las variedades mejoradas. El aceite de las variedades híbridas es de buena calidad por su alto contenido de ácidos grasos mono-insaturados y ácidos grasos poli-insaturados y tuvieron mayor contenido de ácido oleico y menor de ácido palmítico, posiblemente por la incorporación del gen opaco-2.

El mejoramiento tuvo un efecto positivo en el perfil de aminoácidos con mayores niveles de aminoácidos esenciales como lisina, triptófano, fenilalanina e isoleucina. Los maíces híbridos poseen una calidad de proteína superior a las variedades predecesoras por su mayor contenido de aminoácidos esenciales que cubren mejor el patrón de referencia, mayor digestibilidad, valores de puntaje de aminoácidos corregido con digestibilidad de proteínas nueve veces mayores y un valor biológico estimado del doble. Conjuntamente los valores de relación de eficiencia proteica calculada indicaron que son proteínas de buena calidad. En el presente trabajo se demostró que las variedades híbridas Sac beh y Chichén Itzá presentan características químicas y nutrimentales que las clasifican como variedades de alta calidad de proteína y alto contenido de aceite, que indican mejoras en el valor nutricional de las variedades nativas con la incorporación del gen opaco-2. Por lo tanto, éstas demuestran potencial para ser consumidas y con ello, poder contribuir a disminuir la tasa de desnutrición infantil en el Sureste de México.

## AGRADECIMIENTOS

Loa autores agradecen al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) por haber proporcionado de las muestras de granos de maíz nativo y QPM para la realización de la investigación.

## REFERENCIAS

- Aguilar-Castillo, G., Gómex-Montiel, N., Torres-Pimentel, H. y Vázquez-Carrillo, G. 2010. Sac-Beh y Chichen Itzá: variedades de maíz de calidad proteínica para el sistema RozaTumba-Quema de la península de Yucatán. Instituto Nacional de investigaciones Forestales y Pecuarias. Centro de Investigación regional del sureste. Campo Experimental Mochochá. Folleto técnico 3: 5-8
- Akalu, G., Taffesse, S., Gunaratna, N.S. y De Groot, H. 2010. The effectiveness of quality protein maize in improving the nutritional status of young children in the Ethiopian highlands. *Food and Nutrition Bulletin*. 31: 418-430.
- Alaiz, M., Navarro, J. L., Girón, J. y Vioque E. 1992. Amino acid analysis by high-performance liquid chromatography after derivatization with diethyl ethoxymethylenemalonate. *Journal of Chromatography*. 591: 181-186.
- AOAC. 2012. Official methods of analysis of AOAC International, editor Latimer G.W., 19th. Edition, USA.
- Bódi, Z., Pepó, P., Kovács, A., Széles, E. y Györi, Z. 2008. Macro- and microelement contents of blue and red kernel corns, *Cereal Research Communications*. 36: 147-155.
- Cázares, E., Chávez, J. L., Salinas, Y., Casillo, F. y Ramírez, P. 2015. Variación en la composición del grano entre poblaciones de maíz (*Zea mays* L.) nativas de Yucatán, México. *Agrociencia*. 49: 15-30.
- Cuevas, E.O., Verdugo, N.M., Ângulo, P.I., Milán, J., Mora, R., Bello, L. A., Garzón, J.A. y Reyes, C. 2006. Nutritional properties of tempeh flour from quality protein maize (*Zea mays* L.). *LWT Food Science and Technology*. 39: 1072-1079.
- FAO Y FINUT. 2017. Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Fundación Iberoamericana de Nutrición (FINUT) Granada, España, 2017 Evaluación de la calidad de las proteínas de la dieta en nutrición humana Consulta de expertos. 31 de Marzo-2 de Abril, 2011 Auckland, Nueva Zelanda. FAO ISSN 1014-2916 ISBN 978-84-697-74731.
- Friedman, M. 1996. Nutritional Value of Proteins from Different Food Sources. *Journal Agriculture and Food Chemistry*. 44: 6-29.
- Gayral, M., Gaillard, C., Bakan, B., Dalgalarrodo, M., Elmorjani, K., Delluc, C., Brunet, S., Linossier, L., Morel, M.H. y Marion, D. 2016. Transition from vitreous to floury endosperm in maize (*Zea mays* L.) kernels is related to protein and starch gradients. *Journal of Cereal Science*, 68:148-154.
- Gutiérrez, R., Ayala, A. E., Milán, J., Garzón, J. A., López, J.A. y Reyes C. 2008. Technological and nutritional properties of flours and tortillas from nixtamalized and extruded quality protein maize (*Zea mays* L.). *Cereal Chemistry*. 85: 808-816.
- Gutiérrez, M.L., Coronado, E., Vázquez, F. A., López, Y. L. y Ortega, A. 2009. Caracterización física y química de maíz de calidad proteínica mejorada, Physical and chemical characterization of quality protein maize. *CyTA – Journal of Food*. 7: 111-118.
- Gwirtz, J.A. y García M.N. 2014. Processing maize flour and corn meal food products, *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1312: 66-75.
- Hasjim, J., Srichuwong, S., Scott, M.P. y Jane J.L. 2009. Kernel composition, starch structure, and enzyme digestibility of opaque-2 maize and quality protein maize, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57: 2049-2055.
- Hsu, H.W., Vavar, D.L., Satterlee, L.D. y Miller, G.A. 1977. A multienzyme technique for estimating protein digestibility, *Journal of food science*. 42: 1269-1273.
- Ignjatovic, D., Vancetovic, J., Trbovic, D., Dumanovic, Z., Kostadinovic, M. y Bozinovic, S. 2015. Grain nutrient composition of maize (*Zea mays* L.) drought-tolerant populations, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 63: 1251–1260.
- Kriz, A. L. 2009. Enhancement of amino acid availability in corn grain. En: *Molecular genetic approaches to maize improvement. Biotechnology in agriculture and forestry*. Kriz A.L., Larkins B.A. (eds), pp. 79-89, Springer, Berlin.
- Lee, Y.B., Elliot, J.G., Rickansrud, D. A. y Hagberg E.C. 1978. Predicting protein efficiency ratio by the chemical determination of connective tissue content in meat. *Journal of Food Science*. 43: 1359-1362.
- Li, J.S. y Vassal, S. K. 2016. Maize: Quality protein maize. En: *Encyclopedia of Food Grains (Second Edition)*, Vol. 4, pp. 420-424., Elsevier, China.



- Martínez, M., Ortiz, R. y Raigón, M.D. 2017. Contenido de fósforo, potasio, zinc, hierro, sodio, calcio y magnesio, análisis de su variabilidad en accesiones cubanas de maíz, *Cultivos Tropicales*. 38: 92-101.
- Mendoza, M., Andrio, E., Juárez, J. M., Mosqueda, C., Latournerie, L., Castañón, G., López, A. y Moreno, E. 2006. Contenido de lisina y triptófano en genotipos de maíz de alta Calidad proteica y normal. *Universidad y Ciencia*. 22: 153-161.
- Menkir, A. 2008. Genetic variation for grain mineral content in tropical-adapted maize inbred lines, *Food Chemistry*. 110: 454-464.
- Mohammad, S., Dikshit, N., Sekhar, C., Kumar, P. y Kumar S. 2018. Biochemical evaluation of dent corn (*Zea mays* L.) genotypes cultivated under rainfed conditions in the hills of north western Indian Himalayan state of Jammu and Kashmir. *Journal of Applied and Natural Science*. 10: 196-201.
- Montgomery, D.C. 2008. Diseño y análisis de experimentos. 2a ed., pp. 100-102, editorial Limusa -Wiley, México.
- Morup, I. K. y Olesen, E. S. 1976. New method for prediction of protein value from essential amino acid pattern. *Nutritional Report International*. 13: 355-365.
- Norma Mexicana NMX-FF-034/1-SCFI-2002. Productos alimenticios no industrializados para consumo humano - Cereales - Parte I: Maíz blanco para proceso alcalino para tortillas de maíz y productos de maíz nixtamalizado-Especificaciones y métodos de prueba.
- Preciado, R.E., Vázquez, M.G., Figueroa, J.D., Guzmán, S.H., Santiago, D. y Topete, A. 2018. Fatty acids and starch properties of high-oil maize hybrids during nixtamalization and tortilla-making process, *Journal of Cereal Science*. 83: 171-179.
- Salazar, L. L. y Magaña, M. Á. 2016. Aportación de la milpa y traspasado a la autosuficiencia alimentaria en comunidades mayas de Yucatán; *Estudios sociales*. 24-25: 182-203.
- Sanjeev, P., Chaudhary, D. P., Sreevastava, P., Saha, S., Rajenderan, A., Sekhar J. C. y Chikkappa, G. K. 2014. Comparison of Fatty Acid Profile of Specialty Maize to Normal Maize, *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 91: 1001-1005.
- Schaafsma, G. 2005. The Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Score (PDCAAS)-A Concept for describing protein quality in foods and food ingredients: A critical review. *Journal of AOAC International*. 88: 988-994.
- Shewry, P.R. 2007. Improving the protein content and composition of cereal grain. *Journal of Cereal Science*. 46: 239-250.
- Singh, N., Vasudev, S., Yadava, D.K., Chaudhary, D.P. y Prabhu, K.V. 2013. Oil improvement in maize: Potential and prospects. En: *Maize: Nutrition Dynamics and Novel Uses*. Chaudhary D., Kumar S., Langyan S. (eds), p. 79, Springer, New Delhi.
- Tang, M., He, X., Luo, Y., Ma, L., Tang, X. y Huang, K. 2013. Nutritional assessment of transgenic lysine-rich maize compared with conventional quality protein maize. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 13: 1049-1054.
- Tiwari, M.R., Chapagain, B.P., Shah, M.K. y Shrestha, Y.K. 2013. Evaluation of quality protein maize for growth performance of crossbred piglets in western hills of nepal. *Global Journal of Science Frontier Research Agriculture and Veterinary*. 13: 1-6.
- Upadyay, S.R., Gurug, D. B., Paudel, D. C., Koirala, K. B., Sah, S. N., Prasad, R. C., Pokhrel, B. B. y Dhakal, R. 2009. Evaluation of quality protein maize (QPM) genotypes under rainfed mid hill environments of nepal. *Nepal Journal of Science and Technology* 10: 9-14.
- Val, L.D., Schwartz, S.H., Kerns, M.R. y Deikman, J. 2009. Development of a high oil trait for maize. En: *Molecular genetic approaches to maize improvement. biotechnology in agriculture and forestry*, Kriz A.L., Larkins B.A. (eds), Vol. 63, p. 603, Springer, Berlin.
- Yust, M., Pedroche, J., Girón, J., Vioque, E., Millán, F. y Alaíz, M. 2004. Determination of tryptophan by high-performance liquid chromatography of alkaline hydrolysates with spectrophotometric detection, *Food Chemistry*. 85: 317-320.
- Zengin, G., Aktumsek, A., Guler, G. O., Cakmak, Y. S., Girón, J., Alaíz, M. y Vioque, J. 2012. Nutritional quality of protein in the leaves of eleven Asphodeline species (Liliaceae) from Turkey. *Food Chemistry*. 135: 1360-1364.

## Caracterización fisicoquímica y compuestos bioactivos en el coco (*Cocos nucifera* L.) y su aceite: Efecto del cultivar y región de cultivo

Physicochemical characterization and bioactive compounds in coconut (*Cocos nucifera* L.) and its oil: Effect of the cultivar and growing region

Luis Enrique Robles-Ozuna, Yesica Yudith Martínez- Núñez, María del Refugio Robles -Burgeño, Martín Valenzuela-Meléndrez, Orlando Tortoledo-Ortiz, Tomás Madera-Santana, Luz del Carmen Montoya- Ballesteros\*

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Carretera a la Victoria Km 0.6, P.O. Box 1735, Hermosillo, Sonora, México.

### RESUMEN

La pulpa y aceite de coco son valorados por los efectos sobre la salud, estas propiedades son atribuidas a compuestos bioactivos, como el ácido láurico, mirístico y palmítico principalmente, compuestos fenólicos y vitamina E. La concentración de estos compuestos depende del cultivar, las condiciones bióticas y abióticas de la zona de cultivo. En este estudio se determinó el efecto del cultivar y zonas productoras, sobre las características fisicoquímicas (peso, espesor del endospermo, pH, sólidos solubles totales, humedad) y compuestos bioactivos en el coco y su aceite. Se analizaron las propiedades fisicoquímicas y los compuestos bioactivos como fenoles totales,  $\alpha$ -tocoferol y el perfil de ácidos grasos; en los cultivares cosechados en el estado de Guerrero (Alto Pacífico-saladita, Enano Verde, e Híbrido) y en Yucatán (Alto Pacífico-2 y Enano Verde). Las propiedades fisicoquímicas y los compuestos bioactivos analizados, son diferentes dependiendo del cultivar y la región de cultivo. El cultivar Enano Verde de Yucatán, es superior en el contenido de compuestos fenólicos (767.44 mg ácido gálico/100 g), mientras que Alto Pacífico-Saladita en  $\alpha$ -tocoferol (151.03  $\mu$ g/100 g). El tipo de cultivar podría estar influyendo directamente en las características fisicoquímicas y los compuestos bioactivos estudiados.

**Palabras clave:** Coco, compuestos bioactivos, cultivar, región de crecimiento

### ABSTRACT

Coconut pulp and coconut oil are valued for their health effects, these properties are attributed to bioactive compounds, such as lauric, myristic and palmitic acid mainly, phenolic compounds and vitamin E. The concentration of these compounds depends on the cultivar, the conditions biotic and abiotic of the growing area. In this study, the effect of the cultivar and producing areas was determined on the physicochemical characteristics (weight, endosperm thickness, pH, total soluble solids, humidity), and bioactive compounds in coconut and its oil. Physicochemical properties and bioactive compounds such as total phenols,  $\alpha$ -tocopherol and the fatty acid profile were analyzed; in the cultivars harvested in the state of Guerrero (Alto Pacífico-saladita, Enano Verde, and Híbrido) and in Yucatán (Alto Pacífico-2 and Enano

Verde). The analyzed physicochemical properties and the bioactive compounds are different depending on the cultivar and the cultivation region. The cultivar Enano Verde from Yucatán is superior in the content of phenolic compounds (767.44 mg gallic acid / 100 g), while Alto Pacífico-Saladita in  $\alpha$ -tocopherol (151.03  $\mu$ g/100 g). The type of cultivar could be directly influencing the physicochemical characteristics and the bioactive compounds studied.

**Key words:** Coconut, bioactive compounds, cultivars, growing region

### INTRODUCCIÓN

El endospermo sólido o pulpa de coco, es la reserva alimenticia de la semilla; de la cual se puede obtener algunos productos como leche, aceite y coco seco, entre otros (Canapi *et al.*, 2005; SIAP, 2019), los que son altamente demandados por el consumidor. Un factor decisivo en la evaluación de la calidad de coco como materia prima de sus diferentes productos, son sus propiedades fisicoquímicas como es el peso, grosor o espesor del endospermo, pH, sólidos solubles, contenido de humedad y color del endospermo sólido. Aunado a ello, la pulpa y aceite de coco son altamente valorados por su aportación nutricional. En particular, el aceite de coco virgen (VCO), promovido recientemente como aceite saludable, es reconocido como alimento funcional o nutraceutico. Sus propiedades funcionales o nutraceuticas son atribuidas a compuestos bioactivos como los ácidos grasos de cadena media, principalmente el ácido láurico, mirístico y palmítico; los compuestos fenólicos y vitamina E. Estos compuestos bioactivos son reconocidos por sus propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y antimicrobianas. Aunado a ello, el VCO puede tener utilidad en la industria de belleza para elaborar tratamientos de cabello y piel, puede ser utilizado además como ingrediente alimenticio (Eyes *et al.*, 2016; SIAP, 2017).

Los efectos sobre la salud del aceite de coco en la mayoría de los estudios se atribuyen a la porción lipídica (Enig, 2001; Lee y Lip, 2003; Nandi *et al.*, 2005; Mansor *et al.*, 2012; Roopan, 2016); sin embargo, en estudios se sugiere que los compuestos fenólicos podrían contribuir a la capacidad antioxidante de VCO, así como la vitamina E (Nevin y Rajamohan, 2004; Nevin y Rajamohan, 2006; Marina *et al.*, 2009; Mulyadi *et al.*, 2021).

\*Autor para correspondencia: Luz del Carmen Montoya Ballesteros  
 Correo electrónico: lmontoya@ciad.mx

La concentración de todos estos compuestos bioactivos en el endospermo sólido y el aceite depende del cultivar, estado de desarrollo de los frutos o semillas, clima, zona de producción y método de obtención del aceite (Kumar, 2011). Alves- Ferreira *et al.* (2019), diferenciaron los cultivares de coco mediante el perfil lipídico; los híbridos presentan mayores contenidos de ácidos grasos insaturados en comparación a otros cultivares cultivadas en India (Kumar y Balakrishna 2009; Kumar, 2011). Sin embargo, a la fecha, estudios que reporten sobre contenidos fenólicos de VCO en diferentes cultivares y o zonas de producción son escasos.

Los cambios climáticos bruscos alteran la cantidad y composición de aceite en semillas oleaginosas. La temperatura es un factor ambiental importante, afecta la composición de ácidos grasos, tiene una fuerte influencia en las proporciones de diferentes ácidos grasos (Mustafa *et al.*, 2015). Además aumenta la cantidad de aceite y los ácidos grasos poliinsaturados (Hafiz *et al.*, 2015). Otras condiciones como programas de riego y fertilización del suelo, se reportan para incrementar los lípidos y tocoferol en la almendra de *Prunus dulcis*, cv. Nonpareil (Zhu *et al.*, 2017). En pimpinela (*Sanguisorba minor* L.), la fertilización podría incrementar el contenido de compuestos fenólicos (Finimundy *et al.*, 2020). En relación a las características fisicoquímicas cantidades adecuadas de Nitrógeno, permiten desarrollar un color, sabor, textura y características de calidad nutricional óptimos en las frutas (Romojaro *et al.*, 2006; Ali *et al.*, 2012).

A la fecha en nuestro país, son escasos los estudios enfocados a los compuestos bioactivos del endospermo y el aceite de coco virgen, así como el de los cultivares de donde se obtiene.

Se consideran a los cocoteros dentro de dos grandes grupos principales, los altos o gigantes, los de mayor peso y los enanos de menor peso. Existen además los híbridos, los cuales son cruza de estos dos grupos. En el caso de los altos o gigantes, tiene una coloración que varía de verde a marrón; se emplean para la producción de aceite y para consumo en fresco; de esta forma son utilizados en el Estado de Guerrero. La variedad enana está representada por frutos verdes, rojos y amarillos; son aptos para el consumo de agua de coco (Alves Ferreira *et al.*, 2019). En los Estados de Guerrero y Yucatán, se emplean para este fin, comercialización de agua; el tamaño del fruto lo hace poco atractivo para consumo en fresco. Por su parte, los cultivares Híbridos son de múltiples usos, ya que adquieren las mejores cualidades de los padres dando como resultado frutos de tamaño de mediano a grande y buen rendimiento de copa (Lizano, 2018).

El profundizar en el estudio de compuestos bioactivos y calidad de aceite por cultivar y zonas productoras, podría dirigir aún más las nuevas plantaciones de coco para fines específicos en la industria, tales como productos farmacéuticos, alimenticios y cosméticos. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue determinar el efecto del cultivar y zonas productoras, sobre las características fisicoquímicas y los compuestos bioactivos en el coco y su aceite.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cultivares y zonas de cultivo

Se estudiaron cinco cultivares en dos zonas productoras, una en el Estado de Guerrero y la otra en el estado de Yucatán. En la zona de Guerrero se estudiaron los cultivares: Alto Pacífico-Saladita (APS-G), Enano verde (EV-G) y un cultivar Híbrido (H-G). En el estado de Yucatán, Alto Pacífico 2 (AP2-Y) y Enano Verde de Brasil (EV-Y). El estado de desarrollo de todos los cocos en cada cultivar fue el mismo, de 12 a 14 meses del mismo año de cosecha.

### Análisis fisicoquímico en los cultivares de coco

Se caracterizó el coco entero o semilla, con base a diferentes variables las que fueron: Peso (g) y grosor del endospermo sólido (mm). Los parámetros físico-químicos de calidad del endospermo sólido incluyeron pH, sólidos solubles totales expresados como °Brix y porcentaje de humedad; los sólidos solubles además se evaluaron en el endospermo sólido. Los parámetros analizados fueron basados en las técnicas de la A.O.A.C. (2002). El color aparente, se midió por reflectancia utilizando un colorímetro Minolta modelo CR-300 (Metrolab International). Se utilizó el sistema CIE Lab para medir los parámetros  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ , el instrumento se calibró con un mosaico blanco como estándar de color, donde  $L^*$ , representa los valores desde 0 a 100 significando tonalidades desde el negro (0) hasta blanco (100). El parámetro  $a^*$  en tonalidades desde negativas (verde) hasta rojo (+) cercanas a 50 y el  $b^*$  desde azules (-) a amarillos (+). A partir de estos parámetros de color se determinó además, el ángulo de matiz  $Hue^*$  ( $h$ ) y cromaticidad, dada por  $C^*$ , utilizados estos dos últimos parámetros para ubicar en el diagrama de cromaticidad, el rago de color obtenido. Se obtienen mediante las siguientes ecuaciones:

$$C^* = [(a^*)^2 + (b^*)^2]^{1/2} \quad \text{Ec. 1}$$

$$h^\circ = \arctan -(b/a) \quad \text{Ec. 2}$$

Donde:

$L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  = Coordenadas de cromaticidad en el espacio de color  $L^* a^* b^*$ .

### Compuestos bioactivos

**Fenoles totales.** La determinación se realizó en el aceite de cada cultivar estudiado. La extracción del aceite fue a partir del endospermo liofilizado para ello se congeló a  $-80^\circ\text{C}$  y una presión de 20 Pascales para el liofilizado. Las muestras liofilizadas se prensaron en una prensa vertical, de donde se colectó el aceite. Para la determinación de fenoles totales se realizó una curva de calibración, utilizando una solución madre de Ácido Gálico 0.1 mg/mL, la cual fue diluida a diferentes concentraciones (0.00031, 0.0062, 0.01, 0.02, 0.05 y 0.1 mg/mL). A partir de las concentraciones ya establecidas, se tomaron 100  $\mu\text{L}$  de cada una y 600  $\mu\text{L}$  de agua, posteriormente se agregó 50  $\mu\text{L}$  de Folin Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965),

seguido a ello, se dejó reposar por 5 min, para después añadir 150  $\mu$ l de carbonato de sodio al 20% y aforar a 1 mL. Después de 2 h a temperatura ambiente (25 °C), se midió la absorbancia a 760 nm en el espectrofotómetro Cary 50 Bio UV-Visible Spectrophotometer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), obteniéndose de esta forma la línea base de calibración. Para obtener cuantitativamente los fenoles totales en cada una de las muestras de aceite de coco, se tomaron 5 g del aceite, se adicionó 1 mL de metanol al 80 %. La mezcla se homogeneizó durante 2 min; se dejó reposar durante 1 min y se homogeneizó de nuevo por 2 min. Posteriormente, fue centrifugada a 1100 x g durante 15 min a temperatura ambiente. El sobrenadante obtenido fue recolectado. Al residuo, se le añadió 1 mL de metanol al 80% y fue centrifugado nuevamente a las condiciones mencionadas con anterioridad. Se utilizaron 100  $\mu$ l del sobrenadante obtenido para las mediciones espectrofotométricas; cada muestra se midió por triplicado.

### Perfil de ácidos grasos

La extracción de aceite se realizó a partir de 1 g de muestra del endospermo liofilizado, se llevó a cabo mediante el procedimiento de Bligh y Dyer (1959), utilizando cloroformo:metanol (2:1 v/v). Después de evaporar el disolvente en un baño de agua a 35 °C bajo una atmósfera de nitrógeno, los extractos lipídicos fueron transmetilados en presencia de tricloruro de boro de acuerdo al método de Park y Goins (1994). La composición de los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) se determinó en un cromatógrafo de gases Agilent (Modelo 7890 B, Santa Clara, CA, USA) equipado con un automuestreador (Modelo 7693) y un detector de ionización de llama (FID). Los ácidos grasos se separaron en una columna capilar de sílice fundida de 100 m y 0.25 mm de diámetro interno (SP-2560, Supelco, Bellefonte, PA, USA). La temperatura del horno se programó desde una temperatura inicial de 150 °C (20 min) hasta una temperatura final de 220 °C a una velocidad de 5 °C/min. La temperatura del inyector se fijó a 250 °C y la temperatura del detector a 300 °C. Las muestras se separaron utilizando hidrógeno a 17 psi de presión como gas acarreador. Los cromatogramas resultantes fueron analizados con el programa Chemstation (ChemStation chromatography manager, Agilent Santa Clara, CA, USA). Los ácidos grasos se identificaron comparando los tiempos de retención con los de los estándares (Supelco 37 Component FAME Mix, Bellefonte, PA, USA). Los ácidos grasos se expresaron como porcentaje del total de ácidos grasos. A partir de éstos datos, se calcularon los porcentajes totales de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados.

$\alpha$ -tocoferol. Las mediciones se realizaron en el endospermo sólido, con base en la metodología descrita por Onibi *et al.* (1998). La obtención  $\alpha$ -tocoferol se realizó mediante la saponificación de la muestra, Etanol (1 mL) y KOH 10 M (1 mL) fueron añadidos a la muestra, seguidos de una agitación vigorosa y colocados en un baño de agua a 70 °C por 10 min, después de 10 min de saponificación fueron agitados por 10 s y se colocaron de nuevo en el baño para continuar la saponi-

ficación por 20 min. Al final de la saponificación, las muestras fueron colocadas en hielo. Posteriormente se agregó 5 mL de hexano a las muestras, se agitaron por 15 s y se centrifugaron a 1500 rpm a 10 °C por 7 min. Se separó la capa de hexano y se colocó en un tubo de ensayo de 18 x 150 mm. Las muestras se evaporaron a sequedad con un flujo de nitrógeno utilizando un sistema N-EVAP 112 (OA-SYS Heating System) (Berlin, MA USA). Las muestras se reconstituyeron en 200  $\mu$ l de etanol grado HPLC y se analizaron en un sistema HPLC (1260 Infinity, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) equipado con un detector de arreglo de diodos a una longitud de onda de 290 nm. La separación se realizó utilizando una columna analítica C18 Agilent Microsorb (100-3 C18, 100 x 4.6 mm) protegida con una guarda columna zorbax SB-C18 4.6 x 12.5 mm 5 Micron, se utilizó una fase móvil isocrática [metanol: agua (98:2, v/v)] a un flujo de 1.0 mL/min. Para el cálculo de las concentraciones se usó estándar de  $\alpha$ -tocoferol (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, USA).

### Diseño de experimentos y análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar, considerando el cultivar de diferentes regiones como factor principal. Se realizó un análisis de varianza a un nivel de significancia  $\alpha=0.05$ ., seguido por la prueba de Tukey-Kramer, cuando presentaron diferencias. Se utilizó el paquete estadístico NCSS versión 2008, NCSS, LLC (Kaysville, Utah).

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Peso y grosor del endospermo sólido

El peso de los cocos enteros del cultivar AP, en las regiones estudiadas, fue diferentes ( $p \leq 0.05$ ) (Tabla 1), destaca el mayor peso el coco APS-G, seguido del AP2-Y; considerado como peso alto (SAGARPA, 2014). Los de menor peso fueron los EV y no presentaron diferencia significativa entre ellos, son considerados como peso bajo (SAGARPA, 2014). En el caso del cultivar H-G, éste presentó un peso promedio de 1,308 g correspondiendo a valores intermedio entre los AP y los EV, resultado esperado debido al tipo de cultivar. El peso del coco es dependiente de cada variedad. Es posible además atribuir las diferencias en el peso, a la mineralización del suelo en donde se cultivan, se reporta que la adición de Nitrógeno y Potasio al suelo, en una relación adecuada, tiene efecto positivo sobre el incremento en el peso del fruto en la variedad de coco Anão verde de Jiqui, los que fueron cultivados en Colombia (Sammy *et al.*, 2008). En otros frutos para el incremento en el peso, la fertilización es un factor importante, principalmente la aplicación de N, P, K y Ca (Monroy *et al.*, 2019).

En cuanto al grosor o espesor del endospermo (Tabla 1), se observó la misma tendencia que con el peso, fue diferente entre los cultivares ( $p \leq 0.05$ ) y presentaron valores de mayor magnitud los cultivares cosechados en Guerrero. En estudio realizado por Alejo (2015), en la misma región de Guerrero y en cocos criollos Alto Pacifico, se reportaron con un espesor de 11.7 a 15.2 mm. Este parámetro se evalúa



**Tabla 1.** Caracterización fisicoquímica de los cultivares del estudio cosechados en los estados de Guerrero y Yucatán.**Table 1.** Physicochemical characterization of the study cultivars harvested in the states of Guerrero and Yucatán.

Cultivar	Peso (g)	<sup>1</sup> Espesor (mm)	pH	<sup>2</sup> SST (°Brix)	Humedad (%)
APS-G	1933.3 <sup>c</sup>	17.3 <sup>d</sup>	6.3 <sup>c</sup>	7.0 <sup>d</sup>	49.0 <sup>c</sup>
AP2-Y	1541.6 <sup>b</sup>	9.6 <sup>a</sup>	6.1 <sup>b</sup>	6.9 <sup>d</sup>	46.8 <sup>b</sup>
H-G	1308.3 <sup>b</sup>	10.2 <sup>ab</sup>	6.1 <sup>b</sup>	1.8 <sup>a</sup>	49.4 <sup>c</sup>
EV-G	591.6 <sup>a</sup>	11.7 <sup>c</sup>	6.0 <sup>a</sup>	2.3 <sup>b</sup>	44.6 <sup>a</sup>
EV-Y	506.4 <sup>a</sup>	10.8 <sup>bc</sup>	5.9 <sup>a</sup>	2.8 <sup>c</sup>	51.7 <sup>d</sup>

Cultivares: APS-G: Alto Pacífico- Saladita, del estado de Guerrero, AP2-Y: Alto Pacífico-2, del estado de Yucatán, H-G: Híbrido del estado de Guerrero, EV-G: Enano Verde de Brasil del estado de Guerrero, EV-Y: Enano Verde de Brasil, del estado de Yucatán.<sup>1</sup> Espesor: Espesor del endospermo, <sup>2</sup>SST: Sólidos solubles totales

<sup>abcd</sup> Letras diferentes en cada renglón indican diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ )

como un indicador en el rendimiento de aceite, es decir, los cocos de mayor espesor son con los que se obtiene mayores rendimientos de aceite y caso contrario los de menor espesor mayor contenido de agua en el coco. En otras semillas, las condiciones pre-cosecha son otro factor que pueden influir en las propiedades fisicoquímicas; en semillas de girasol, un estrés por déficit de agua a corto plazo puede causar cambio sustancial en las propiedades físicas y la composición bioquímica, la sequía en la fase de llenado de semillas, afecta el rendimiento del mismo o es causante de un llenado incompleto en la semilla, lo que a su vez el rendimiento del aceite es menor, debido a menor contenido de proteínas en el endospermo (Mustafa *et al.*, 2015).

Por otro lado, Leorna e Israel (2018) reportan que el espesor del endospermo se emplea además como un indicador de madurez y varía de 12 a 15 mm para cocos maduros según Banzon (1990). Según la guía técnica de SAGARPA (2014), el espesor de endospermo, depende del tipo de cultivar; se puede considerar delgado para H-G, medio para EV y grueso para los AP. Según la edad de los frutos, estudiados (12-14 meses) y de acuerdo a lo anterior, se pueden considerar como frutos maduros.

### pH, sólidos solubles totales y humedad

El pH se encontró diferente ( $p \leq 0.05$ ) entre los cultivares (Tabla 1), con valores desde 5.9 a 6.3, siendo el endospermo sólido del cultivar EV el que presentó menor pH. El pH encontrado es mayor a los reportados Ghosh y Bandopadhyay (2015), para diferentes cultivares e híbridos (4.8-5.20). El pH para otros frutos como uva, puede ser afectado por las prácticas pre-cosecha, como la fertilización (Chadha and Shikhamany, 1999).

Los sólidos solubles totales fueron bajos en el endospermo sólido principalmente en H-G y para el cultivar EV-Y y EV-G, en las dos regiones de estudio. En los APS-G y AP2-Y, son los mayores encontrados (7 °Brix). Los cultivares fueron diferentes entre ellos ( $p \leq 0.05$ ), solo los APS-G y AP2-Y son iguales. Al analizar los sólidos solubles en el endospermo

líquido, se encontraron contenidos mas altos que en el endospermo sólido, así en EV-Y y EV-G fueron en promedio de  $9.0 \pm 0.2$  y  $13.2 \pm 0.7$  °Brix, respectivamente, superiores a  $2.3 \pm 0.4$  y  $2.8 \pm 0.6$  °Brix respectivamente. Por su parte, en APS-G y AP2-Y, fueron de  $10.1 \pm 0.2$  y  $12 \pm 0.4$  °Brix, respectivamente; mientras que en H-G son menos dulces ( $6.6 \pm 0.3$  °Brix). El valor de este parámetro puede depender de las características de cada cultivar. Los sólidos solubles además, dependen de las concentraciones de iones como fosfato, sulfato, cloruro y fluoruro, que se requieren en el transcurso a la madurez de los cocos (Jackson *et al.*, 2004); por lo que la fertilización podría ser factor clave para favorecer el contenido de los sólidos solubles. La fertilización con nitrógeno (N) se reporta como limitante para la calidad poscosecha, altas dosis de nitrógeno reducen el contenido de sólidos solubles totales en los frutos, mientras que altas dosis de potasio aumentan los sólidos solubles, por lo anterior, es importante considerar una adecuada relación de nitrógeno y potasio para la calidad de los frutos (Sammy *et al.*, 2008).

En relación a la humedad contenida en el endospermo sólidos de los cocos, ésta varió desde 44 a 51% (Tabla 1). Leon y Delores (2005), reportan para cocos de 12 meses un porcentaje de humedad de 51%, por lo que se considera en el rango para cocos maduros. Es importante considerar que el estado de madurez en el coco, determina la composición y el contenido de los diferentes ácidos grasos saturados de cadena media y larga, excepto los ácidos mirístico y palmítico (Balleza y Sierra, 1972; Ángeles *et al.*, 2018; Kumar y Balakrishna, 2008).

### Color del endospermo sólido

Se considera al endospermo sólido representado por la pulpa blanca, carnosa y aceitosa de la semilla (Lamdande *et al.*, 2018). Los valores que se obtuvieron a partir de las mediciones de color en el endospermo, se presentan en la Tabla 2; para el valor  $L^*$  o luminosidad, los cultivares se encuentran en un rango de 69 a 76. En el valor  $a^*$ , de -0.7 a -1 y de 1 a 3.4 en el caso de valor  $b^*$ ; por su parte en  $C^*$ , se encontró entre un rango entre 1.87 a 3.4. En todas estas variables se observaron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ), por efecto del cultivar. En cuanto al ángulo de matiz ( $Hue^*$ ), los valores para el cultivar APS-G fueron de 122 y para el de AP2-Y de 110. En valores menores se encuentran EV-G y EV-Y, fueron de 103 y 104 respectivamente. El cultivar H-G, mostró los mismos rangos de valores de:  $L^* = 74$ ,  $a^* = -1.0$ ,  $b^* = 2.4$ ,  $C^* = 2.6$  y ángulo  $Hue^* = 112$ . Todos estos valores en el diagrama de cromaticidad, se encuentran en los rangos de las diferentes tonalidades color blanco. El color característico en el endospermo sólido debe de ser blanco (Chavan y Jadhav, 1995). Los valores encontrados son mayores al ser comparados con la variedad de coco Makapuno, cultivado en Tailandia, para el que se reporta un valor  $L^* = 67$ . La variedad Makapuno de acuerdo a lo reportado por Luengwilai *et al.* (2014), son cocos menos blancos, lo que el color puede ser dependiente del tipo de cultivar. Esta característica de los cultivares evaluados, podría aprovecharse para diferentes productos, en los cuales los

**Tabla 2.** Color *Cie Lab\** en los cultivares del estudio cosechados en los estados de Guerrero y Yucatán.

**Table 2.** Color *Cie Lab\** in the study cultivars harvested in the states of Guerrero and Yucatan.

Cultivar	L*	a*	b*	C*	Hue*
APS-G	76.3 <sup>b</sup>	-0.9 <sup>ab</sup>	1.5 <sup>a</sup>	1.8 <sup>a</sup>	122.0 <sup>b</sup>
AP2-y	71.7 <sup>ab</sup>	-0.8 <sup>ab</sup>	2.1 <sup>ab</sup>	2.3 <sup>ab</sup>	110.5 <sup>a</sup>
H-G	74.7 <sup>ab</sup>	-1.0 <sup>a</sup>	2.4 <sup>ab</sup>	2.6 <sup>ab</sup>	112.6 <sup>ab</sup>
EV-G	76.3 <sup>b</sup>	-0.7 <sup>b</sup>	3.4 <sup>b</sup>	3.4 <sup>b</sup>	103.1 <sup>a</sup>
EV-Y	75.1 <sup>b</sup>	-0.8 <sup>ab</sup>	2.8 <sup>b</sup>	3.0 <sup>ab</sup>	104.0 <sup>a</sup>

Cultivares: APS-G: Alto Pacífico- Saladita, del estado de Guerrero, AP2-Y: Alto Pacífico-2, del estado de Yucatán, H-G: Híbrido del estado de Guerrero, EV-G: Enano Verde de Brasil del estado de Guerrero, EV-Y: Enano Verde de Brasil, del estado de Yucatán. <sup>abcd</sup> Letras diferentes en cada renglón indican diferencia significativa (p≤0.05)

índices de calidad requeridos son de un color blanco; como puede ser la materia prima para la obtención de la copra para la elaboración de aceite de calidad, elaboración de harina y botanas.

### Fenoles totales

Los compuestos fenólicos contribuyen al color y sabor de las frutas y muestran efectos beneficiosos para la salud, siendo un buen índice de la capacidad antioxidante (Padilha *et al.*, 2015). En la Tabla 3, se logra visualizar una amplia diferencia en el contenido de fenoles totales, esto por efecto del cultivar (p≤ 0.05). Se observa que el cultivar EV en cualquier región, presenta mayor contenido de fenoles totales, en comparación a los cultivares APS-G y AP2-Y. Las concentraciones encontradas para el cultivar EV-Y y EV-G fueron de 767.44±0.1 y de 343.02±0.06 mg EAG/100 g, respectivamente; superiores además a las encontradas para los cultivares APS-G y AP2-Y. En el caso del coco H-G, éste presenta un contenido de 260 (mg EAG/100 g coco). Adekola *et al.* (2017), en sus resultados del contenido de fenoles totales en testa de coco, es decir, la porción de color café que rodea al endospermo sólido; reportan en promedio 440 mg EAG/100 g coco: Esta cantidad es mayor a los cultivares H-G, APS-G, AP2-Y y EV-G de este estudio; no siendo así para EV-Y. Cabe mencionar que los aná-

**Tabla 3.** Contenido de fenoles totales y  $\alpha$ -tocoferol en los cultivares del estudio, cosechados en los estados de Guerrero y Yucatán.

**Table 3.** Total phenols and  $\alpha$ -tocopherol contents in the study cultivars, harvested in the states of Guerrero and Yucatan.

Cultivar	Fenoles totales (mg EAG/100g)	$\alpha$ -tocoferol ( $\mu$ g $\alpha$ -tocoferol /100g)
APS-G	61.0 <sup>b</sup>	151.0 <sup>d</sup>
AP2-Y	34.8 <sup>a</sup>	20.2 <sup>b</sup>
H-G	260.1 <sup>c</sup>	NP
EV-G	343.0 <sup>d</sup>	42.5 <sup>c</sup>
EV-Y	767.4 <sup>e</sup>	10.6 <sup>a</sup>

Cultivares: APS-G: Alto Pacífico- Saladita, del estado de Guerrero, AP2-Y: Alto Pacífico-2, del estado de Yucatán, H-G: Híbrido del estado de Guerrero, EV-G: Enano Verde de Brasil del estado de Guerrero, EV-Y: Enano Verde de Brasil, del estado de Yucatán. <sup>abcd</sup> Letras diferentes en cada renglón indican diferencia significativa (p≤0.05)

lisis realizados en este estudio, fueron en el aceite extraído del endospermo eliminando la testa; de la que se reporta una fuente natural de múltiples ácidos fenólicos y flavonoides con una potente capacidad antioxidante (Arivalagan *et al.*, 2018). Las diferencias encontradas es posible atribuir las al tipo de cultivar, parte analizada en el cultivar y a las condiciones a las que se desarrollan las plantas en los diferentes ambientes. Es conocido que la cantidad y composición de estos metabolitos secundarios, como son los compuestos fenólicos, varían dependiendo de factores como condiciones climáticas, cultivar, estado de madurez, época de cosecha, sistemas de cultivo, tipos de suelo, prácticas post cosecha y métodos de procesamiento (Lee y Kader, 2000). La presencia de algunos de estos metabolitos también puede variar dependiendo de estímulos bióticos y abióticos (Wahyuni *et al.*, 2013). En coco, los estudios a la fecha que reportan dicho comportamiento son escasos. En otros cultivos como papa, se reportan incrementos en el contenido de compuestos fenólicos, cuando se aplica en niveles apropiados Nitrógeno y Potasio (Michalska *et al.*, 2013); al igual en plantas con diferentes regímenes de fertilización ( Petropoulos *et al.*, 2018; Petropoulos *et al.* 2019; Finimundy *et al.*, 2020).

### Contenido de $\alpha$ -tocoferol

El  $\alpha$ -tocoferol es la forma más abundante y biológicamente activa de vitamina E (Yin *et al.*, 2020). El contenido de  $\alpha$ -tocoferol, en los cultivares evaluados se observa en la Tabla 3, mostrando diferencia significativa (p≤ 0.05) entre ellos. En el H-G no se detectó este compuesto. Según el estándar de calidad del CODEX (1999) para aceite de coco, establece un rango de 0 a 1,700  $\mu$ g  $\alpha$ -tocoferol/100g de coco; sin embargo, autores como Marina *et al.* (2009) consideran que el contenido de  $\alpha$ -tocoferol es propio de la testa o parte café del endospermo sólido del coco, debido a que esta parte del coco se elimina para los análisis y de  $\alpha$ -tocoferol de este estudio; es probable que debido a ello sea bajo en los resultados encontrados, o bien, sea dependiente del tipo de cultivar como se observa la diferencia entre ellos en la Tabla 3. Sin embargo, se encuentran dentro del rango reportado por el CODEX (1999); el mayor encontrado fue en APS-G (151.0  $\mu$ g  $\alpha$ -tocoferol /100g). En otras semillas, Condiciones como programas de riego y fertilización del suelo, se reportan para incrementar tocoferol en la almendra de *Prunus dulcis*, cv. Nonpareil (Zhu *et al.*, 2017).

### Perfil de ácidos grasos

Los ácidos grasos de cadena media como ácido láurico, ácido mirístico y ácido palmítico, determinados directamente del aceite extraído del coco, muestran un efecto significativo (p≤0.05) entre los cultivares como se observa en la Tabla 4. Sin embargo para el ácido láurico, las diferencias encontradas son pequeñas y solo al cultivar EV-Y. Con respecto al ácido palmítico, son diferentes al AP2-Y. Todos ellos oscilan en el rango de 39 a 45% para ácido laurico, de 18 a 20 % para mirístico y 8 a 12% en palmítico.

**Tabla 4.** Perfil de ácidos grasos en los cultivares del estudio, cosechados en los estados de Guerrero y Yucatán.  
**Table 4.** Fatty acid profile in the study cultivars, harvested in the states of Guerrero and Yucatan.

Cultivar	Ac. Láurico C12	Ac. Mirístico C14	Ac. Palmítico C16	Ac. G. Saturados	A.G Monosat.	A.G. Poliinsat.
APS-G	45.2 <sup>b</sup>	19.6 <sup>a</sup>	10.3 <sup>abc</sup>	90.8 <sup>a</sup>	7.5 <sup>c</sup>	1.6 <sup>c</sup>
AP2-Y	45.7 <sup>b</sup>	18.7 <sup>a</sup>	8.4 <sup>a</sup>	93.5 <sup>c</sup>	5.3 <sup>a</sup>	1.1 <sup>b</sup>
H-G	45.2 <sup>b</sup>	18.5 <sup>a</sup>	9.1 <sup>ab</sup>	93.0 <sup>c</sup>	6.0 <sup>b</sup>	0.9 <sup>ab</sup>
EV-G	43.3 <sup>b</sup>	20.1 <sup>a</sup>	10.9 <sup>bc</sup>	91.9 <sup>b</sup>	7.1 <sup>c</sup>	0.8 <sup>a</sup>
EV-Y	39.4 <sup>a</sup>	20.2 <sup>a</sup>	11.6 <sup>c</sup>	91.6 <sup>ab</sup>	7.4 <sup>c</sup>	0.8 <sup>a</sup>

Cultivares: APS-G: Alto Pacífico- Saladita, del estado de Guerrero, AP2-Y: Alto Pacífico-2, del estado de Yucatán, H-G: Híbrido del estado de Guerrero, EV-G: Enano Verde de Brasil del estado de Guerrero, EV-Y: Enano Verde de Brasil, del estado de Yucatán. <sup>abcd</sup> Letras diferentes en cada renglón indican diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ).

El porcentaje de ácidos grasos saturados, ácidos grasos monosaturados y poliinsaturados, al igual que los ácidos grasos de cadena media, los porcentajes en los cultivares, son diferentes ( $p \leq 0.05$ ), en pequeñas proporciones. La química del aceite en diferentes cultivos de semillas oleaginosas se ve afectada por la temperatura que prevalece en la maduración (Hilditch y Williams, 1964; Mustafa *et al.*, 2015). Las condiciones ecológicas inconsistentes pueden resultar en una amplia variación en la cantidad y composición del aceite. La temperatura en la cual se desarrollan los frutos, es un factor ambiental importante que afecta la composición de ácidos grasos de diferentes porciones en plantas y semillas (Tremolieres *et al.*, 1978). Un diferencial de temperatura tiene una fuerte influencia en las proporciones de diferentes ácidos grasos. Las temperaturas máxima promedio para el año 2019, en el cual se cosecharon los cultivares estudiados fue la siguiente: 32 °C para Guerrero, mientras que para Yucatán fue ligeramente menor, de 36 °C (INEGI, 2019), la diferencia en ellos es solo 4 °C, es posible que las diferencias mínimas encontradas en los porcentajes sean debidas a este factor. Condiciones climáticas, agua y disponibilidad de nitrógeno principalmente durante la etapa de llenado de semillas y el genotipo, podrían explicar además la mayoría de las variaciones o diferencias encontradas (Mustafa *et al.*, 2015). De acuerdo a los estándares reportados de la USDA (2020), para un coco de calidad en base a las concentraciones de ácidos grasos de cadena media: Láurico, mirístico, palmítico son 50%, 19% y 9.5%, respectivamente; por lo que los cocos de este estudio están en el rango. Estos rangos encontrados también se encuentran en el rango reportado por el CODEX (1999), ácido láurico (45.1-53%), mirístico (16.8-21%) y palmítico (7.5-10.2%).

## CONCLUSIONES

Las características fisicoquímicas y los compuestos bioactivos como fenoles totales,  $\alpha$ -tocoferol y ácidos grasos de los cultivares de coco estudiados, son diferentes entre ellos y las regiones estudiadas. En relación al perfil de ácidos grasos, las diferencias son pequeñas. El tipo de cultivar podría estar influyendo directamente en las características fisicoquímicas y los compuestos bioactivos estudiados. Podrían deberse además, al programa de fertilización y riego, la temperatura

de las regiones, sin embargo se requiere de mayores estudios. En base a estos resultados la región de Yucatán es más propicia en función del contenido de compuestos fenólicos con el cultivar EV-Y; mientras que los cultivares de la región de Guerrero para  $\alpha$ -tocoferol, siendo el APS-G, el de mayor contenido. Estos cultivares podrían significar un gran potencial para los diferentes productos de coco por el contenido de compuestos fenólicos y  $\alpha$ -tocoferol, además de los ácidos grasos de cadena media, en las regiones correspondientes.

## BIBLIOGRAFIA

- Ali, L., Alsanius, B., Rosberg, A., Svensson, B., Nielsen, T., Olsson, M. 2012. Effects of nutrition strategy on the levels of nutrients and bioactive compounds in blackberries. *Eur. Food Res. Technol.* 234 (1), 33-44. <https://doi.org/10.1007/s00217-011-1604-8>.
- Adekola, K., Salleh, A., Zaidan, U., Azlan, A., Chiavaro, E., Paciulli, M., Marikkar, J. 2017. Total phenolic content, antioxidative and antidiabetic properties of coconut (*Cocos nucifera* L.) testa and selected bean seed coats. *Italian Journal of Food Science.* 29: 741-753.
- Alejo, J. 2015. Evaluación y respuesta a la selección en el rendimiento de copra, de un grupo élite de cocotero criollo "alto del pacífico" (*Cocos nucifera* L.). *Revista de Energía Química y Física.* 2: 350-360.
- Alves Ferreira, J. A., Santos, J. M., Breikreitz, M. C., Ferreira, J., Lins, P., Farias, S. C., de Moraes, D. R., Eberlin, M. N., y Bottoli, C. 2019. Characterization of the lipid profile from coconut (*Cocos nucifera* L.) oil of different varieties by electrospray ionization mass spectrometry associated with principal component analysis and independent component analysis. *Food Research International.* 123:189-197.
- Angeles, J. G. C., Lado, J. P., Pascual, E. D., Cueto, C. A., Laurena, A. C., Laude, R. P. 2018. Towards the Understanding of Important Coconut Endosperm Phenotypes: Is there an Epigenetic Control? *Agronomy.* 8: 225.
- AOAC. 2011. *Official of Analysis of AOAC International* (AOAC-International Ed.). Arlington, VA, USA.
- Arivalagan, M., Roy, T., Yasmeeen, A., Pavithra, K., Jwala, P., Shivasankara, K., Manikantan, M., Hebbar, K., Kanade, S. 2018. Extraction of phenolic compounds with antioxidant potential from coconut (*Cocos nucifera* L.) testa and identification of phenolic acids and flavonoids using UPLC coupled with TQD-MS/MS. *LWT Food Science and Technology.* 92: 116-126.



- Balleza, C., Sierra, Z. 1976. Proximate analysis of the coconut endosperm in progressive stages of development. *Philippine Journal of Coconut Studies* 16: 37-46.
- Banzon, I. 1990. Coconut as Food. In *The coconut palm and its fruit*. I. Banzon, O. Gonzalez, S. Leon, & P. Sanchez (Eds.). Quezon City, Philippines. Philippines Coconut Research and Development Foundation. pp. 3-7.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. 37: 911-917.
- Canapi, E. C., Augustin, Y., Moro, E., Pedrosa, E., Bendaño, M. 2005. Coconut Oil. In *Bailey's industrial oil and fat products, edible oils and fat products*. F. Shahidi (Ed.), (6th ed.). USA. John Wiley & Sons. pp. 97-124.
- Chadha, K.L., Shikhamany, S.D., 1999. *The Grape Improvement, Production and Post-harvest Management*. Malhotra Publishing House, New Delhi 579p.
- CODEX-STAN. 1999. 210-1999: Norma para aceites vegetales especificados.
- Enig, M. 2001. Coconut: In Support of Good Health in the 21st Century P (www.apccsec.org/document/ENIG.pdf). *Am. J. Clin. Nutr.* 1-27.
- Eyres, L., Eyres, M. F., Chisholm, A., Brown, R. C. 2016. Coconut oil consumption and cardiovascular risk factors in humans. *Nutrition Reviews*. 74: 267-280.
- Finimundy T. , A. Karkanis, Â. Fernandes, S. Petropoulos, R. Calhelha, J. Petrović, M. Soković, E. Rosa, L. Barros, I. Ferreira. 2020. Bioactive properties of *Sanguisorba minor* L. cultivated in central Greece under different fertilization regimes *Food Chemistry* 327, 127043
- Ferreira, J. A., Santos, J. M., Breikreitz, M. C., Ferreira, J. M. S., Lins, P. M. P., Farias, S. C., de Moraes, D. R., Eberlin, M. N., Bottoli, C. B. G. 2019. Characterization of the lipid profile from coconut (*Cocos nucifera* L.) oil of different varieties by electrospray ionization mass spectrometry associated with principal component analysis and independent component analysis. *Food Research International*. 123: 189-197.
- Hilditch TP, Williams PN. 1964. *Chemical Constitution of Natural Fats*, p.207, Chapman and Hall, London.
- Jackson, A. Gordon, G. Wizzard, K. McCook y R. Rolle. 2004. Changes in chemical composition of coconut (*Cocos nucifera*) water during maturation of the fruit. *J Sci Food Agric* 84:1049-1052.
- Kumar, Balakrishna, A. 2009. Seasonal variations in fatty acid composition of oil in developing coconut. *Journal of Food Quality*. 32: 158-176.
- Kumar, S. 2011. Variability in coconut (*Cocos nucifera* L.) germplasm and hybrids for fatty acid profile of oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59: 13050-13058.
- Lamdande A., M. Prakash, K. Raghavarao. 2018. Storage study and quality evaluation of fresh coconut grating. *J Food Process Preserv.* 2018;42:e13350.
- Lee, S. K., Kader, A. A. 2000. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest Biology and Technology*. 20: 207-220.
- Leorna, M., Israel, K. 2018. The influence of maturity of VMAC5 (*Cocos nucifera* L.'makapuno') on its physicochemical, proximate composition and fatty acid profile. *Earth and Environmental Science*. 102: 012098.
- Lizano, M., Salazar, R., Moreira, Z., Brenes, G. 2018. Guía técnica del cultivo del coco. Ministerio de Agricultura y Ganadería de El Salvador. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura 14-15.
- Lee, K. W.; Lip, G. H. H. 2003. The role of omega 3 fatty acid in the secondary prevention of cardiovascular disease. *Int. J. Med.*, 97, 465-480.
- Luengwilai, K., Beckles, D. M., Pluemjit, O., Siriphanich, J. 2014. Postharvest quality and storage life of 'Makapuno'coconut (*Cocos nucifera* L.). *Scientia Horticulturae*. 175: 105-110.
- Marina, A., Che Man, Y., Nazimah, S., Amin, I. 2009. Antioxidant capacity and phenolic acids of virgin coconut oil. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 60: 114-123.
- Mansor, T, Y.B. Che Man, M. Shuhaimi, M.J. Abdul Afiq, F.K.M. Nurul. 2012. Physicochemical properties of virgin coconut oil extracted from different processing methods. *International Food Research Journal* 19 (3), 837-845.
- Michalska A., A. Wojdyło, B. Bogucka. 2016. The influence of nitrogen and potassium fertilisation on the content of polyphenolic compounds and antioxidant capacity of coloured potato *Journal of Food Composition and Analysis* 47 (2016) 69-75
- Mustafa H., N. Batoool, Z. Iqbal, E. Hasan and T. Mahmood. 2015. Effect of Fruit Position and Variable Temperature on Chemical Composition of Seeds in Brassica, Cotton, Sunflower and Maize Crops *Researcher* 7(11).
- Nandi S, S. Gangopadhyay, S. Ghosh. 2005. Production of medium chain glycerides from coconut and palm kernel fatty acid distillates by lipase- catalyzed reaction. *Enzyme and Microbial Technology* 36, 725-728.
- Nevin, K., Rajamohan, T. 2004. Beneficial effects of virgin coconut oil on lipid parameters and in vitro LDL oxidation. *Clinical Biochemistry*. 37: 830-835.
- Nevin, K., Rajamohan, T. 2006. Virgin coconut oil supplemented diet increases the antioxidant status in rats. *Food Chemistry*. 99: 260-266.
- Oropeza, C., Cordova, I., Chumba, A., Narváez, M., Sáenz, L., Ashburner, R., Harrison, N. 2011. Phytoplasma distribution in coconut palms affected by lethal yellowing disease. *Annals of Applied Biology*. 159: 109-117.
- Padilha, H. K. M., Pereira, E. d. S., Munhoz, P. C., Vizzotto, M., Valgas, R. A., Barbieri, R. L. 2015. Genetic variability for synthesis of bioactive compounds in peppers (*Capsicum annuum*) from Brazil. *Food Science and Technology*. 35: 516-523.
- Park, P., Goins, R. 1994. In situ preparation of fatty acid methyl esters for analysis of fatty acid composition in foods. *Journal of Food Science*. 59: 1262-1266.
- Petropoulos, S. A., Karkanis, A., Martins, N., & Ferreira, I. C. F. R. 2016. Phytochemical composition and bioactive compounds of common purslane (*Portulaca oleracea* L.) as affected by crop management practices. *Trends in Food Science & Technology*, 55, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.06.010>.
- Petropoulos, S. A., Fernandes, Â., Vasileios, A., Ntatsi, G., Barros, & I. Ferreira. 2018. Chemical composition and antioxidant activity of *Cichorium spinosum* L. leaves in relation to developmental stage. *Food Chemistry*, 239, 946-952. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.043>.
- Pola, W., Sugaya, S., Photchanachai, S. 2020. Influence of ostarvest temperatures on carotenoid biosynthesis and phytochemicals in mature green chili (*Capsicum annuum* L.). *Antioxidants*. 9: 203.



- Roopan, S. M. 2016. An overview of phytoconstituents, biotechnological applications, and nutritive aspects of coconut (*Cocos nucifera*). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 179(8), 1309-1324. doi: 10.1007/s12010-016-2067-y
- Rasheed, H. M., Khan, T., Wahid, F., Khan, R., Shah, A. J. 2015. Chemical composition and vasorelaxant and antispasmodic effects of essential oil from *Rosa indica* L. petals. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2015: 1-9.
- Romero, F., Martínez-Madrid, M., Pretel, M.T. 2006. Factores precosecha determinantes de la calidad y conservación de productos agrarios. V Simposio Ibérico VIII Nacional De Maduración Y Postrecolección. Orihuela Alicante, España, pp. 91-96.
- SAGARPA. 2014. Guía Técnica para la descripción varietal de cocotero (*Cocos nucifera* L.).
- Salunkhe, D., Kadam, S. 1995. *Handbook of fruit science and technology: production, composition, storage, and processing*. New York, USA CRC press.
- Sammy S. R., B. Freire de Aquino y J. Duarte de Freitas. 2008. Evaluación de la producción de palma de coco (*Cocos nucifera*) bajo fertirrigación con diferentes dosis de nitrógeno y potasio. *Agronomía Colombiana* 26(1), 127-133
- SIAP. 2017. Estadísticas de producción agrícola. Gobierno de México.
- SIAP. 2019. Estadísticas de producción agrícola. Gobierno de México.
- Singleton V.L., Rossi J.A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Viticult* 16: 144-158.
- Tremolieres A, Dubacq JP, Drapier D. 1982. Unsaturated fatty acids in maturing seeds of sunflower and rape: regulation by temperature and light intensity. *Phytochemistry* 21: 41 - 45.
- USDA. 2020. United States Department of Agriculture. Retrieved from <https://plants.usda.gov>
- Wahyuni, Y., Ballester, A.-R., Sudarmonowati, E., Bino, R. J., Bovy, A. G. 2013. Secondary metabolites of *Capsicum* species and their importance in the human diet. *Journal of Natural Products*. 76: 783-793.
- Yin X, X. Fu, H. Cheng, Wusigale, L. Liang. 2020.  $\alpha$ -Tocopherol and naringenin in whey protein isolate particles: Partition, antioxidant activity, stability and bioaccessibility. *Food Hydrocolloids* 106 (2020) 105895
- Zhu Y., Kerry L. Wilkinson, M. Wirthensohn. 2017 Changes in fatty acid and tocopherol content during almond (*Prunus dulcis*, cv. Nonpareil) kernel development. *Scientia Horticulturae* 225:150-155



## Chayotextle flour as raw material for prebiotic gluten-free cookies added with *Agave angustifolia* Haw fructans

Harina de Chayotextle como materia prima de galletas prebióticas libres de gluten adicionadas con fructanos de *Agave angustifolia* Haw

Wendy Magaly Arias Balderas<sup>a</sup>, Miguel Ángel Aguilar Méndez<sup>a</sup>, Marluci Palazzolli-da Silva<sup>b</sup>, Carmen Silvia Fávoro-Trindade<sup>b</sup>, Fernanda Maria Vanin<sup>b</sup>, Delia Quintana-Zavala<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada Unidad Legaria del Instituto Politécnico Nacional. Legaria 694. Colonia Irrigación, Alcaldía Miguel Hidalgo, Ciudad de México, C.P. 11500. México.

<sup>b</sup> Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo. Av. Duque de Caxias Norte, 225, Bairro Jardim Elite, Pirassununga, São Paulo, Brasil.

### ABSTRACT

Some plants, roots or tubers have been used as possible cereal substitutes in gluten-free cookies. Chayotextle is rich in starch and other compounds that could make it a potential ingredient for products aimed at the celiac population. In this study, we evaluated the effect of different mixtures of rice flour (RF) and Chayotextle flour (CF) on the final properties of cookies and the prebiotic capacity when adding agave fructans (AF). The properties of flour and cookies were determined. CF presented the highest emulsifying, water absorption and oil absorption (27.1 %, 66.22 % and 95.93 %, respectively) capacities. Cookies made with CF-AF reached the highest values in diameter (66.82 mm) and humidity (10.64%). By incorporating rice flour to this combination, cookies had the highest thickness (10.04 mm), specific volume (2.07 mL / g), and hardness (201.82 N). CF and the CF-AF formulation presented the ability to promote the growth of both strains studied: *Lactobacillus acidophilus* LA-3 and *Bifidobacterium animalis* ssp. *Lactis*, reaching values of up to 9.82 log<sub>10</sub> CFU/mL and 9.85 log<sub>10</sub> CFU/mL (CF) respectively, in a period of 24 h. The CF and the addition of FA improved cookies properties, and proved to be a possible prebiotic source.

**Keywords:** Agave fructan, prebiotic capacity, cereal substitute, root.

### RESUMEN

Algunas plantas, raíces o tubérculos han sido explotados como posibles sustitutos de cereales en galletas libres de gluten. El Chayotextle es rico en almidón y otros compuestos que podrían convertirlo en ingrediente potencial para productos dirigidos a la población celiaca. En este estudio, el efecto de distintas mezclas de harinas de arroz (RF) y Chayotextle (CF) sobre las propiedades finales de galletas y capacidad prebiótica al adicionar fructanos de agave (AF) fueron evaluadas. Las propiedades de las harinas y de galletas fueron determinadas. CF presentó la mayor capacidad emulsificante, de absorción de agua y de aceite (27.1 %, 66.22 % y 95.93 %, respectivamente). Las galletas realizadas con CF y FA alcanzaron los mayores valores en diámetro (66.82 mm)

y humedad (10.64%). Al incorporar harina de arroz a esta combinación las galletas mostraron el mayor espesor (10.04 mm), volumen específico (2.07 mL / g) y dureza (201.82 N). CF y la formulación CF-AF mostraron capacidad de promover el crecimiento de ambas cepas estudiadas: *L. acidophilus* LA-3 y *B. animalis* ssp. *Lactis*, alcanzando valores de 9.82 log<sub>10</sub> UFC/mL y 9.85 log<sub>10</sub> UFC/mL (CF) a las 24 h. CF y la adición de FA mejoraron las propiedades en galletas y mostraron ser una posible fuente prebiótica.

**Palabras clave:** fructano de agave, capacidad prebiótica, sustituto de cereales, raíz.

### INTRODUCTION

A functional food is that which provides some benefit to health and/or reduces the risk of disease (Pérez, Jaimez & Contreras, 2017). Currently, there is not a globally accepted definition for this type of food. However, it is known that this term began in Japan with the legalization of beneficial foods with healthy properties, under the FOSHU (Food for Specified Health Use) definition (Fuentes *et al.*, 2015). Likewise, the European Union created a FULOSE (Functional Food Science in Europe) regulatory commission, under the coordination of ILSI (International Life Sciences Institute), which defined as a functional food, that which has satisfactorily demonstrated that in addition to providing adequate nutrition, it provides some additional health benefit or reduces the risk of disease (Pérez, Jaimez & Contreras, 2017). On the other hand, the FDA classified some categories of food with additional properties, such as conventional foods, food additives, dietary supplements, etc (Sarmiento, 2006).

This type of food may contain a nutrient or non-nutrient component in which we can find prebiotics, such as some kinds of fiber, fructans, resistant starch oligosaccharides, to name a few, which are present in some fruits, tubers and roots of some plants (Chandrasekara y Kumar, 2016). Likewise, they may also contain some microorganisms that are considered probiotics (Leidi *et al.*, 2018), or some bioactive component such as antioxidant compounds, which gives them the character of functional food.

\*Autor para correspondencia: Delia Quintana Zavala  
 Correo electrónico: dquintana@ipn.mx

**Recibido: 11 de agosto de 2020**  
**Aceptado: 8 de febrero de 2021**

Chayotextle is a tuberized root of the chayote plant (*Sechium edule*) which grows in some states of Mexico and belongs to the cucurbit family (Cruz, 2017). It is characterized by containing large amounts of starch, dietary fiber and phenolic compounds that provide health benefits for those who consume it (Shiga *et al.*, 2015). Generally, this tuber is consumed as a cooked vegetable in traditional cuisine; however, its use in the form of flour extends its shelf life. In this form, it can be incorporated as an ingredient in bakery products by replacing, totally or partially, the common flours of some cereals such as corn or wheat (Moro *et al.*, 2018), which would allow the production of gluten-free products for people with celiac disease and those wanting to reduce gluten in their diet. Nowadays, there are no previous studies on Chayotextle flour use as an ingredient in bakery products, which is why there is no evidence about drawbacks in its use. However, the starch content in this type of flour, shows great characteristics that give the idea that it can be a good option in the development of gluten-free pasta or cookies production, with rapid digestibility, texture, and appearance, similar to the conventional starch obtained from wheat flour (González *et al.*, 2017). On the other hand, there are several studies about the use of fructooligosaccharides and fructans addition in the manufacturing of bakery products, mainly in bread. Fructans addition in bread improved the technological and sensory properties; bread increased its volume and decreased in crumb hardening rate (Drabińska *et al.*, 2016).

Fructooligosaccharides (FOS) are non-digestible oligosaccharides, which are able to resist the hydrolytic action of saliva and small intestine enzymes (Romano *et al.*, 2019). They are degraded in the colon by bacteria, producing short chain fatty acids such as acetate, propionate, and butyrate (De Paulo *et al.*, 2019).

Fructans are fructose polymers, which can contain up to 70 units of fructose (Ritsema y Smeekens, 2003), some of which may have a sucrose molecule at the terminal position. They have a linear or branched structure, linked together by  $\beta$ -(2,6) or  $\beta$ -(2,1) - fructosyl-fructose bonds, forming levana or inulin type fructans, respectively (Cuevas *et al.*, 2017). *Agave angustifolia*, a plant of the *Agavaceae* family, is an important source of fructans in Mexico. Various studies have shown branched series of neofructans, called agavines, in the plant stem (pineapple) (Santiago *et al.*, 2017), which are capable of promoting *bifidobacterium* and *lactobacillus* growth, and therefore, they can be considered as prebiotic agents (Koenen *et al.*, 2016). Agavins, also known as agave inulin neoseries, have a complex mixture of highly branched fructans with  $\beta$ -(2-1) and  $\beta$ -(2-6) bonds in their structure (Mancilla-Margalli and López, 2006). Likewise, different studies reveal that fructans, especially of the inulin type, impart good technological properties to the food matrix to which they are added (Da Silva and Conti-Silva, 2018). Consequently, their use in bread, cookies, yogurt, and dairy products is becoming more frequent (Luo *et al.*, 2017) thus improving appearance, texture, and in some cases, flavor (Rubel *et al.*, 2014).

The objective of this study was to analyze the physicochemical properties, texture and prebiotic functionality of different gluten-free cookies formulations, developed from chayotextle flour and rice flour with added *Agave angustifolia* Haw fructans.

## MATERIALS AND METHODS

### Raw materials

Chayotextle Flour (CF) was provided by the Organic Chemistry Laboratory (CICATA-Legaria, IPN, México), agave fructans (AF) were obtained from CEPROBI-IPN pilot plant (Yautepec, Morelos, México, Patent MX / a / 2015/ 016512), rice flour (RF) and other baking ingredients used (brown sugar, baking powder, salt, egg, and margarine) were purchased from a local market in Pirassununga (Sao Paulo, Brazil). De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) culture media from Acumedia (Michigan) was used. *Lactobacillus acidophilus* LA-3 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BLC-1 were purchased from Sacco, Italy.

### Physical and physicochemical properties of flours

**Moisture content:** It was determined through method 925.45 according to the AOAC (2006); samples of 3 g were used for the analysis and were placed into an oven at 100-105°C.

**pH:** It was determined through the AOAC method (2006); 10 g of flour sample was mixed with 100 mL of distilled water at 25°C. The mixtures were stirred in a Ma-420 incubator shaker, Marconi (Brazil), at 150 rpm for 30 min. Subsequently, they were allowed to stand for 10 min and the measurement was performed using a 3210 WTW pH potentiometer, Sensoglass (Germany).

**Instrumental color:** It was determined with a Hunter Lab MiniScan EZ colorimeter, Reston (USA), using the coordinates of the CIE-L\* a\* b\* system, where a\* negative = red and a\* positive = green; and b\* from negative (blue) to positive (yellow) (Alves *et al.*, 2018).

**Water activity (Aw):** It was measured in an AquaLab water activity meter, METER, AquaLab 3 T series (U.S.A); approximately 1 g of flour sample was placed into a special white capsule, so that it covered the complete surface of the capsule. Then, the capsules were introduced in the equipment and the measurements were performed at 25 °C.

### Technological properties of flours

The water absorption capacity (WAC) was performed according to Elmi *et al.* (2017) with some modifications; 5 g of flour samples were weighed in 50 mL Falcon tubes, mixed mechanically with 30 mL of distilled water in an automatic shaker (Multi Reax, Germany) at 1875 rpm for 30 min. After that, the tubes were centrifuged at 3 328 rpm for 25 min in a centrifuge (model Eppendorf 5430R, Germany). The supernatant was discarded carefully, and the tubes were placed in a Marconi MA385/3 drying oven (Piracicaba, Brazil) at 50 °C for 25 min. WAC was calculated according to the following equation:

$$AC (\%) = \left[ \frac{(\text{sediment sample weight (g)} - \text{initial sample weight (g)})}{\text{initial sample weight (g)}} \right] \times 100$$

The oil absorption capacity (OAC) was determined following the method used by Jan *et al.* (2016); 4 g flour samples were mixed with 24 mL of vegetable oil and shaken manually every 5 min for a period of 30 min. Afterwards, samples were centrifuged at 3 328 rpm for 25 minutes and the supernatant was discarded carefully. The OAC value was calculated using the following equation:

$$OAC (\%) = \left[ \frac{(\text{final weight} - \text{initial weight})}{(\text{initial weight})} \right] \times 100$$

The emulsifying capacity (EC) was determined through the method used by Chaparro *et al.* (2014); samples of 0.875 g were mixed with 12.5 mL of vegetable oil and 12.5 mL of distilled water, homogenized in an ultra turrax® IKA T25 digital (Germany) at 10 000 rpm for 1 min and centrifuged at 10 000 rpm for 5 min. The formed emulsion layer was measured with an Electronic Digital Vernier Caliper (Rosimo Stainless Hardened, Louisware 13, Japan) with a minimal resolution of 0.01 mm. The EC value was calculated using the following equation:

$$EC (\%) = \left[ \frac{(\text{emulsion layer height})}{(\text{total height of dispersion})} \right] \times 100$$

The emulsion stability (ES) was determined following the method used by Chaparro *et al.* (2014). Samples of 0.875 g were mixed with 12.5 mL of vegetable oil and 12.5 mL of distilled water, homogenized at 10 000 rpm for 1 min, the sample tubes then placed in a Marconi MA 159 hot water bath (Piracicaba, Brazil) at 80 °C for 30 min, and then cooled to room temperature for 25 min. The ES was calculated using the following equation:

$$ES (\%) = \left[ \frac{(\text{height of emulsion layer after heating})}{(\text{total height of dispersion})} \right] \times 100$$

### Cookie formulation

Different cookie formulations were prepared (Table 1) according to Alves *et al.* (2018), with some modifications. Sugar and margarine were mixed for 1 min in a mixer bowl (3.5 L) using a Kitchen Aid KPM5 (Ohio, U.S.A) with a flat beater. Then, the other ingredients were added and mixed for 5 min. Subsequently, the dough was rolled to a 5 mm thickness, followed by cutting into 5-cm diameter circular portions. Cookies were baked at 130 °C for 15 min and cooled for 45 min. After cooling, cookies were packaged in laminated pouches.

**Table 1.** Cookies composition (g / 100 g) in formulations with rice and chayotextle flour

**Tabla 1.** Composición (g / 100 g) de galletas en formulaciones con harinas de arroz y chayotextle

Formulation	Ingredients (g/ 100 g)							
	CF	RF	AF	Brown sugar	Butter	Egg white	Baking powder	Salt
RF-100	0	100	0	14.5	23.2	12.0	0.2	0.1
CF-100	100	0	0	14.5	23.2	12.0	0.2	0.1
RF-CF-AF	50	50	12	14.5	23.2	12.0	0.2	0.1
RF-CF	50	50	0	14.5	23.2	12.0	0.2	0.1
CF-AF	100	0	12	14.5	23.2	12.0	0.2	0.1

RF: Rice flour; CF: Chayotextle flour; AF: Agave fructans

### Cookies characterization

Diameter, thickness and spreading factor: Cookie samples diameter and thickness were determined using a micrometer in eight different points of the cookie. The spreading factor (S.F) represents the ratio between diameter and thickness, and was calculated using the following equation:

$$S.F = \frac{\text{diameter (mm)}}{\text{thickness (mm)}}$$

**Specific volume:** The specific volume of cookies was determined using a VolScan Stable Micro system, Godalming (United Kingdom) equipment. The measurements were obtained directly from the equipment; the units were expressed in g/mL (Smewing, 2016).

**Hardness:** Cookies hardness was determined according to Bárcenas and Rosell (2005), using a Texture Analyzer texturometer, TAXT2i (United Kingdom), with a 5 kg load cell, a 2.5 cm diameter P/25 cylinder device, and a pre- and post-test speed of 2.0 mm/s and 10.0 mm/s, respectively.

**Moisture, pH and color** were determined following the same procedure as for flours. To measure the pH of cookies, they were ground into flour as described previously, from which 10 g of powdered samples were weighed, and 100 mL of distilled water was added to each sample.

### Prebiotic effect

The microbiological test used to evaluate prebiotic effect in CF and the CF-AF cookie formulation was according to the methodology proposed by China *et al.* (2012), with some modifications. For this purpose, the microorganisms were activated in 10 mL of MRS broth and incubated at 37 °C for 20 h. Afterwards, cells were collected by centrifugation at 7 000 rpm, at 10 °C for 5 min and washed twice with 2% sodium citrate solution. Finally, cells were re-suspended in a 2% sodium citrate solution to approximately 9 log CFU/mL.

MRS broth was supplemented with 3% CF or 3% CF-AF cookie formulation, while MRS broth without supplemen-



tation was used as a control. Then, 10  $\mu$ L of each bacterial suspension were added to supplemented MRS broth and control. Tubes were incubated at 37 °C for 3 days. Finally, aliquots for each tube were removed during incubation ( $t = 0, 24, 48$  and  $72$  h) to perform the bacterial count, using an electronic bacteria counter, taking into account the colonies that showed between 10-50 UFC.

### Statistical analysis

Statistical analysis was performed using a completely randomized design with Design Expert 6.0 software and expressed as the average  $\pm$  the standard deviation of three replicates. Results were analyzed using an analysis of variance (one way-ANOVA) checking that the distribution of the data was normal. Then, a comparison of means by the Tukey test (IS Infostat Version 2017 software) with a significance level of  $p < 0.05$  was applied.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Physicochemical properties of flours

Table 2 shows the results obtained from the physical and physicochemical properties of CF and RF. CF had a higher moisture content compared to RF. This behavior could be explained due to the fact that CF was obtained from a tuberous root whose main component is water (74.2 %, approximately), which was subjected to oven drying at low temperature (50 °C), and therefore, it could have conserved part of the initial moisture. On the other hand, RF was obtained from a cereal that normally contains an initial moisture  $< 14$  %, although that value may change depending on the variety or type of rice. The moisture content for Brazilian rice flour obtained in this study was 8.62 %, however, Hu *et al.* (2020a) reported a moisture of 12.26 % in Japonica rice flour and Hamdani *et al.* (2020), found a moisture of approximately 9.2 %. Therefore, the moisture content value obtained in this study is among these reported values. Statistically a significant difference was found with a value of  $P < 0.05$  in the moisture content between both flours. The pH values obtained from both flours were neutral, while in water activity, no significant difference was found. The moisture content of flours is of great importance in the production of cookies and bakery products, because if the water content is insufficient in the cookie dough, most of the starch granules do not gelatinize during the cookie baking process. This could lead to more consistency or hardness and consumer rejection. On the other hand, the flours must not contain more than 14% moisture because this promotes bacterial growth (Mancebo *et al.*, 2016).

**Table 2.** Physical and physicochemical properties of chayotextle and rice flours

**Tabla 2.** Propiedades físicas y fisicoquímicas de harinas de chayotextle y arroz

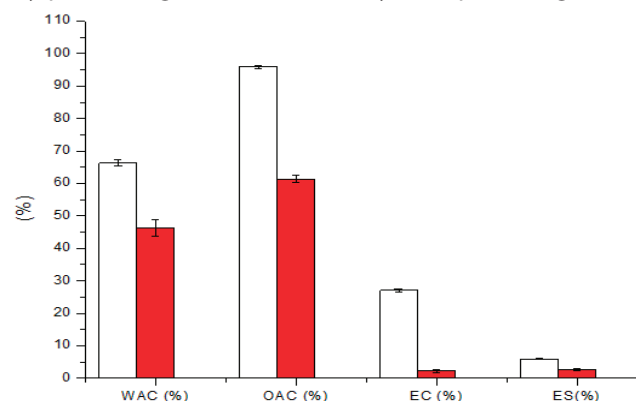
Parameter	Chayotextle Flour	Rice Flour
Moisture Content (%)	9.85 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>	8.62 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>
$a_w$	0.43 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.41 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>
pH	7.09 $\pm$ 0.001 <sup>a</sup>	6.77 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>
$L^*$	82.79 $\pm$ 2.83 <sup>b</sup>	86.64 $\pm$ 2.79 <sup>a</sup>
$a^*$	0.95 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	0.40 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>
$b^*$	17.65 $\pm$ 0.53 <sup>a</sup>	7.72 $\pm$ 0.58 <sup>b</sup>

Values expressed as mean  $\pm$  standard deviation. Different letters show significant difference by Tukey test ( $p < 0.05$ ). Where  $L^*$ ,  $a^*$  and  $b^*$  are coordinates of the CIE-Lab system.

The color results showed that RF presented a higher luminosity value. The values of  $a^*$  and  $b^*$  in both flours were positive, showing closer proximity to red and yellow, respectively. The highest  $a^*$  and  $b^*$  values were obtained with CF, resulting in a darker color than RF. This behavior could be the result of the enzymatic darkening that the Chayotextle suffered during the peeling and cutting process, since it contains a significant amount of the Polyphenoloxidase enzyme. Likewise, this could be due to the drying temperature (50° C), which could cause some darkening reactions in the flour.  $L^*$ ,  $a^*$  and  $b^*$  showed significant differences with a value of  $P < 0.05$ . The difference in the color of the flours could represent an inconvenience of mixing them in the preparation of cookies, resulting in a dark color, which could be unpleasant for consumers.

### Flour technological properties

Technological properties have great relevance in bakery products because they play an important role in cookie quality. These properties show an idea on how the effect in dough rheology, spread and water absorption during baking will be (Mancebo *et al.*, 2016). Figure 1 presents the technological properties for CF and RF. CF showed a higher water absorption capacity than RF. This behavior could be explained by the large amount of starch that Chayotextle contains in its composition (65-72%) (Shiga *et al.*, 2015) and its chemical characteristics. Chayotextle starch contains a significant amount of phosphorous attached to its structure in the form of phosphate groups, which provides a strong hydrophilic character that allows it to absorb and retain large amounts of water, increasing the capacity of water bonds. These characteristics of Chayotextle starch are consistent with that reported by Jiménez *et al.* (2007). While rice flour, despite containing a significant amount of starch, it generally produces gels with a tendency for rapid retrogradation



**Figure 1.** Technological properties of Chayotextle and rice flours. White-Chayotextle flour; Red-rice flour. WAC: Water Absorption Capacity, OAC: Oil Absorption Capacity, EC: Emulsifying Capacity; ES: Emulsion Stability. Different letters at the same parameter, show significant difference by Tukey test ( $p < 0.05$ ).

**Figura 1.** Propiedades tecnológicas de harinas de chayotextle y arroz. Blanco-harina de chayotextle; Rojo-harina de arroz. WAC: Capacidad de absorción de agua, OAC: Capacidad de absorción de aceite, EC: Capacidad emulsificante; ES: Estabilidad de la emulsión. Letras diferentes en un mismo parámetro, muestran diferencia significativa por prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ).

with low water retention. Hu *et al.* (2020b) reported that this type of behavior in the production of rice flour gels is mainly due to the structure of the starch, its size and its amylose-amylopectin proportion. Gels with lower amylose content are responsible for generating lower viscosity. There was a higher oil retention capacity in CF than in RF, which could be due to the formation of starch-lipid complexes, carbohydrates-lipids, and fiber content (0.4%) present (Vieira *et al.*, 2019). The emulsifying capacity and emulsion stability values were higher for CF. This behavior is the result of large values of oil and water retention capacity, which is why the results show that CF has a great ease to interact with both media. A significant difference was found for the case of all measured properties.

### Physical properties of cookies

Table 3 shows the results of the physical properties analyzed for the different formulations of cookies. The values of diameter, thickness and specific volume were significantly influenced by the presence of CF, which caused a significant increase in the values of the formulations containing it (63.42 to 63.79 mm in diameter, 8.56 mm thick and 1.35 specific volume). However, the highest values correspond to the cookies containing both CF and FA (65.10 to 66.82 mm in diameter, 9.36 to 10.04 mm thick and 1.72 to 2.07 mm specific volume). This is possibly because fructans have the characteristic of being highly soluble, and thus promote the formation of gels that provide better baking characteristics in the cookies. Santiago *et al.* (2017) reported a similar behavior in wheat cookies with agave fructans.

**Table 3.** Physical and texture properties of cookies  
**Tabla 3.** Propiedades físicas y texturales de galletas

Parameter	Formulation				
	RF-100	CF-100	RF-CF-AF	RF-CF	CF-AF
Diameter (mm)	61.06 ± 1.08 <sup>d</sup>	63.42 ± 2.06 <sup>c</sup>	65.10 ± 1.11 <sup>b</sup>	63.79 ± 2.01 <sup>c</sup>	66.82 ± 0.44 <sup>a</sup>
Thickness (mm)	7.75 ± 0.45 <sup>d</sup>	8.56 ± 0.76 <sup>c</sup>	10.04 ± 0.81 <sup>a</sup>	7.14 ± 0.86 <sup>d</sup>	9.36 ± 0.95 <sup>b</sup>
Spreading factor	7.90 ± 0.42 <sup>b</sup>	7.47 ± 0.85 <sup>b</sup>	6.53 ± 0.57 <sup>c</sup>	9.04 ± 1.03 <sup>a</sup>	7.21 ± 0.78 <sup>b</sup>
Specific volume (mL/g)	1.31 ± 0.05 <sup>c</sup>	1.35 ± 0.68 <sup>c</sup>	2.07 ± 1.07 <sup>a</sup>	1.35 ± 0.68 <sup>c</sup>	1.72 ± 0.87 <sup>b</sup>
Hardness (N)	79.35 ± 7.07 <sup>b</sup>	87.73 ± 18.75 <sup>b</sup>	201.82 ± 58.36 <sup>a</sup>	122.55 ± 6.66 <sup>b</sup>	72.67 ± 4.83 <sup>b</sup>
Moisture (%)	3.66 ± 0.16 <sup>d</sup>	7.98 ± 0.20 <sup>b</sup>	6.67 ± 0.22 <sup>c</sup>	10.43 ± 0.66 <sup>a</sup>	10.64 ± 0.07 <sup>a</sup>
pH	6.60 ± 0.02 <sup>e</sup>	6.97 ± 0.01 <sup>b</sup>	6.62 ± 0.01 <sup>d</sup>	7.04 ± 0.01 <sup>a</sup>	6.85 ± 0.01 <sup>c</sup>
L*	64.68 ± 0.31 <sup>a</sup>	57.63 ± 0.83 <sup>d</sup>	60.62 ± 2.52 <sup>c</sup>	63.03 ± 1.71 <sup>b</sup>	59.54 ± 1.09 <sup>c</sup>
a*	9.76 ± 0.46 <sup>d</sup>	14.71 ± 0.37 <sup>a</sup>	13.90 ± 1.06 <sup>b</sup>	10.84 ± 0.82 <sup>c</sup>	13.88 ± 0.46 <sup>b</sup>
b*	33.65 ± 0.57 <sup>d</sup>	38.62 ± 0.45 <sup>a</sup>	36.81 ± 0.28 <sup>b</sup>	35.06 ± 2.53 <sup>c</sup>	35.96 ± 0.34 <sup>b c</sup>

Values expressed as mean ± standard deviation. Different letters show significant difference by Tukey test ( $p < 0.05$ ). Where L\*, a\* y b\* coordinates of the CIE-Lab system; RF: Rice flour; CF: Chayotextle flour; AF: Agave fructans.

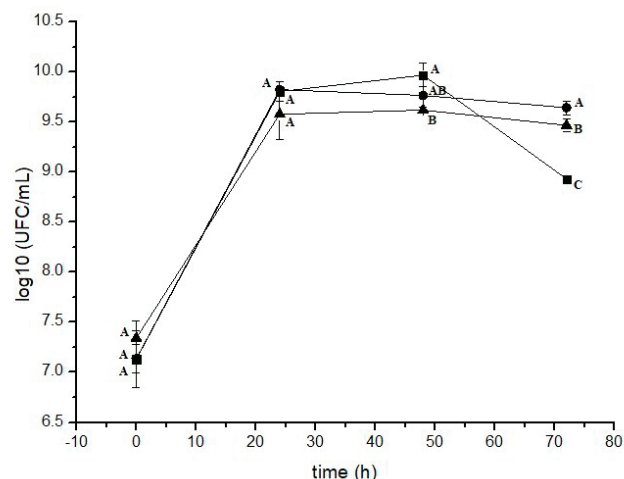
The spreading factor is an important parameter in the evaluation of cookies since, according to Giuberti *et al.* (2017), cookies with higher spreading factor values are more desirable to consumers, because it represents the ratio between the diameter and the thickness of cookies. Likewise, it gives the impression of expansion during baking. The results showed that the combination of CF and RF potentiate this parameter, obtaining values from 6.4 to 9.04. These values are higher than those found by Giuberti *et al.* (2017) in gluten-free rice cookies and gluten-free rice cookies with resistant starch, and by Kaur *et al.* (2017) in gluten-free flaxseed flour cookies, who reported values from 4.9 to 5.2 and 3.3 to 4.15, respectively. However, the value decreased in the formulations with AF. No significant difference was found between the hardness values of formulations that only contained a single type of flour (79.35 N in RF and 87.73 N in CF) or a combination of CF and RF (122.55 N). Despite this, there was an influence on the hardness parameter by AF, since the RF-CF-AF formulation showed the highest value, 201.82 N. This could be explained by the possible formation of complexes between the AF components and protein fractions of both flours (Santiago *et al.*, 2017). The pH values did not show significant difference, constantly very close to neutral. According to the NMX-F-006-1983, these results are within the accepted quality pH parameters, of between 6.0 and 8.0 for cookies.

The color values obtained for L\* and a\* showed a significant difference for all formulations. Likewise, in general, all the formulations presented positive a\* and b\* values, with a trend towards reds and yellows. RF presented the highest

L\* value (64.68), followed by the formulations containing AF (60.62 RF-CF-AF and 59.54 CF-AF). While the CF-100 formulation made with only CF showed the lowest value (57.63). An inverse behavior was found for a\* where cookies prepared only with RF, showed the lowest value (9.76). Only cookies made with a single type of flour showed a significant difference for b\* (33.65 in RF and 38.62 in CF). In general, the presence of CF produced a darker color in the cookies, perceived with the naked eye. This could be because CF has a high carbohydrate content, which in the presence of proteins promotes the Maillard reactions and the generation of brown compounds during baking. Kaur *et al.* (2019) reported a similar effect in cookies made from flaxseed flour. Normally, consumers prefer cookies with similar color than wheat flour cookies, for this reason, the darkening of the cookies made with Chayotextle flour can be a positive effect (Mancebo *et al.*, 2016).

### Prebiotic capacity

The prebiotic capacity was measured only on CF and CF-AF formulations because these displayed favorable cookie properties, such as greater values of diameter, thickness, specific volume. *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* constitute a major part of the intestinal microflora in animals and humans, playing an important role as a barrier to prevent pathogenic bacterium entrance. Likewise, a selective simulation of the growth and activity of beneficial microorganisms can be possible by addition of prebiotics (China *et al.*, 2012). Fig. 2 shows the results obtained for *L. acidophilus* LA-3 in the period from 0 to 24 h, where the exponential phase was obtained and there was an increase in the amount of CFU for both samples (CF and CF-AF formulations). The probiotic strain consumed the glucose in the medium, increasing in two logarithmic cycles, reaching a population density of 9.8 log<sub>10</sub> CFU / mL (glucose), 9.82 log<sub>10</sub> CFU / mL (CF) and 9.58 log<sub>10</sub> CFU / mL (CF-AF). These results are similar to those obtained by Ayala *et al.* (2018), who reported values of 9.55 log<sub>10</sub> CFU / mL (glucose), 9.34 log<sub>10</sub> CFU / mL (agave inulin) for *Lactobacillus casei* and 9.36 log<sub>10</sub> CFU / mL (agave inulin) for *Lactobacillus salivarius*. The study of inulin fermentation by lactic acid bacteria by García *et al.* (2007) mentioned that there is a favorable consumption and good fermentability of inulin and fructooligosaccharides by lactic acid bacteria, which include different species of *Lactobacillus*, *Streptococcus* and *Bifidobacterium*. This behavior has been studied by various researchers who have concluded that these bacterial strains have a mechanism capable of hydrolyzing the β (2,1) bonds present in inulin. At 24 h, no significant difference was found between the samples, since there was no increase in the growth of microorganisms. In the 24-48 h interval, a number of probiotic colonies remained in the stationary phase for CF-AF, while for CF there was a slight decline in the growth curve. At 72 h of incubation, CF presented a higher CFU / mL value than the media supplemented only with glucose and AF, probably because this flour represented a richer nutrient medium and carbon source for *L. acidophilus*



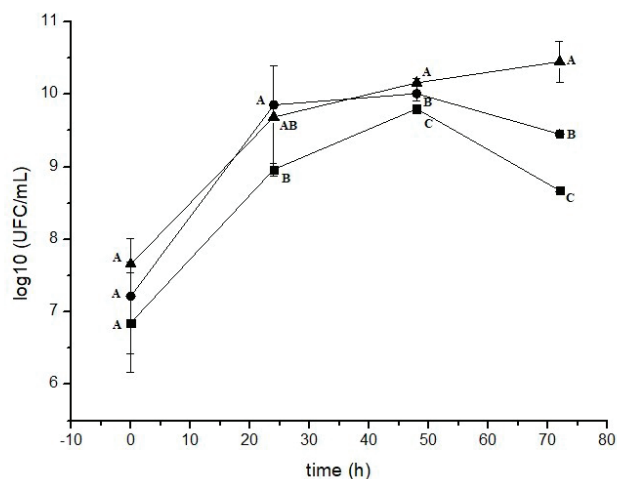
**Figure 2.** Prebiotic effect of *Lactobacillus acidophilus* in: MRS control supplemented with glucose (■); MRS supplemented with 3 % Chayotextle flour (●); MRS supplemented with 3 % Chayotextle and fructans flour (▲). Different letters at the same times, show significant difference by Tukey test ( $p < 0.05$ ).

**Figura 2.** Efecto prebiótico de *Lactobacillus acidophilus* en: Control MRS suplementado con glucosa (■); MRS suplementado con harina de chayotextle al 3 % (●); MRS suplementado con harina de chayotextle y fructanos al 3 % (▲). Letras diferentes a los mismos tiempos, muestran diferencia significativa por prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ).

LA-3. Meanwhile, for the glucose-enriched sample (control), the population density decreased one logarithmic cycle in the 48-72 hours interval, reaching a value of 8.93 log<sub>10</sub> CFU / mL. Even so, it is likely that if the incubation time had been increased by more than 72 h, the probiotic bacteria would still have remained longer in the CF sample.

A notable increase in the bacterial population of both samples was obtained for *B. animalis* subsp. *Lactis* during the 0-24 h interval (logarithmic phase), as shown in Fig. 3. Bacterial density was increased in a logarithmic cycle for media enriched with glucose and CF-AF, reaching values of 8.96 log<sub>10</sub> CFU / mL and 9.68 log<sub>10</sub> CFU / mL, unlike that obtained with *Lactobacillus acidophilus*, where it increased in two cycles. On the other hand, for CF the increase was two logarithmic cycles, obtaining a value of 9.85 log<sub>10</sub> CFU / mL. Despite this, no significant difference was found in the number of CFUs at 24 h between samples. During the 24-48 h period, the stationary phase occurred in the CF sample. While for the CF-AF formulation there was a slight increase in the probiotic population at 48 h. The number of CFU in *B. animalis* subsp. *Lactis* decreased slightly in the medium added with CF from 48-72 h, which showed that at that time the bacteria had consumed most of the substrate and therefore began to enter the bacterial death phase. Meanwhile, the probiotic population in the medium supplemented with CF-AF continued to increase. This could be explained by the fact that bifidobacteria prefers consuming the short and simple sugar chains first, and then continue with the consumption of other oligofructose chains. Van der Meulen *et al.* (2006) found this type of behavior when analyzing the mechanism





**Figure 3.** Prebiotic effect of *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* in: MRS control supplemented with glucose (■); MRS supplemented with 3 % Chayotextle flour (●); MRS supplemented with 3 % Chayotextle and agave fructans flour (▲). Different letters at the same time, show significant difference by Tukey test ( $p < 0.05$ ).

**Figura 3.** Efecto prebiótico de *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* en: Control MRS suplementado con glucosa (■); MRS suplementado con harina de chayotextle al 3 % (●); MRS suplementado con harina de chayotextle y fructanos al 3 % (▲). Letras diferentes a los mismos tiempos, muestran diferencia significativa por prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ).

of oligofructose consumption by *Bifidobacterium spp.* In the same way, Ayala *et al.* (2018) reported that bacteria of the *Bifidobacterium* genus have a high affinity for low molecular weight fructans, unlike *Lactobacillus* that ferment high and low molecular weight fructans.

The control medium, supplemented with glucose, showed an evident decrease in the number of CFUs, decreasing in a logarithmic cycle from 48-72 h, which indicated that the *Bifidobacteria* consumed all the glucose in the medium and consequently began to die. Van der Meulen *et al.* (2006) reported that glucose and fructose are not good substrates for the growth of the *Bifidobacterium animalis* DN 173 010 strain.

In general, a higher growth was obtained for both strains in the media supplemented with CF and CF-AF at 72 h, reaching population density values of 9.45 log<sub>10</sub> CFU / mL and 10.45 log<sub>10</sub> CFU / mL respectively, while for glucose it was 8.67 log<sub>10</sub> CFU / mL. However, the prebiotic capacity of the substrate depended on the type of bacterial strain. This coincides with Vieira *et al.* (2017), who suggested that the fermentability of the substrate depends on the type of substrate and strain species used, evaluating the growth of probiotic bacteria on different substrates of fruit by-products, soybeans and amaranth. They found that the *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Lactobacillus ramosus* LGG species had a reduction in their population density at 24 and 48 hours of incubation for plant substrates, while the strains of *Bifidobacterium animalis* BB-12 and *Bifidobacterium longum* presented an increase in the bacterial population for all substrates from fruits and vegetables.

## CONCLUSIONS

The agave fructans showed a good performance in the preparation of cookies, since they improved the physical and textural characteristics of the product while increasing the diameter and thickness. The addition of AF represents a benefit for CF cookies, since they promote the growth of both microorganisms: *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. Finally, we demonstrated that Chayotextle flour had a prebiotic effect for both strains; therefore, this type of flour may be a promising alternative for bakery products because it has prebiotic characteristics not found in other types of flour.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The first author wishes to thank CONACYT Mexico, for the scholarship support provided during the research study. To the coordination of academic cooperation of the Instituto Politécnico Nacional, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos (CEPROBI) for donating the agave fructans used in this project and the FZEA University of Sao Paulo, Brazil for the support in its facilities.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

## REFERENCES

- AOAC. 2006. Official Methods of analysis. 18th ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington, D.C.
- Ayala Monter, M. A., Hernández Sánchez, D., Pinto Ruiz, N., González Muñoz, Sergio S., Bárcena Gama, J. R., Hernández Mendo, O., & Torres Salado, N. (2018). Efecto prebiótico de dos fuentes de inulina en el crecimiento in vitro de *Lactobacillus salivarius* y *Enterococcus faecium*. Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias, 9(2), 346-361. <http://dx.doi.org/10.22319/rmcp.v9i2.4488>.
- Bárcenas, M. E. & Rosell, C. M. (2005). Effect of HPMC addition on the microstructure, quality and aging of wheat bread. Food Hydrocolloids, 19(6), 1037-1043. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2005.01.005>
- Chandrasekara, A. & Kumar, T. J. (2016). Roots and Tuber Crops as Functional Foods: A Review on Phytochemical Constituents and Their Potential Health Benefits. International Journal of food Science. 1-15. <https://doi.org/10.1155/2016/3631647>
- Chaparro, S.P., Tavera, M.L., Martínez, J.J & Gil, J.H. (2014). Propiedades funcionales de la harina y de los aislados proteicos de la semilla de guanábana (*Annona muricata*). Revista U.D.C.A. Actualidad & Divulgación Científica, 17(1), 151-159. <https://doi.org/10.31910/rudca.v17.n1.2014.950>
- China, R., Mukherjee, S., Sen, S, Bose, S., Datta, S., Koley, H., Ghosh, S., & Dhar, P. (2012). Antimicrobial activity of *Sesbania grandiflora* flower polyphenol extracts on some pathogenic bacteria and growth stimulatory effect on the probiotic organism *Lactobacillus acidophilus*. Microbiological Research, 167(8), 500-506. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2012.04.003>
- Cruz Villegas, R. (2017). Estudios científicos relacionados a la raíz tuberosa de chayote (*Sechium edule*), revisión. Boletín de ciencias agropecuarias Del ICAP, 3(5). <https://doi.org/10.29057/icap.v3i5.2061>



- Cuevas-Juárez, E., Ávila-Fernández, A., & López-Munguía, A. (2017). Identification of enzymatic activities involved in agave fructan consumption by *Bifidobacterium longum* subsp. infantis ATCC 15697. *Journal of functional foods*, 35, 267-278. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.05.048>
- Da Silva, T. F. & Conti-Silva, A. C. (2018). Potentiality of gluten-free chocolate cookies with added inulin/oligofructose: Chemical, physical and sensory characterization. *LWT- food Science and Technology*, 90, 172-179. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.12.031>
- De Paulo Farias, D., Fernandes de Araújo, F., Neri-Numa, I.A & Pastore, G.M. (2019). Prebiotics: Trends in food, health and technological applications. *Trends in food Science & Technology*, 93, 23-35. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.09.004>
- Drabińska, N., Zieliński, H. & Krupa-Kozak, U. (2016). Technological benefits of inulin-type fructans application in gluten-free products. *Trends in Food Science & Technology*, 56, 149-157. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.08.015>
- Elmi Sharlina, M.S., Yaacob, W.A., Lazim, A.M., Fazry, S., Lim, S. J., Abdullah, S., Noordin, A., Kumaran, M. (2017). Physicochemical properties of starch from *Discorea pyrifolia* tubers. *Food Chemistry*, 220, 225-232. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.196>
- Fuentes-Berrio, L., Acevedo-Correa, D. & Gelvez-Ordoñez, V.M. (2015). Alimentos funcionales: Impacto y retos para el desarrollo y bienestar de la sociedad colombiana. *Biocología en el sector agropecuario y agroindustrial*, 13(2), 140-149. [http://dx.doi.org/10.18684/BSAA\(13\)140-149](http://dx.doi.org/10.18684/BSAA(13)140-149).
- García, Y., Boucourt, R., Albelo, N. & Nuñez, O. (2007). Fermentación de inulina por bacterias ácido-lácticas con características probióticas. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 41(3), 263-266. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193017693011>
- Giuberti, G., Marti, A., Fortunati, P & Gallo, A. (2017). Gluten free rice cookies with resistant starch ingredients from modified waxy rice starches: Nutritional aspects and textural characteristics. *Journal of Cereal Science*, 76, 157-164. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2017.06.008>
- González Victoriano, L., Hernández Uribe, J., & Güemes Vera, N. (2017). Chayotextle (*Sechium edule*), posible ingrediente en la elaboración de los productos libres de gluten. *Boletín De Ciencias Agropecuarias Del ICAP*, 3(5). <https://doi.org/10.29057/icap.v3i5.2065>.
- Hamdani, A.M., Wani, I.A & Bhat, N.A. (2020). Gluten free cookies from rice-chickpea composite flour using exudate gums from acacia, apricot and karaya. *Food Bioscience*, 35. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100541>
- Hu, W. X., Chen, J., Xu, F., Chen, L., & ZhaoJ-W. (2020a). Study of crystalline, gelatinization and rheological properties of Japonica rice flour as affected by starch fine structure. *International Journal of Biological Macromolecules*, 148, 1232-1241. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.11.020>
- Hu, W. X., Chen, J., Zhao, J. W., Chen, L. & Wang, Y. H. (2020b). Effect of the addition of modified starch on gelatinization and gelation properties of rice flour. *International Journal of Biological Macromolecules*. 153, 26-35. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.11.020>
- Jan, R., Saxena, D.C. & Singh, S. (2016). Physicochemical, textural, sensory and antioxidant characteristics of gluten free cookies made from raw and germinated *Chenopodium (Chenopodium album)* flour. *LWT- Food Science and Technology*, 71, 281-287. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.04.001>
- Jiménez-Hernández, J., Salazar-Montoya, J.A. & Ramos-Ramírez, E.G. (2007). Physical, chemical and microscopic characterization of a new starch from chayote (*Sechium edule*) tuber and its comparison with potato and maize starches. *Carbohydrate polymers*, 68, 679-686. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.07.035>
- Kaur, P., Sharma, P., Kumar, V., Panghal, A., Kaur, J., & Gat, Y. (2017). Effect of addition of flaxseed flour on phytochemical, physicochemical, nutritional, and textural properties of cookies. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 30, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2017.12.004>
- Koenen, M. E., Cruz Rubio, J. M., Mueller, M., & Venema, K. (2016). The effect of agave fructan products on the activity and composition of the microbiota determined in a dynamic *in vitro* model of the human proximal large intestine. *Journal of Functional Foods*, 201-210. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.01.018>
- Leidi, E.O., Altamirano A. M., Mercado, G., Rodríguez, J. P., Ramos, A., Alandia, G., Sørensen, M., & Jacobsen, S.-E. (2018). Andean roots and tubers crops as sources of functional foods. *Journal of Functional Foods*, 51, 86-93. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.10.007>
- Luo, D., Li, Y., Xu, B., *et al.* (2017). Effects of inulin with different degree of polymerization on gelatinization and retrogradation of wheat starch. *Food Chemistry*, 229, 35-43. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.058>
- Mancebo, C.M., Rodríguez, P. & Gómez, M. (2016). Assessing rice flour-starch-protein mixtures to produce gluten free sugar-snap cookies. *LWT- food Science and Technology*, 67, 127-132. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.11.045>.
- Mancilla-Margalli, N. A. & López, M. G. (2006). Water-soluble carbohydrates and fructan structure patterns from *Agave* and *Dasyllirion* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 7832-7839. <https://doi.org/10.1021/jf060354v>
- Moro, T. M. A., Celegatti, C. M., Pereira, A. P. A., Lopes, A. S., Barbin, D. F., Pastore, G. M. & Cleici, M. T. P. S. (2018). Use of burdock root flour as a prebiotic ingredient in cookies. *LWT- Food and Science Technology*, 90, 540-546. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.12.059>
- NMX-F-006-1983. Alimentos. galletas. Food. cookie. Normas mexicanas. Dirección General de Normas.
- Pérez Flores, J. G., Jaimez Ordaz, J., & Contreras López, E. (2017). ¿Qué es un alimento funcional? *Pädi Boletín Científico De Ciencias Básicas E Ingenierías Del ICBI*, 4(8). <https://doi.org/10.29057/icbi.v5i8.2047>
- Ritsema, T. & Smeekens, S. (2003). Fructans: beneficial for plants and humans. *Current Opinion in Plant Biology*, 6, 223-230. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(03\)00034-7](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(03)00034-7)
- Romano, N., Sciammaro, L., Mobili, P., Puppo, M. C., & Gomez-Zavaglia, A. (2019). Flour from mature *Prosopis nigra* pods as suitable substrate for the synthesis of prebiotic fructo-oligosaccharides and stabilization of dehydrated *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Food Research International*, 121, 561-567. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.12.016>
- Rubel, I. A., Pérez, E. E., Genovese, D. B., & Manrique, G. D. (2014). *In vitro* prebiotic activity of inulin-rich carbohydrates extracted

- from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers at different storage times by *Lactobacillus paracasei*. Food Research International, 62, 59-65. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.02.024>
- Santiago-García, P. A., Mellado-Mojica, E., León-Martínez, F. M. & López, M.G. (2017). Evaluation of Agave angustifolia fructans as fat replacer in the cookies manufacture. LWT-Food Science and Technology, 77, 100-109. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.028>
- Sarmiento Rubiano, L. A. (2006). Alimentos funcionales, una nueva alternativa de alimentación. Orinoquia, 10 (1), 16-23. Consulted December 21, 2020. ISSN: 0121-3709. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=896/89610103>
- Shiga, T.M., Peroni-Okita, F. H. G., Carpita, N.C., Lajolo, F. M., & Cordenunsi, B. R. (2015). Polysaccharide composition of raw and cooked Chayote (*Sechium edule Sw.*) fruits and tuberous roots. Carbohydrate polymers, 130, 155-165. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.04.055>
- Smewing, J. (2016). AACCI approved methods technical committee report on the collaborative study for a new AACCI method (10-16.01): Volumetric and dimensional profile determination of baked products using laser topography-volscan profile. Cereal Foods World, 61(1), 18-23. <https://doi.org/10.1094 / CFW-61-1-0018>
- Van der Meulen, R., Makras, L., Verbrugghe, K., Adriany, T., & De Vuyst, L. (2006). In vitro kinetic analysis of oligofructose consumption by Bacteroides and Bifidobacterium spp. Indicates different degradation mechanisms. Applied and Environmental Microbiology, 72(2), 1006-1012. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.2.1006-1012.2006>
- Vieira, A.D.S., Bedani, R., Albuquerque, M.A.C., Biscola, V., & Saad, S.M.I. (2017). The impact of fruit and soybean by-products and amaranth on the growth of probiotic and starter microorganisms. Food Research International, 97, 356-363. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.04.026>

## Crecimiento y producción de enzimas lacasas de *Pleurotus ostreatus* durante el proceso de degradación de bisfenol a

*Pleurotus ostreatus* growth and laccase enzymes production during the degradation process of bisphenol a

Georgina Pérez-Montiel<sup>a</sup>, José Luis Torres-García<sup>a</sup>, Libertad Juárez-Santacruz<sup>b</sup>, Diana Verónica Cortés-Espinosa<sup>c</sup>, Jorge Rubio-Piña<sup>d</sup>, Miriam Ahuactzin-Pérez<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratorio de Biología Experimental, Facultad de Agrobiología, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Autopista Tlaxcala-San Martín Km 10.5, C.P. 90120, San Felipe Ixtacuixtla, Tlaxcala, México.

<sup>b</sup> Centro de Investigación en Genética y Ambiente, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Autopista Tlaxcala-San Martín Km 10.5, C.P. 90120, San Felipe Ixtacuixtla, Tlaxcala, México.

<sup>c</sup> Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, Instituto Politécnico Nacional, Carretera Estatal San Inés Tecuexcomac-Tepetitla Km 1.5, C.P. 90700, Tepetitla de Lardizabal, Tlaxcala, México.

<sup>d</sup> Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), Departamento de Recursos del Mar, Unidad Mérida. Km. 6 Antigua Carretera a Progreso, Apdo. Postal 73-Cordemex, 97310 Mérida, Yucatán, México.

### RESUMEN

El Bisfenol A [4'4'-dihidroxi-2,2 difenilpropano] (BFA) es un compuesto orgánico utilizado en una amplia gama de productos de uso doméstico. EL BFA es considerado como un potente disruptor endócrino que pone en riesgo la salud humana. En esta investigación se evaluó el crecimiento de *Pleurotus ostreatus* en presencia de 50 y 75 mg/L de BFA en fermentación sumergida, evaluando la; velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), biomasa máxima ( $X_{m\acute{a}x}$ ), consumo de glucosa, porcentaje (%) y constante de biodegradación ( $k$ ) del BFA, actividad enzimática de lacasas (U/L), y algunos de sus parámetros cinéticos enzimáticos. Los valores más altos con respecto a los parámetros cinéticos de crecimiento y producción de lacasas, se obtuvieron en el medio con 75 mg/L de BFA. *P. ostreatus* mostró valores de pH neuro-básicos en los medios adicionados con BFA. El consumo de glucosa fue del 100 % en todos los medios. Durante las primeras 100 h de crecimiento, este hongo degradó más del 50 % de ambas concentraciones. Esta investigación es la primera en México que demuestra la eficiencia degradante de *P. ostreatus* BE01 al degradar una concentración de BFA que no ha sido reportada anteriormente y que es superior a las reportadas en diversas matrices ambientales.

**Palabras clave:** Biodegradación, bisfenol A, *Pleurotus ostreatus*, lacasas, parámetros de crecimiento

### ABSTRACT

Bisphenol A [4'4'-dihydroxy-2,2 diphenylpropane] (BPA) is an organic compound used in a wide range of household products. BPA is considered as a powerful endocrine disruptor that puts human health at risk. In this investigation, *Pleurotus ostreatus* growth was evaluated in presence of 50 and 75 mg/L of BPA in submerged fermentation, evaluating the specific growth rate ( $\mu$ ), maximum biomass ( $X_{max}$ ), glucose

consumption, percentage (%) and biodegradation constant ( $k$ ) of BPA, enzymatic activity of laccase (U/L), and some of its enzymatic kinetic parameters. The highest values regarding the kinetic parameters of growth and laccase production were obtained in the medium with 75 mg/L of BPA. *P. ostreatus* showed neutral-basic pH values in the media added with BPA. Glucose consumption was 100 % in all media. Within the first 100 h of growth, this fungus degraded more than 50 % of both concentrations. This research is the first in México that demonstrates the degradative efficiency of *P. ostreatus* BE01 by degrading a concentration of BPA that has not been previously reported and is higher than those reported in various environmental matrices.

**Keywords:** Biodegradation, bisphenol A, *Pleurotus ostreatus*, laccases, kinetic parameters

### INTRODUCCIÓN

El Bisfenol A [4'4'-dihidroxi-2,2-difenilpropano] (BFA) es un compuesto orgánico con dos grupos fenólicos, tiene una amplia gama de usos, es uno de los químicos de mayor producción a nivel mundial (Industry-Experts, 2018). En la industria este compuesto tiene una gran cantidad de aplicaciones, se utiliza como materia prima para la producción de diferentes tipos de plásticos, entre los que destacan los policarbonatos; es componente de resinas epóxicas de los recubrimientos interiores de latas de comida y se utiliza en la producción de diferentes partes de equipos eléctricos, electrónicos, automovilísticos, etc. (Mikolajewska *et al.*, 2015). Con el paso del tiempo, el BFA es liberado al ambiente como parte de la contaminación ambiental que ocasionan los plásticos y puede ser absorbido o acumulado en organismos vivos a través de las cadenas tróficas (Wang *et al.*, 2017; Mackay *et al.*, 2018; Staples *et al.*, 2018). En el caso de los seres humanos, la exposición se da vía inhalación, ingesta

\*Autores para correspondencia: Dra. Miriam Ahuactzin Pérez  
Correo electrónico: miriamahuactzin@gmail.com

Recibido: 24 de agosto de 2020

Aceptado: 2 de noviembre de 2020

de alimentos empaquetados y a través de la dermis (Ribeiro *et al.*, 2017; Li y Suh, 2019). Estudios recientes en roedores y humanos demostraron que el BFA afecta negativamente al sistema endocrino y con ello a la salud de estos y su descendencia, debido a su potente acción como disruptor endócrino (DE) (Adoamnei *et al.*, 2018; Gómez-Mercado *et al.*, 2018; Baralić *et al.*, 2020; Gorini *et al.*, 2020). Los DE son químicos o mezclas de ellos, exógenos al organismo que se encuentran en alimentos y productos destinados a los consumidores que muestran efectos adversos sobre el sistema endócrino (Nur *et al.*, 2019; Yeung *et al.*, 2019). El BFA es un compuesto aromático, químicamente resistente a la degradación, debido a la deslocalización de su energía y a las densas nubes de electrones presentes en ambos lados de la estructura de su anillo, lo que lo hace extremadamente resistente al ataque nucleofílico (Cajthaml, 2014). A pesar de esto, se han realizado diversos estudios para conocer su degradación y las enzimas que participan en dicho proceso principalmente, la participación de hongos de pudrición blanca (Baker *et al.*, 2019). El BFA puede ser degradado por especies hongos ligninolíticos, tales como: *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eryngii*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Trametes villosa* (Song *et al.*, 2007; Martinková *et al.*, 2016; Kresinová *et al.*, 2018), *Stereum hirsutum*, *Heterobasidium insulare* y *Grifola frondosa* entre otros (Nitheranont *et al.*, 2011; Traversa *et al.*, 2012). Estos hongos excretan enzimas ligninolíticas como las lacasas y manganoso peroxidadas (Mn-P) que pueden descomponer total o parcialmente al BFA (Gassara *et al.*, 2013; Escalona *et al.*, 2014; Hou *et al.*, 2014; Baker *et al.*, 2019). Por lo que han recibido importante atención para el establecimiento de estrategias de biorremediación, debido a que catalizan la sustracción de un electrón de los grupos hidroxilo fenólicos (reacción acompañada de una desmetilación y formación de quinona) que genera la escisión del anillo (Husain y Qayyum, 2012). Una característica natural tecnológicamente útil para la degradación de diversos compuestos aromáticos. Además, el uso de hongos ligninolíticos producen mediadores de bajo peso molecular que amplían el espectro de contaminantes que son capaces de oxidar (Cajthaml, 2014; Ahuactzin-Pérez *et al.*, 2018c). Sin embargo, existen pocos estudios que describen los parámetros cinéticos del crecimiento y producción enzimática de lacasas por *P. ostreatus* durante el proceso de degradación de BFA. Es por esto, que el propósito de este trabajo fue caracterizar el crecimiento y producción de enzimas lacasas durante el proceso de degradación de BFA por *P. ostreatus* cultivado en fermentación sumergida.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Organismo de estudio e inóculo

En esta investigación se utilizó el hongo *P. ostreatus*, proveniente de cultivos industriales, depositado y conservado en el cepario del Laboratorio de Biología Experimental con la clave BE01, de la Facultad de Agrobiología de la Universidad Autónoma de Tlaxcala. Para la obtención del inóculo, el hongo se cultivó en Agar Papa Dextrosa (PDA) durante 7 d a 28 °C, los inóculos se obtuvieron de la periferia de las colonias con 10 mm de diámetro.

### Medio y condiciones de cultivo

Se utilizaron tres medios de cultivo: 1) GYE (g/L): glucosa, 10 g; extracto de levadura, 5 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.9 g;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.6 g;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0.3 g;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.1 g;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.05 g;  $\text{MnSO}_4$ , 0.05 g y  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.01 g). 2) GYE + 50 mg/L de BFA y 3) GYE + 75 mg/L de BFA. El pH del medio se ajustó a 6.5 con NaOH 0.1 M. El hongo se cultivó en fermentación sumergida utilizando matraces Erlenmeyer de 125 mL, a cada uno se les agregó 50 mL de medio de cultivo adicionado con la concentración correspondiente de BFA (50 y 75 mg/L), se esterilizaron (a 121 °C y 15 psi) y cada matraz se sembró con tres inóculos y fueron incubados en una incubadora orbital (PRENDO) a 120 rpm, durante 23 días a 28 °C. El hongo se desarrolló, bajo una fermentación sumergida.

### Obtención del extracto crudo enzimático y determinación de la producción de biomasa

El extracto crudo enzimático (ECE) fue el sobrenadante de los cultivos y se obtuvo por filtración (decantación) y retención de biomasa en papel filtro Whatman No. 4. La biomasa retenida sobre el papel Whatman se secó hasta peso constante para la cuantificación del crecimiento fúngico empleando el método de peso seco (Ahuactzin-Pérez *et al.*, 2014).

Las curvas de crecimiento fúngico se establecieron mediante la ecuación logística por la minimización del error cuadrático con la herramienta Solver de la hoja electrónica de Excel (Microsoft) (Viniestra-González *et al.*, 2003; Ahuactzin-Pérez *et al.*, 2018c) pectinases and tannases, by *Aspergillus niger* grown by SSF and SmF is reviewed. To do such a comparative study, logistic and Luedeking-Piret equations are used in order to estimate the values of the following coefficients: maximal specific growth rate ( $\mu_m$ , como se muestra a continuación en la ecuación

$$dx/dt = \mu(1-X/X_{m\acute{a}x})X \quad \text{Ec. (1)}$$

Donde,  $\mu$  corresponde a la velocidad específica de crecimiento obtenida y  $X_{m\acute{a}x}$  a la biomasa máxima (o de equilibrio) producida cuando  $dX/dt = 0$  para  $X > 0$ .

La solución de la Ec. (1) es la siguiente:

$$X = X_{m\acute{a}x} / (1 + C^* \exp(-\mu^*t))$$

Donde,  $C = (X_{m\acute{a}x} - X_0) / X_0$ ; cuando  $X = X_0$  es el valor inicial de la biomasa.

### Parámetros cinéticos de crecimiento y producción de enzimas lacasas

El rendimiento de la enzima con respecto a la biomasa ( $Y_{E/X}$ ) se estimó como la relación entre la enzima máxima producida durante la fermentación ( $E_{m\acute{a}x}$ ) (U/L) y la ( $X_{m\acute{a}x}$ ) (g/L). Se calculó el rendimiento de la biomasa con respecto al sustrato ( $Y_{X/S}$ ) empleando la  $X_{m\acute{a}x}$  y la concentración inicial de la fuente de carbono. La productividad en el pico máximo de actividad ( $P_{RO}$ ) se calculó mediante la ecuación ( $P_{RO} = E_{m\acute{a}x}$ /tiempo de fermentación) y por último, la tasa específica de formación de la enzima ( $qp$ ) se determinó empleando la siguiente fórmula ( $qp = \mu^* Y_{E/X}$ ) (Díaz *et al.*, 2013).



### Determinación del consumo de glucosa

El consumo de glucosa se cuantificó a través de la presencia de la cantidad de azúcares reductores por el método DNS (ácido dinitrosalicílico) y una curva de calibración con glucosa (0 – 100 mg/L de glucosa). La mezcla de reacción (50 µL de ECE, 950 µL de agua destilada y 2 mL de solución DNS [NaOH 1 %, Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 0.05 %, fenol 0.2 % y DNS 1 %]) se calentó a punto de ebullición durante 5 min y la lectura de la absorbancia se realizó en un espectrofotómetro "METASH-UV6000" a 575 nm (Miller, 1959).

### Perfiles de pH

Los perfiles del pH durante el crecimiento de *P. ostreatus* en medio líquido se obtuvieron con el método de potenciometría, con el equipo Hanna instruments HI 9811-5. El potenciómetro se calibró empleando buffers de referencia a un pH de 4, 7 y 10.

### Actividad enzimática de lacasas

La actividad de lacasas se cuantificó con el sustrato 2,6-dimetoxifenol (SIGMA) 2 mM en buffer de acetatos 0.1 M y pH de 4.5. La mezcla de reacción (475 µL de sustrato, 50 µL de ECE) se incubó a 39 °C por 1 min. La reacción se detuvo por la adición de 475 µL de dimetil sulfóxido (SIGMA). La absorbancia se leyó a 468 nm en un espectrofotómetro "METASH-UV6000". Una unidad de actividad de lacasas es la cantidad de enzima que provoca incrementos de 1.0 unidad en la absorbancia por minuto de incubación (Díaz *et al.*, 2013).

### Porcentaje y constante de biodegradación del BFA

Para la cuantificación de la biodegradación de BFA se realizó empleando una alícuota de 1 mL de ECE por cada réplica de la fermentación (3) y se sometió a shock térmico (a temperatura de ebullición) durante 1 minuto, se evaporó en un horno de secado a 50 °C durante 24 h. Posteriormente, para su cuantificación y análisis la alícuota se resuspendió en 2 mL de acetonitrilo. Los extractos se analizaron con un sistema HPLC Agilent 110 de fase inversa, equipado con una columna C18 y un detector de absorbancia UV de 245-360 nm en condiciones isocráticas en acetonitrilo:agua (90:10) y a un caudal de 1 mL/min.

La biodegradación de BFA se determinó midiendo su desaparición en el medio de cultivo. Se realizó una curva de calibración, en un intervalo de concentraciones de 0-100 ppm de BFA con el comportamiento de la Ec (2).

$$Y = mx + b \quad \text{Ec. (2)}$$

Donde, x es la concentración correspondiente a cada área bajo la curva de los días de fermentación. El porcentaje de biodegradación (% BD) en el intervalo de tiempo (h) se calculó mediante la

$$\%BDt = \frac{Ct}{Co} \times 10 \quad \text{Ec. (3)}$$

Donde:

$C_0$  = concentración inicial del BFA en la solución de ensayo (mg/L).

$C_t$  = concentración de BFA en la solución de ensayo en el tiempo t.

Se graficó el tiempo de fermentación en comparación con el logaritmo natural (*ln*) de la concentración de BFA, posteriormente se aplicó una regresión lineal. La pendiente de la regresión se consideró la constante de biodegradación de primer orden (*k*) expresada en h<sup>-1</sup> (Ahuactzin-Pérez *et al.*, 2016; Ahuactzin-Pérez *et al.*, 2018c).

### Análisis estadístico

Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado, empleando un diseño experimental unifactorial completamente aleatorizado de tres niveles. Los datos se evaluaron mediante un ANOVA de una vía y una prueba post-hoc de Tukey con el programa The Graph Pad Prism® program (San Diego, CA, USA) (Córdoba-Sosa *et al.*, 2014).

## RESULTADOS

### Parámetros cinéticos de crecimiento

En el medio GYE se obtuvo un valor de 3.45 g/L para la  $X_{máx}$ , el cual fue menor con respecto a los medios de cultivo con BFA. En el mismo medio se obtuvo un valor menor de  $\mu$  con respecto a los tratamientos con BFA (Fig. 1). Sin embargo, el valor de  $X_{máx}$  no fue significativamente diferente de los otros tratamientos. El hongo *P. ostreatus* presentó un valor de  $X_{máx}$  de 4.9 g/L en el medio que contenía 50 mg/L de BFA y una  $\mu$  de 0.01 h<sup>-1</sup>. En comparación con el medio con 75 mg/L de BFA en donde se presentó una  $X_{máx}$  de 5.3 g/L y una  $\mu$  0.014 h<sup>-1</sup> (Tabla 1, Fig. 1). No hubieron diferencias significativas entre las medias de los valores correspondientes a la  $X_{máx}$  y a la  $\mu$  en todos los tratamientos ( $p < 0.05$ ).

### Consumo de glucosa

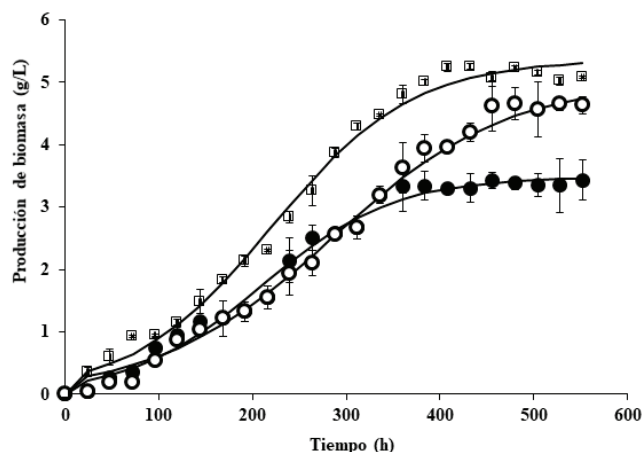
El hongo consumió el 100 % de la glucosa en el tratamiento testigo y en el medio con 75 mg/L de BFA después de 432 h de crecimiento (Fig. 2). Mientras que en el medio con 50 mg/L de BFA el consumo total de glucosa fue lento (transcurridas 480 h de crecimiento) (Fig. 2). En todos los

**Tabla 1.** Parámetros cinéticos de crecimiento de *P. ostreatus* cultivado sobre BFA en fermentación sumergida

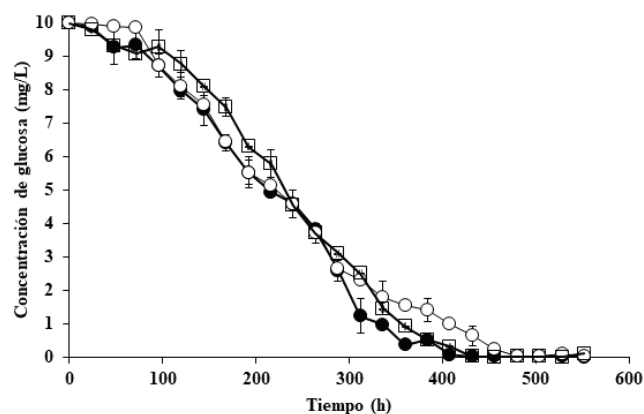
**Table 1.** Kinetic growth parameters of *P. ostreatus* grown on BPA in submerged fermentation

Parámetro	Medio de cultivo			Valor de P
	BFA (mg/L)			
	0	50	75	
$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0.008 ± 0.0005 <sup>c</sup>	0.010 ± 0.0009 <sup>b</sup>	0.014 ± 0.0003 <sup>a</sup>	0.0051
$X_{máx}$ (g/L)	3.45 ± 0.104 <sup>c</sup>	4.9 ± 0.04 <sup>b</sup>	5.3 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.0001
$Y_{(x/s)}$ (g <sub>x</sub> /g <sub>s</sub> )	0.34 ± 0.01 <sup>c</sup>	0.49 ± 0.004 <sup>b</sup>	0.52 ± 0.001 <sup>a</sup>	0.0002

X ± d.s. a, b, .c Literales diferentes en la misma fila indica diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).



**Figura 1.** Crecimiento y producción de biomasa de *P. ostreatus* en medio GYE (●), GYE/50 mg/L de BFA (○) y GYE/75 (□) mg/L de BFA en fermentación sumergida, determinado por el método de peso seco.  
**Figure 1.** Growth and biomass production of *P. ostreatus* in GYE (●), GYE/50 mg/L of BFA (○) and GYE/75 (□) mg/L of BFA medium in submerged fermentation, determined by the dry weight method.

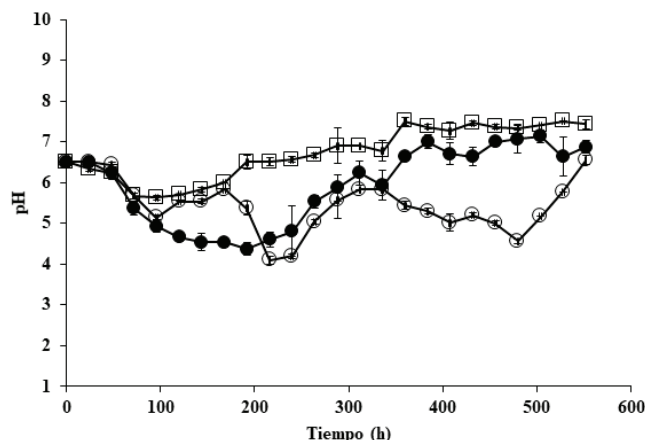


**Figura 2.** Consumo de glucosa por *P. ostreatus* en medio GYE (●), GYE/50 mg/L de BFA (○) y GYE/75 (□) mg/L de BFA en fermentación sumergida, determinado por el método de DNS.  
**Figure 2.** Glucose consumption by *P. ostreatus* in GYE (●), GYE/50 mg/L of BFA (○) and GYE/75 (□) mg/L of BFA medium in submerged fermentation, determined by the DNS method.

tratamientos, el consumo de glucosa total correspondió con el inicio de la fase estacionaria de crecimiento de *P. ostreatus*

### Perfiles de pH

En el perfil de pH durante el crecimiento de *P. ostreatus* en el medio GYE se observó una disminución progresiva de 6.2 a 4.7 entre las 48 y 192 h (fase de adaptación y exponencial), respectivamente. Posteriormente, un aumento del pH hasta 7.4 a las 552 h se registró. En el medio con 50 mg/L de BFA se observó un intervalo de pH de 5.8 a 4.2 durante las primeras 336 h de crecimiento fúngico, hasta llegar a un pH de 6.5 al final de la fermentación. El perfil de pH en el medio con 75 mg/L de BFA mostró una disminución durante las primeras 96 h. Después, el pH alcanzó un valor de 6.3 que incrementó al finalizar la fermentación a 7.5 (Fig. 3).



**Figura 3.** Perfiles de pH de *P. ostreatus* cultivado en fermentación sumergida con diferentes concentraciones de BFA: 0 (●), 50 (○) y 75 (□) mg/L.  
**Figure 3.** pH profiles of *P. ostreatus* grown in submerged fermentation with different BFA concentrations: 0 (●), 50 (○) and 75 (□) mg/L.

### Actividad enzimática de lacasas

La mayor actividad de enzimas lacasas se presentó en el medio con mayor concentración de BFA, con un valor de 238 U/L a las 336 h (Tabla 2, Fig. 4). Con respecto al medio con 50 mg/L de BFA, la producción de estas enzimas durante las primeras horas de crecimiento fue menor a 10 U/L. Sin embargo, las 159 U/L se alcanzaron a las 288 h (Fig. 4). La menor actividad enzimática se mostró en el medio GYE con un máximo de 33 U/L a las 192 h de crecimiento (Fig. 4).

### Parámetros cinéticos de producción de lacasas

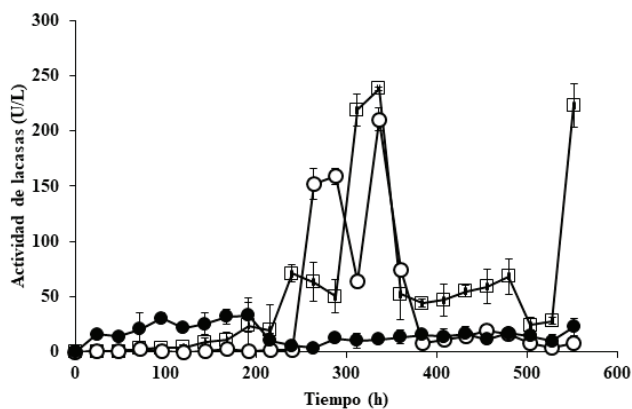
Con respecto a los parámetros de  $E_{máx}$ ,  $Y_{E/X}$ ,  $P_{RO}$  y  $q_p$ , se presentaron los valores mayores en el medio 75 mg/L de BFA. Valores significativamente diferentes de los obtenidos en el medio GYE ( $p < 0.05$ ) (Tabla 2). El valor de  $Y_{E/X}$  para el medio GYE no presentó diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto a los medios que contienen BFA. Sin embargo, en el medio con 50 mg/L de BFA, el valor de  $Y_{E/X}$  fue significativamente diferente al que presentó el medio de crecimiento con la mayor concentración de BFA, mientras que el medio GYE fue

**Tabla 2.** Parámetros cinéticos de producción de lacasas de *P. ostreatus* cultivado sobre BFA en fermentación sumergida.

**Table 2.** Laccase production kinetic parameters of *P. ostreatus* grown on BFA in submerged fermentation.

Parámetro	Medio de cultivo			Valor de P
	BFA (mg/L)			
	0	50	75	
$E_{máx}$ (U/L)	33.17 ± 15.3 <sup>c</sup>	210 ± 10.8 <sup>b</sup>	238.24 ± 1.2 <sup>a</sup>	0.0008
$Y_{E/X}$ (U/gX)	25 ± 11.56 <sup>c</sup>	65.93 ± 3.39 <sup>a</sup>	53.43 ± 0.29 <sup>b</sup>	0.0051
$P_{RO}$ (UL/h)	0.17 ± 0.08 <sup>c</sup>	0.63 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.71 ± 0.003 <sup>b</sup>	0.0002

X ± d.s. a, b, .c Literales diferentes en la misma fila indica diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).



**Figura 4.** Actividad de lacasas de *P. ostreatus* en medio GYE (●), GYE/50 mg/L de BFA (○) y GYE/75 mg/L de BFA en fermentación sumergida.  
**Figure 4.** Laccase activity of *P. ostreatus* in GYE (●), GYE/50 mg/L of BFA (○) and GYE/75 mg/L of BFA medium in submerged fermentation.

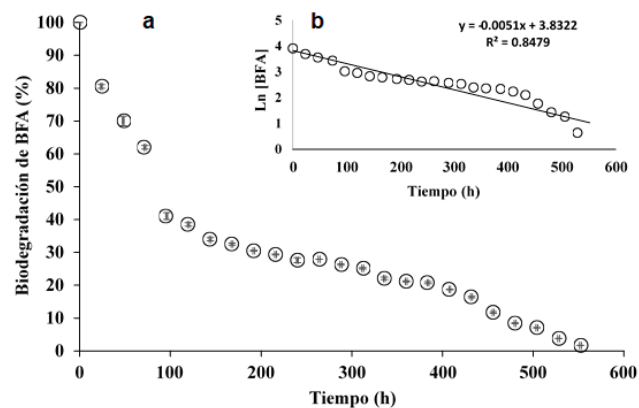
el que mostró menor rendimiento (Tabla 2). Los valores de la  $E_{max}$ ,  $P_{RO}$  y  $q_p$  mostraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el medio GYE y en los medios con BFA, estos parámetros no mostraron diferencia significativa (Tabla 2).

#### Porcentaje y constante de biodegradación del BFA

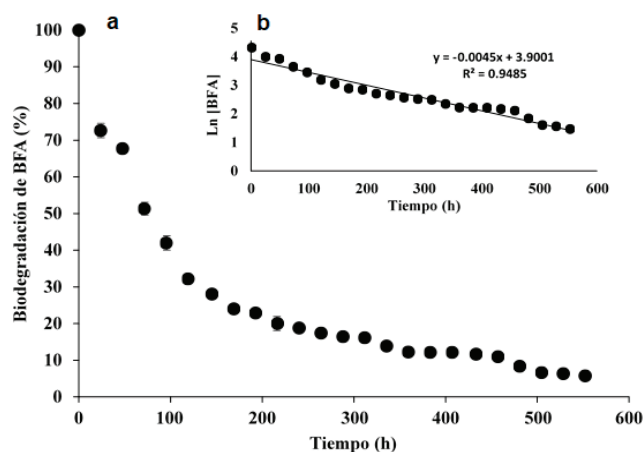
En el medio con 75 mg/L de BFA, después de 552 h de crecimiento en fermentación líquida, *P. ostreatus* degradó hasta un 94.3 % de dicho compuesto. Durante el inicio de la fase de adaptación (las primeras 48 h) el hongo degradó el 67.7 % de la concentración inicial (Fig. 6a). Para este medio se obtuvo un valor de  $k$  de  $0.0045 \text{ h}^{-1}$  (Fig. 6b). En el medio con menor concentración de BFA, *P. ostreatus* degradó más del 50 % de la concentración inicial (50 mg/L) después de 96 h de incubación y alcanzó un 98.3 % de degradación a las 552 h, y un valor de  $k$  de  $0.0051 \text{ h}^{-1}$  (Fig. 5a,b).

### DISCUSIÓN

En esta investigación se utilizó el modelo de la "ecuación logística" para explicar el crecimiento de *P. ostreatus* en



**Figura 5.** Porcentaje de biodegradación de 50 mg/L de BFA (a) y constante de biodegradación (b).  
**Figure 5.** Biodegradation percentage of 50 mg/L BFA (a) and biodegradation constant (b).



**Figura 6.** Porcentaje de biodegradación de 75 mg/L de BFA (a) y constante de biodegradación (b).

**Figure 6.** Biodegradation percentage of 75 mg/L BFA (a) and biodegradation constant (b).

fermentación sumergida. El criterio de selección del modelo fue que en las cinéticas de crecimiento fúngico mostró un coeficiente de correlación mayor a 99 %. Este modelo describió el comportamiento del crecimiento de este hongo bajo las condiciones evaluadas de fermentación. Ahuactzin-Pérez *et al.* (2018a) evaluaron la degradación de 500 y 1000 mg/L de di (2-etilhexil) ftalato (DEHF) (un compuesto fenólico plastificante en la industria de plásticos) por una cepa diferente de *P. ostreatus*. Ellos reportaron en tratamientos testigo y con concentraciones de DEHF la obtención de una  $X_{max}$  de 5.19, 6.53 y 7.69 g/L, respectivamente. Así como, una  $\mu$  de 0.21, 0.022 y  $0.018 \text{ h}^{-1}$ . Estos resultados son similares a los descritos en este trabajo. En la observación de que en los medios de cultivo adicionados con la mayor concentración de BFA se obtuvieron los mayores rendimientos (3.45, 4.9 y 5.3 g/L en los medios GYE, 50 y 75 mg/L de BFA) de  $X_{max}$  pero una menor  $\mu$  (0.0088, 0.01 y  $0.014 \text{ h}^{-1}$  respectivamente). Sin embargo, estos resultados difieren con los obtenidos por Tlecuítl-Beristain *et al.* (2008), quienes reportan para esta especie después de 480 h de crecimiento en medio líquido sin la adición de algún xenobiótico; una  $\mu$  y  $X_{max}$  superior de  $0.02 \text{ h}^{-1}$  y 7.8 g/L, respectivamente. Ahuactzin-Pérez *et al.* (2016) reportaron el consumo total de glucosa por el hongo *Fusarium culmorum* después de 290 y 240 h de crecimiento sobre 500 y 1000 mg/L de DEHF, respectivamente. En comparación con los datos obtenidos en esta investigación, el consumo total de glucosa en el medio GYE y con 75 mg/L de BFA por *P. ostreatus* se observó a las 432 h. Sin embargo, en el medio con 50 mg/L de BFA se prolongó hasta las 480 h.

En cuanto al efecto del pH en el crecimiento fúngico, en los tres medios se muestran cambios similares a los reportados por Ahuactzin-Pérez *et al.* (2016). Mediante el ajuste del pH inicial a 6.5 en los tres tratamientos (GYE, 500 y 1000 mg/L de DEHF) se observó un pH final de 6.8, 6.4 y 4.5, respectivamente. En el presente trabajo se obtuvo un pH final de 6.8, 6.4 y 7.4 para los tratamientos testigo, con 50 y 75 mg/L de BFA, respectivamente. Con respecto a la actividad enzimática

de lacasas, Ortega-Ávila (2015) describió el comportamiento de la producción de lacasas en el medio GYE adicionado con Cu como inductor, donde obtuvo una  $E_{máx}$  de 120 y 119 U/L a las 312 y 336 h de crecimiento, respectivamente. La comparación de los resultados obtenidos en este trabajo, la actividad de lacasas fue menor a la reportado por Ortega-Ávila (2015). Sin embargo, los resultados indican que el BFA o los intermediarios de su degradación ejercen un efecto inductor sobre la producción de estas enzimas. Si bien, en esta investigación no se evaluó el efecto inductivo del BFA sobre los perfiles de enzimas lacasas, se conoce que estas enzimas son responsables de la degradación de este compuesto (Hou *et al.*, 2014; Neiverth de Freitas *et al.*, 2017; Kresinová *et al.*, 2018). Díaz *et al.* (2013) mencionan que la mayor producción de enzimas lacasas para *P. ostreatus* se presenta con un pH inicial de crecimiento de 6.5 en el medio de cultivo y a un pH de actividad de 4.5, en medios sin presencia de BFA. Este comportamiento se observó en el medio testigo empleado en nuestra investigación, contrario a los medios adicionados con BFA, donde la actividad y parámetros cinéticos enzimáticos fueron mayores, por lo que nos permite sugerir que estos incrementos se deben a la presencia de BFA y no al pH.

Díaz *et al.* (2011) evaluaron diferentes parámetros cinéticos de producción ( $E_{máx}$ ,  $Y_{E/X}$ ,  $P$  y la  $q_p$ ) en diversas cepas del género *Pleurotus* cultivado en medios de cultivo, con y sin la adición de  $Cu^{++}$ . La observación fue que la cepa de *P. ostreatus* ATCC32783 mostró valores mayores en los parámetros cinéticos de producción de la enzima lacasa en presencia de  $Cu^{++}$  en el medio de cultivo. En esta investigación se observó que *P. ostreatus* cultivado en los medios conteniendo BFA, obtuvo valores de los parámetros cinéticos de producción de la enzima menores a los obtenidos por Díaz *et al.* (2011).

Los hongos *T. versicolor*, *P. ostreatus*, *Irpex lacteus* y *S. hirsutum* han sido especies de hongos ligninolíticos que han degradado por arriba del 95 % de la concentración inicial (50 mg/L) en un lapso de 5 a 7 días crecidas en medios líquidos y sólidos en un rango de pH (4.5-5) y temperatura de (20-30 °C) (Song *et al.*, 2007; Traversa *et al.*, 2012). Por otro lado, Cajthaml *et al.* (2009) y Zhang *et al.* (2015) reportan la degradación de 10 mg/L de BFA por cepas de *P. ostreatus*. Los resultados mostraron una eficiencia de degradación del 99 % de la concentración inicial a los 3 y 7 días del crecimiento de *P. ostreatus*, respectivamente. Contrario a lo reportado por estos autores, en esta investigación se emplearon concentraciones 5 y 7.5 veces mayores a las reportadas por ellos. *P. ostreatus* degradó más del 50 % de la concentración inicial a partir de los primero 4 y 3 días, a una  $k$  de 0.0045 y 0.0051  $h^{-1}$ , respectivamente. Estos resultados sugieren que *P. ostreatus* logra degradar concentraciones superiores a las que se encuentran en diferentes muestras de agua que ponen en riesgo la salud pública (Nur *et al.*, 2019; Petrie *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2019).

## CONCLUSIONES

Durante el proceso de degradación de BFA en un sistema de fermentación sumergida, *P. ostreatus* logró incrementar sus parámetros cinéticos de crecimiento y producción de enzimas lacasas, parámetros, inversamente

proporcionales a la degradación de BFA. *P. ostreatus* puede utilizar al BFA como fuente secundaria de carbono durante un cometabolismo, esto con base en el consumo total de la glucosa. *P. ostreatus* mostró valores de pH ácidos en el medio testigo e incrementaron en un rango neutro-básico en los medios que contenían BFA, lo que nos permitió inferir que el incremento en los valores de este parámetro es una medida indirecta de la degradación de este compuesto. Se sugiere que el BFA y algunos de sus subproductos podrían tener un efecto inductor en la producción de lacasas, mostrando una correlación positiva entre la concentración de BFA y la producción de estas enzimas. Esta cepa fúngica es eficiente en la biodegradación de BFA, ya que presentó un porcentaje de degradación mayor al 50 % durante los primeros 3 d de crecimiento y finalizó a los 21 d con más del 97 % de la concentración inicial más alta, concentración que hasta el momento no ha sido reportado por otros autores y que es superior a las reportadas en matrices ambientales que ponen en riesgo la salud humana.

## REFERENCIAS

- Adoamnei, E., Mendiola, J., Vela-Soria, F., Fernández, M.F., Olea, N., Jørgensen, N., Swan, S.H. y Torres-Cantero, A.M. 2018. Urinary bisphenol A concentrations are associated with reproductive parameters in young men. *Environmental Research*. 161: 122-128.
- Ahuactzin-Pérez, M., Tlecuil-Beristain, S., García-Dávila, J., González-Pérez, M., Gutiérrez-Ruiz, M.C. y Sánchez, C. 2016. Degradation of di (2-ethyl hexyl) phthalate by *Fusarium culmorum*: Kinetics, enzymatic activities and biodegradation pathway based on quantum chemical modeling pathway based on quantum chemical modeling. *Science of the Total Environment*. 566-567: 1186-1193.
- Ahuactzin-Pérez, M., Tlecuil-Beristain, S., García-Dávila, J., Santacruz-Juárez, E., González-Pérez, M., Gutiérrez-Ruiz, M.C. y Sánchez, C. 2018a. Mineralization of high concentrations of the endocrine disruptor dibutyl phthalate by *Fusarium culmorum*. *3 Biotech*. 8: 42.
- Ahuactzin-Pérez, M., Tlecuil-Beristain, S., García-Dávila, J., Santacruz-Juárez, E., González-Pérez, M., Gutiérrez-Ruiz, M.C. y Sánchez, C. 2018c. Kinetics and pathway of biodegradation of dibutyl phthalate by *Pleurotus ostreatus*. *Fungal Biology*. 122: 991-997.
- Ahuactzin-Pérez, M., Torres, J.L., Rodríguez-Pastrana, B.R., Soriano-Santos, J., Díaz-Godínez, G., Díaz, R., Tlecuil-Beristain, S. y Sánchez, C. 2014. Fungal biodegradation of dibutyl phthalate and toxicity of its breakdown products on the basis of fungal and bacterial growth. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 30: 2811-2819.
- Baker, P., Tirumalechetty, A. y Mohan, R. 2019. Fungal enzymes for bioremediation of xenobiotic compounds, in: Yadav, A.N., Singh, S., Mishra, S. y Gupta, A. (Eds.), *Recent advancement in white biotechnology through fungi*. pp 463-490. Springer, Cham.
- Baralić, K., Djordjevic, A.B., Živančević, K., Antonijević, E., Anđelković, M., Jovarić, D., Curčić, M., Bulat, Z., Antonijević, B. y Dukic-Cosic, D. 2020. Toxic effects of the mixture of phthalates and bisphenol A-subacute oral toxicity study in wistar rats. *International Journal of Environmental Research Public Health*. 17: 746.



- Cajthaml, T. 2014. Biodegradation of endocrine-disrupting compounds by ligninolytic fungi: Mechanisms involved in the degradation. *Environmental Microbiology*. 17: 4822-4834.
- Cajthaml, T., Kresinová, Z., Svobodová, K. y Möder, M. 2009. Biodegradation of endocrine-disrupting compounds and suppression of estrogenic activity by ligninolytic fungi. *Chemosphere*. 75: 745-750.
- Córdoba-Sosa, G., Torres, J.L., Ahuactzin-Pérez, M., Godínez, G., Díaz, R. y Sánchez, C. 2014. Growth of *Pleurotus ostreatus* ATCC 3526 in different concentrations of di (2-ethylhexyl) phthalate in submerged fermentation. *Journal Chemical, Biology and Physical Science*. 4: 96-103.
- Díaz, R., Alonso, S., Sánchez, C., Tomasini, A., Bibbins-Martínez, M. y Díaz-Godínez, G. 2011. Characterization of the growth and laccase activity of strains of *Pleurotus ostreatus* in submerged fermentation. *BioResources*. 6: 282-290.
- Díaz, R., Téllez-Téllez, M., Sánchez, C., Bibbins-Martínez, M.D., Díaz-Godínez, G. y Soriano-Santos, J. 2013. Influence of initial pH of the growing medium on the activity, production and genes expression profiles of laccase of *Pleurotus ostreatus* in submerged fermentations. *Electronic Journal of Biotechnology*. 16.
- Escalona, I., Grooth, J. De, Font, J. y Nijmeijer, K. 2014. Removal of BPA by enzyme polymerization using NF membranes. *Journal of Membrane Science*. 468: 192-201.
- Gassara, F., Brar, S.K., Verma, M. y Tyagi, R.D. 2013. Bisphenol A degradation in water by ligninolytic enzymes. *Chemosphere*. 92(10): 1356-1360.
- Gorini, F., Bustaffa, E., Coi, A., Iervasi, G. y Bianchi, F. 2020. Bisphenols as environmental triggers of thyroid dysfunction: Clues and evidence. *International Journal of Environmental Research Public Health*. 17(8): 2654.
- Hou, J., Dong, G., Ye, Y. y Chen, V. 2014. Enzymatic degradation of bisphenol-A with immobilized laccase on TiO<sub>2</sub> sol-gel coated PVDF membrane. *Journal of Membrane Science*. 469: 19-30.
- Husain, Q. y Qayyum, S. 2012. Biological and enzymatic treatment of bisphenol A and other endocrine disrupting compounds: A review. *Critical Reviews in Biotechnology*. 33: 260-292.
- Industry-Experts. Bisphenol A - Global Market Outlook (2017-2026). [Consultado 12 Julio 2020] 2018. Disponible en: <https://www.researchandmarkets.com/reports/4613546/bisphenol-a-global-market-outlook-2017-2026>.
- Gómez-Mercado, C.A., Mejía-Sandoval, G., Segura-Cardona, A.M., Arango-Alzate, C.M., Hernández-González, S.I., Patiño-García, D.F. y Barraza-Villarreal, A. 2018. Exposición a bisfenol a (BFA) en mujeres embarazadas y su relación con la obesidad en sus hijos: revisión sistemática. *Revista Facultad Nacional de Salud Pública*. 36(1): 66-74.
- Kresinová, Z., Linhartová, L., Filipová, A., Ezechiáš, M., Mašín, P. y Cajthaml, T. 2018. Biodegradation of endocrine disruptors in urban wastewater using *Pleurotus ostreatus* bioreactor. *New Biotechnology*. 43: 53-61.
- Li, D. y Suh, S. 2019. Health risks of chemicals in consumer products: A review. *Environment International*. 123: 580-587.
- Mackay, D., Celsie, A.K.D., Powell, E. y Parnis, J.M.P. 2018. Bioconcentration, bioaccumulation, biomagnification and trophic magnification: a modelling perspective. *Environmental Science: Processes and Impacts*. 20: 72-85.
- Martínková, L., Kotik, M., Marková, E. y Homolka, L. 2016. Biodegradation of phenolic compounds by Basidiomycota and its phenol oxidases: A review. *Chemosphere*. 149: 373-382.
- Mikolajewska, K., Stragierowicz, J. y Gromadzinska, J. 2015. Bisphenol A-applications, sources of exposure and potential risks in infants, children and pregnant women. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*. 28: 209-241.
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 31: 426-428.
- Neiverth de Freitas, E., Bubna, G.A., Brugnari, T., Kato, C.G., Noll, M., Rauen, T.G., Peralta-Muniz Moreira, R. de F. y Peralta, R.A. 2017. Removal of bisphenol A by laccases from *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus pulmonarius* and evaluation of ecotoxicity of degradation products. *Chemical Engineering Journal*. 330: 1361-1369.
- Nitheranont, T., Watanabe, A., Suzuki, T., Katayama, T. y Asada, Y. 2011. Decolorization of synthetic dyes and biodegradation of bisphenol A by laccase from the edible mushroom, *Grifola frondosa*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 75: 1845-1847.
- Nur, A., Yee, S., Hirawaty, N. y Zaharin, A. 2019. Quantification of multi-classes of endocrine-disrupting compounds in estuarine water. *Environmental Pollution*. 249: 1019-1028.
- Ortega-Ávila, R. 2015. Búsqueda de los genes que codifican para lacasas e isoenzimas producidas por la cepa PoB de *Pleurotus ostreatus* en dos condiciones de cultivo sobre agar. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Tlaxcala. Tlaxcala, México.
- Petrie, B., Lopardo, L., Proctor, K., Youdan, J., Barden, R. y Kasprzyk-Hordern, B. 2019. Assessment of bisphenol-A in the urban water cycle. *Science of the Total Environment*. 650: 900-907.
- Ribeiro, E., Ladeira, C. y Viegas, S. 2017. Occupational exposure to bisphenol A (BPA): A reality that still needs to be unveiled. *Toxics*. 5: 1-16.
- Song, H.H., Hyoung, T.C. y Hong-Gyu, S. 2007. Biodegradation of endocrine-disrupting bisphenol A by white rot fungus. *Journal Microbiology and Biotechnology*. 17: 1147-1151.
- Staples, C., Hoeven, N. Van Der, C.K., Mihaich, E., Woelz, J. y Hentges, S. 2018. Distributions of concentrations of bisphenol A in North American and European surface waters and sediments determined from 19 years of monitoring data. *Chemosphere*. 201: 448-458.
- Tlecuitl-Beristain, S., Sánchez, C., Loera, O., Robson, G.D. y Díaz-Godínez, G. 2008. Laccases of *Pleurotus ostreatus* observed at different phases of its growth in submerged fermentation: production of a novel laccase isoform. *Mycological Research*. 112: 1080-1084.
- Traversa, A., Loffredo, E., Gattullo, C.E. y Senesi, N. 2012. Biodecontamination of aqueous substrates from bisphenol A by ligninolytic fungi. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*. 4529: 1407-1412.
- Viniegra-González, G., Favela-Torres, E., Aguilar, C.N., Romero-Gomez, S. de J., Díaz-Godínez, G. y Augur, C. 2003. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal*. 13: 157-167.

Wang, Q., Chen, M., Shan, G., Chen, P., Cui, S., Yi, S. y Zhu, L. 2017. Bioaccumulation and biomagnification of emerging bisphenol analogues in aquatic organisms from Taihu Lake, China. *Science of the Total Environment*. 598: 814-820.

Yeung, E.H., Bell, E.M., Sundaram, R., Ghassabian, A., Ma, W., Kannan, K. y Louis, G.M. 2019. Examining endocrine disruptors measured in newborn dried blood spots and early childhood growth in a prospective cohort. *Obesity*. 27(1): 145-151.

Zhang, C., Li, M., Chen, X. y Li, M. 2015. Edible fungus degrade bisphenol A with no harmful effect on its fatty acid composition. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 118: 126-132.

Zhang, H., Zhang, Y., Li, J. y Yang, M. 2019. Occurrence and exposure assessment of bisphenol analogues in source water and drinking water in China. *Science of the Total Environment*. 655: 607-613.



# Predicción de la resistencia térmica de *Escherichia coli* O157: H7 en carne molida de res en función de la temperatura y las concentraciones de carvacrol y grasa

Prediction of the *Escherichia coli* O157: H7 thermal resistance in ground beef as a function of temperature, carvacrol and fat concentrations

Jorge Isaac López-Pino, Martín Valenzuela-Melendres\*, Juan Pedro Camou†, Humberto González-Ríos, Fernando Ayala-Zavala, Aida Peña-Ramos

Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Carretera Gustavo E. Astiazarán Rosas No. 46. Hermosillo, Sonora, 83304, México.

† A la memoria del Dr. Juan Pedro Camou

## RESUMEN

*Escherichia coli* O157: H7 es uno de los patógenos más importantes que contaminan la carne y comprometen su seguridad y calidad. Los tratamientos térmicos son la opción principal para garantizar la inocuidad; aunque el uso de barreras adicionales como la adición de agentes antimicrobianos, aumentan los márgenes de seguridad contra los patógenos. En este trabajo se evaluó el efecto y las interacciones de temperatura (55-65 °C), carvacrol (0-2%) y grasa (5-20%) sobre la resistencia térmica (valor D) de *Escherichia coli* O157: H7 en carne molida de res utilizando la metodología de superficie de respuesta. La temperatura fue el principal factor de inactivación y la grasa mostró un efecto protector sobre el patógeno. Hubo un efecto de interacción entre la grasa y el carvacrol, a altas concentraciones de grasa el carvacrol disminuyó la resistencia del patógeno. La combinación óptima de grasa, carvacrol y temperatura que minimizan los valores D fue 63 °C, 11% de grasa y 1.6% de carvacrol. El modelo obtenido permite predecir la resistencia térmica de *E. coli* O157: H7 en cualquier combinación de temperatura, carvacrol y grasa, dentro de los límites estudiados.

**Palabras clave:** Resistencia térmica, antimicrobianos naturales, inocuidad de la carne, metodología de superficie de respuesta.

## ABSTRACT

*Escherichia coli* O157: H7 is one of the most important pathogens in ground beef, and the risk of contamination compromises its safety and quality. Thermal treatments are the main option to ensure food safety; although, the use of additional barriers such as the addition of antimicrobial agents increases safety margins against pathogens growth. In this work the effects and interactions of temperature (55-65 °C), carvacrol (0-2%) and fat (5-20%) on thermal resistance (D-value) of *E. coli* O157: H7 in ground beef were evaluated using response surface methodology. Temperature was the main factor of inactivation, while fat exhibited a protective effect over the pathogen survival. There was an interaction effect between fat and carvacrol, at high concentrations of

fat the carvacrol favored the inactivation of the pathogen. The optimal combination of fat, carvacrol and temperature that ensure the highest inactivation of the pathogen was 63 °C, 11% fat and 1.6% carvacrol. The obtained model allow to predict the thermal resistance of *E. coli* O157: H7 in any combination of temperature, carvacrol and fat, within the limits studied.

**Key words:** Thermal resistance, natural antimicrobials, meat safety, response surface methodology.

## INTRODUCCIÓN

La carne es una fuente excelente de proteínas de alta calidad biológica, vitaminas y minerales de gran importancia para mantener una buena salud física en todas las etapas de la vida (Cashman y Hayes, 2017). La producción de carne de res en México es cercana a los 2 millones de toneladas anuales con un consumo per cápita de 15 kg (Ríos-Flores y Castillo-Arce, 2015). La carne fresca de res se vende al consumidor en forma de bistec, filete y carne molida, principalmente. Esta última es la base para la preparación de diferentes platillos como hamburguesas, picadillo y albóndigas, tanto en el hogar como en establecimientos comerciales para su venta al público.

*Escherichia coli* O157: H7 es uno de los patógenos más importantes que contaminan la carne (Kim *et al.*, 2020). Esta bacteria se encuentra con frecuencia en el intestino del ganado vacuno, llega a la superficie de la canal durante el desollado y evisceración a través del equipo y las manos de las personas que manipulan las canales, y es incorporado en la matriz cárnica durante el proceso de molienda, por eso la mayoría de los casos de infección se han relacionado con el consumo de carne molida cocinada inadecuadamente (CDC, 2020). El Centro para el Control y Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos reporta anualmente más de 95,000 casos de infecciones por *E. coli* O157: H7, y aunque la carne es la principal fuente de infección, alimentos como ensaladas, lechuga romana, leches y jugos sin pasteurizar, son también fuentes importantes (CDC, 2020).

\*Autor para correspondencia: Martín Valenzuela Melendres  
Correo electrónico: martin@ciad.mx

Recibido: 17 de septiembre de 2020  
Aceptado: 16 de noviembre de 2020

Para asegurar la inocuidad de la carne, el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos recomienda cocinar la carne molida hasta alcanzar una temperatura de 71.1 °C (USDA-FSIS, 2020), medida ésta por medio de un termómetro. Sin embargo, su uso no es tan común, siendo el color visual de la carne el método más extendido para juzgar su cocimiento, a pesar de que éste no garantiza la inocuidad del producto (Lin, 2018). Se ha reportado que, a una temperatura interna de cocimiento de 57 °C, el color visual de la carne es similar al de una completamente cocida, pero es insuficiente para eliminar bacterias patógenas (Lyon *et al.*, 2000).

El uso de barreras adicionales como la adición de antimicrobianos permiten dar una mayor confianza al tratamiento con calor y dar un margen de seguridad mayor contra los principales microorganismos contaminantes de la carne (Surendran Nair *et al.*, 2016). El carvacrol es un fenol monoterpénico producido por varias plantas aromáticas, principalmente orégano. Se utiliza en concentraciones bajas como ingrediente aromatizante y condimento de los alimentos, y ejerce una importante actividad antimicrobiana contra los patógenos transmitidos por los alimentos (Scandorieiro *et al.*, 2016). El carvacrol provoca la formación de poros en la bicapa lipídica a través de los cuales se crea un flujo de protones hacia el exterior celular. La formación de los poros trae como consecuencias la desestabilización de la membrana debido a la inserción del carvacrol y la ruptura del equilibrio iónico causado por la salida de los protones. Para aumentar los márgenes de seguridad durante el tratamiento térmico, se ha utilizado el carvacrol en sinergia con el calor para la inactivación de *Salmonella* en carne de pollo (Juneja *et al.*, 2012), así como también la inactivación de *E. coli* O157: H7 y *Clostridium perfringens* en carne molida de res (Juneja y Friedman, 2008; Juneja *et al.*, 2006).

La carne molida de res usualmente contiene grasa en cantidades que oscilan entre 5 y 20%, siendo ésta última la más económica y popular. Se ha demostrado que la grasa en la carne ejerce un efecto protector contra patógenos. La grasa reduce la transferencia de calor y aumenta los tiempos de exposición a una temperatura dada, disminuyendo así la efectividad del tratamiento térmico (Juneja *et al.*, 2001).

En la mayoría de las investigaciones reportadas se estudian en forma separada los diversos factores involucrados en la inactivación de microorganismos patógenos, pasando por alto posibles interacciones entre ellos. Estas interacciones ayudan a comprender las relaciones entre los componentes de la matriz cárnica que se dan de manera natural. Para la descripción del proceso de inactivación térmica no es suficiente conocer la resistencia del patógeno a la temperatura o a los antimicrobianos, sino que también es necesario saber cómo es la interacción del patógenos con todos los componentes de la matriz cárnica y como estos pueden influir en la supervivencia de los microorganismos funcionando como barreras protectoras como en el caso de la grasa. La incorporación de un mayor número de componentes de la matriz permite recrear mejor como se llevan a cabo los procesos de contaminación por parte de los patógenos y el papel de

cada componente en su protección o inhibición. Estudiar los efectos combinados del calor, antimicrobianos naturales y contenido de grasa sobre la resistencia de patógenos, puede volverse una tarea complicada si no se utiliza la estrategia metodológica adecuada. Los modelos de predicción son herramientas útiles que facilitan el estudio de múltiples factores que afectan la resistencia térmica de los patógenos. La metodología de superficie de respuesta es una herramienta matemática y estadística utilizada para evaluar varios factores al mismo tiempo y estimar sus efectos lineales, cuadráticos y de interacción (Montgomery, 2013). El objetivo del presente trabajo fue estudiar la resistencia térmica de *E. coli* O157: H7 en carne molida de res en función de la temperatura y las concentraciones de carvacrol y grasa utilizando la metodología de superficie de respuesta.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Diseño experimental

Se utilizó un diseño central compuesto (DCC) para determinar los efectos e interacciones de la temperatura (T, en los niveles de 55, 57, 60, 63 y 65 °C), carvacrol (C, en los niveles de 0, 0.4, 1.0, 1.6 y 2.0%) y grasa (G, en los niveles de 5, 8, 12.5, 17 y 20%) sobre la resistencia térmica (valores D, tiempo en min para reducir el 90% de la población microbiana) de *E. coli* O157: H7 inoculada en carne molida de res. Las corridas experimentales del DCC se formaron por ocho puntos factoriales, ocho puntos axiales a una distancia de  $\pm 1.68$  del centro y seis réplicas del punto central para un total de 20 tratamientos. Fueron incluidos como control cinco tratamientos sin la adición de grasa y carvacrol (Tabla 1). Se realizaron dos repeticiones del experimento completo y cada combinación de tratamientos se realizó por duplicado en cada repetición.

### Cepas bacterianas y preparación del inóculo

Se empleó la cepa ATCC 43890 de *E. coli* O157: H7 perteneciente al Laboratorio de Tecnologías Emergentes del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. de Hermosillo, Sonora. La cepa se conservó en viales a  $-80$  °C en caldo cerebro-corazón (Labline-Thermo Scientific, Melrose Park, Illinois) con un 15% (vol/vol) de glicerol.

Para la preparación del inóculo se siguió la metodología de Juneja y Novak (2003). Se descongeló el vial que contenía la cepa y se transfirieron 0.1 mL del cultivo descongelado a 10 mL de caldo cerebro-corazón, seguido de 24 h de incubación a 37 °C (Labline-Thermo Scientific, Melrose Park, Illinois). Este procedimiento se realizó por duplicado y posteriormente se tomó 0.1 mL del cultivo para ser inoculado en tubos con 50 mL de caldo cerebro-corazón e incubado a 37 °C por 24 h.

Para la preparación de la suspensión de bacterias a emplear en el ensayo se tomó 0.1 mL del cultivo y se transfirió a un matraz que contenía 50 mL de caldo cerebro-corazón y se incubó por 24 h a 37 °C. Pasadas 24 h los cultivos fueron centrifugados (Eppendorf, modelo 5810R, Hamburgo, Alemania) a 5,000 x g durante 15 min a 4 °C, se decantó el sobrenadante y se disolvió el precipitado en 9.9 mL de agua



**Tabla 1.** Valores codificados y experimentales de los tratamientos resultantes del diseño central compuesto**Table 1.** Coded and experimental values of treatments from the central composite design

Corridas	Valores Codificados			Valores Experimentales		
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Temperatura (°C)	Grasa (%)	Carvacrol (%)
1	-1	-1	-1	57	8	0.4
2	1	-1	-1	57	8	1.6
3	-1	1	-1	57	17	0.4
4	-1	-1	1	57	17	1.6
5	1	1	-1	63	8	0.4
6	1	-1	1	63	8	1.6
7	-1	1	1	63	17	0.4
8	1	1	1	63	17	1.6
9	-α	0	0	55	12.5	1.0
10	α	0	0	65	12.5	1.0
11	0	-α	0	60	5	1.0
12	0	α	0	60	20	1.0
13	0	0	-α	60	12.5	0
14	0	0	α	60	12.5	2.0
15	0	0	0	60	12.5	1.0
16	0	0	0	60	12.5	1.0
17	0	0	0	60	12.5	1.0
18	0	0	0	60	12.5	1.0
19	0	0	0	60	12.5	1.0
20	0	0	0	60	12.5	1.0
21	-α	-α	-α	55	5	0
22	-1	-α	-α	57	5	0
23	0	-α	-α	60	5	0
24	1	-α	-α	63	5	0
25	α	-α	-α	65	5	0

Las corridas 1-8, son puntos factoriales, las 9-14 son puntos axiales, las 15-20 son puntos centrales, y las 21-25 son puntos control del DCC.

de peptona 1% de (BD Diagnostics Systems, Sparks, MD), para una nueva centrifugación a las mismas condiciones. El precipitado fue finalmente disuelto en 2 mL de agua de peptona al 1% obteniendo un inóculo de aproximadamente 8 Log UFC/mL que se empleó para inocular la muestra.

#### Materiales de ensayo y preparación de los tratamientos

Los tratamientos incluyeron carne de res (músculo *Semimembranosus*), grasa dorsal y carvacrol de origen natural grado alimenticio con 98% de pureza (Sigma-Aldich®, Darmstadt, Germany). Tanto la carne como la grasa fueron obtenidos del comercio local y utilizadas el mismo día de la adquisición. Se cortaron en piezas no mayor a 5 cm<sup>3</sup> y se molieron en lotes por separado usando un molino Hobart (modelo 4152, Troy, Ohio, USA) a través de una malla con orificios de 4.8 mm. La carne, grasa y carvacrol fueron mezcladas manualmente durante 1 min, seguido de un mezclado mecánico (Stomacher 80, Lab System, Steward) durante 1 min adicional. La combinación de tratamientos se realizó de acuerdo a lo mostrado en la Tabla 1. Se tomaron porciones de 5.0 ± 0.1 g de cada tratamiento y se colocaron en bolsas estériles para vacío de 9 x 14 cm (Whirl Pak®, USA). Las muestras se congelaron a -40 °C hasta su uso posterior.

#### Tratamiento térmico y enumeración de bacterias super-vivientes

En los días de prueba, las muestras fueron descongeladas a temperatura ambiente e inoculadas con 0.1 mL de la solución bacteriana en agua de peptona 1% para obtener una concentración aproximada de 7 log UFC/g. Posteriormente se mezcló en el stomaker (Stomacher 80, Lab System, Steward) durante 1 min para lograr una distribución homogénea de la bacteria en el producto. Después de esto, cada bolsa se comprimió en una capa delgada (0.5 a 1 mm de espesor) para conseguir una distribución de calor uniforme en la muestra y excluir el aire presente dentro de la bolsa antes de sellarla térmicamente.

Las muestras preparadas para cada tratamiento se colocaron en una gradilla y se sumergieron en un baño de agua con recirculación (ThermoFisher Scientific Neslab Instruments, Inc., Newington, NH) con una temperatura fijada según el DCC de la Tabla 1. Los tiempos para alcanzar la temperatura de prueba en el centro del producto fueron menores a 5 s, por lo que se incluyeron en el tiempo total de calentamiento para el cálculo de los valores D (tiempo para inactivar el 90% de las células bacterianas viables).

El intervalo de tiempo para el muestreo se estableció en función de la exposición y osciló entre 15 min a 55 °C y 10 s a 65 °C. Después del tratamiento térmico, las muestras se sumergieron en un baño de hielo-agua durante 10 min para lograr su rápido enfriamiento. Cada bolsa se abrió asépticamente; se añadieron 5 mL de agua de peptona 1% y se homogeneizaron para recoger la suspensión de líquido resultante de la interacción con la carne. Después de esto, se realizaron diluciones seriadas transfiriendo 0.1 mL del filtrado a 9.9 mL de agua de peptona, y se inocularon sobre agar para conteo en placas (Difco, BD, Sparks, MD), las cuales se dejaron en reposo por 2 h para luego cubrirlas con una capa de agar MacConkey-sorbitol (Difco, BD, Sparks, MD). Las colonias se enumeraron después de 24 h de incubación a 37 °C en una incubadora (Thermo Scientific, Heratherm IMH 180). Cada corrida experimental se realizó por duplicado y se utilizó la media de las UFC/g de dos placas de cada punto de muestreo para determinar la letalidad de la temperatura.

#### Procesamiento de datos, y cálculo del valor D y cálculo del valor z

Se utilizó el modelo Baranyi (Baranyi y Roberts, 1995) con el software de edición DMFit Excel (Institute of Food Research, Norwich, Reino Unido) para ajustar el logaritmo de las poblaciones microbianas y calcular los valores D a partir de la pendiente de la parte lineal de la curva de inactivación. A continuación, los valores D se transformaron a la forma de logaritmo natural (ln) para estabilizar la varianza. Los valores D obtenidos fueron analizados con el paquete estadístico Design Expert para la obtención de los modelos de regresión en función de la temperatura de inactivación y contenidos de grasa y carvacrol.

Los valores z (incremento en la temperatura en °C necesaria para cambiar el valor D en una unidad logarítmica) se

estimaron a partir de la regresión lineal derivada del registro de los valores D frente a sus temperaturas de calentamiento correspondientes, utilizando para ello el software Excel (Microsoft, Redmond, WA). Los valores z se calcularon como el valor absoluto del recíproco de la pendiente de la línea de regresión.

### Análisis estadístico

Se utilizó la metodología de superficie de respuesta para establecer el modelo de regresión. Se realizó un análisis de varianza y se determinó el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y la falta de ajuste del modelo utilizando el paquete estadístico Design Expert 7.0.0 (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, MN, USA). El modelo matemático correspondiente al DCC es:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon \quad (1)$$

donde y es la variable respuesta (valor D),  $\beta_0$ ,  $\beta_i$ ,  $\beta_{ii}$  y  $\beta_{ij}$  son el intercepto y los coeficientes lineales, cuadráticos y de interacción, respectivamente; y  $X_{ij}$  son las variables independientes (temperatura, carvacrol y grasa).

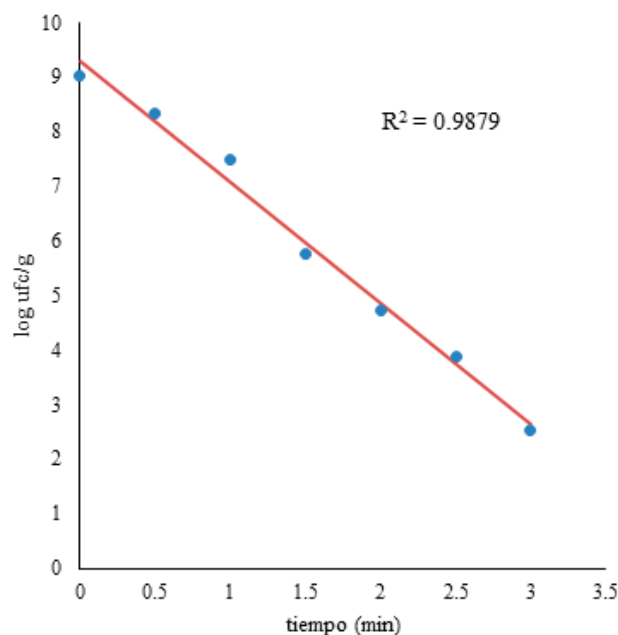
Para la optimización de la variable de respuesta (valor D), se utilizó la técnica de optimización numérica del software Design-Expert. En el presente trabajo se estableció la combinación óptima de temperatura de inactivación, contenido de grasa y contenido de carvacrol que minimizan el valor D durante el procesamiento de carne molida de res. Se preparó un lote de carne molida con los niveles óptimos de los ingredientes, se determinó el valor D experimentalmente y se comparó estadísticamente ( $p < 0.05$ ) con el valor D predicho por el modelo.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Efectos de la temperatura, grasa y carvacrol sobre el valor D

Los efectos de la temperatura, grasa y carvacrol sobre la resistencia térmica de *E. coli* O157: H7 inoculada en carne molida de res se determinaron a partir del cálculo del valor D. La Figura 1 muestra un ejemplo de las curvas de muerte térmica para *E. coli* O157: H7 que fue usada para calcular el valor D de acuerdo al modelo de Baranyi y Roberts (1995). El cálculo se realizó para cada una de las 2 réplicas de las 25 corridas experimentales y el promedio del valor D se utilizó para desarrollar el modelo de regresión aplicando la MSR. La Tabla 2 muestra los resultados experimentales para las 25 combinaciones de los tratamientos de acuerdo al DCC usado. El mayor valor estimado fue 14.45 min obtenido en la corrida 9 (axial) con la combinación de factores: 55 °C, 12.5% grasa y 0% de carvacrol, y el más bajo fue de 0.17 min a partir de la combinación: 65 °C, 5% de grasa y 0% de carvacrol en la corrida 25 (control).

Los efectos de la temperatura, la grasa y el carvacrol se observan en las corridas axiales mostradas en la Tabla 2. Por ejemplo, en las corridas 9 y 10 el valor D disminuye desde 14.45 min hasta 0.18 min cuando la temperatura aumenta de



**Figura 1.** Ajuste de los datos experimentales por el modelo de Baranyi (línea continua) para la supervivencia de *E. coli* O157: H7 (UFC/g) vs tiempo del tratamiento térmico correspondiente a la corrida 5 del DCC (temperatura 63 °C, grasa 8% y carvacrol 0.4%).

**Figure 1.** Adjustment of experimental data by Baranyi model (continuous line) for the survival of *E. coli* O157: H7 (CFU/g) vs heat treatment time corresponding to CCD run 5 (temperature 63 °C, fat 8% and carvacrol 0.4%).

55 a 65 °C y la grasa y el carvacrol permanecen constantes. Cuando la grasa aumenta desde el 5 al 20% y la temperatura y el carvacrol permanecen constantes el valor D aumenta de 0.88 hasta 2.14 min (corridas 11 y 12, respectivamente), lo cual indica que existe un efecto protector de la grasa sobre la bacteria. Un incremento en la concentración de carvacrol de 0 a 2%, disminuye la resistencia térmica de la bacteria como se muestra en las corridas 13 y 14, manteniendo constantes la temperatura y la cantidad de grasa.

### Modelo de regresión para estimar el valor D

La Tabla 3 muestra el coeficiente de regresión para cada uno de los términos del modelo, además de la significancia y el coeficiente de determinación  $R^2$  y la falta de ajuste. De acuerdo al ANOVA el modelo es adecuado ( $p < 0.0001$ ) para predecir la variable respuesta, el cálculo del coeficiente de determinación indica que el 98% de la variación total puede ser explicada con este modelo, además no hay falta de ajuste en él ( $p = 0.206$ ). La Figura 2 muestra el grado de ajuste lineal entre los datos experimentales del valor D y los valores predichos por el modelo estadístico. Los criterios anteriores muestran que el modelo es adecuado para describir los datos experimentales y puede ser empleado para predecir el valor D en los límites establecidos para los factores temperatura (55-65 °C), grasa (5-20%) y carvacrol (0-2%). La ecuación del modelo de regresión se expone a continuación:

$$\ln(\text{Valor D}) = 0.097 - 1.25 T + 0.18 G - 0.13 C - 0.1 GC + 0.16 T^2 + 0.12 G^2$$

**Tabla 2.** Valores D (min) experimentales y predichos para *E. coli* O157: H7 en carne molida de res con diferentes niveles de grasa y carvacrol, cocinadas a diferentes temperaturas

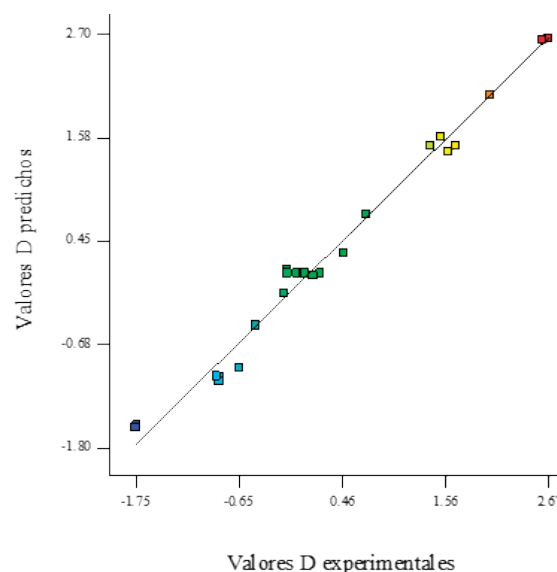
Corrida <sup>a</sup>	Temperatura (°C)	Grasa (%)	Carvacrol (%)	Valores D (min)		
				Experimental		Predicho
				Promedio <sup>b</sup>	DE <sup>c</sup>	LS <sup>d</sup>
1	57	8	0.4	5.35	0.66	4.39
2	57	8	1.6	4.90	0.32	4.14
3	57	17	0.4	7.71	0.44	7.64
4	57	17	1.6	4.57	0.10	4.83
5	63	8	0.4	0.43	0.03	0.36
6	63	8	1.6	0.42	0.02	0.34
7	63	17	0.4	0.63	0.00	0.63
8	63	17	1.6	0.53	0.05	0.40
9	55	12.5	1.0	14.45	0.64	14.22
10	65	12.5	1.0	0.18	0.00	0.21
11	60	5	1.0	0.88	0.01	1.14
12	60	20	1.0	2.04	0.08	2.08
13	60	12.5	0	1.62	0.00	1.37
14	60	12.5	2.0	0.85	0.03	0.89
15	60	12.5	1.0	0.88	0.24	1.10
16	60	12.5	1.0	0.98	0.07	1.10
17	60	12.5	1.0	0.88	0.13	1.10
18	60	12.5	1.0	0.97	0.12	1.10
19	60	12.5	1.0	1.06	0.08	1.10
20	60	12.5	1.0	1.25	0.28	1.10
21	55	5	0	13.50	0.10	13.83
22	57	5	0	4.05	0.72	4.46
23	60	5	0	1.16	0.02	1.07
24	63	5	0	0.41	0.12	0.36
25	65	5	0	0.17	0.01	0.21

<sup>a</sup> Las corridas 1-8, son puntos factoriales, las 9-14 son puntos axiales, las 15-20 son puntos centrales, y las 21-25 son puntos control del DCC  
<sup>b</sup> Promedio de dos replicas, cada una por duplicado  
<sup>c</sup> Desviación estándar  
<sup>d</sup> Límite superior del intervalo de confianza (95%) del valor predicho por el modelo

**Tabla 3.** Coeficientes de regresión estimados (CR) y análisis de varianza del modelo de regresión para *E. coli* O157: H7 en carne molida de res con diferentes niveles de grasa y carvacrol, cocinadas a diferentes temperaturas

Factor	CR	DE	Valor F	Probabilidad
Intercepto	0.097	0.058	179.43	< 0.0001
Temperatura	-1.25	0.039	1032.14	< 0.0001
Grasa	0.18	0.046	14.81	< 0.0012
Carvacrol	-0.13	0.046	7.8	0.012
Grasa x Carvacrol	-0.1	0.045	4.88	0.0403
Temperatura x Temperatura	0.16	0.039	17.045	0.0006
Grasa x Grasa	0.12	0.043	7.64	0.0128
Valor P de la regresión	< 0.0001			
Falta de ajuste	0.206			
R <sup>2</sup>	0.9836			

DE = Desviación estándar



**Figura 2.** Concordancia entre los valores D experimentales y predichos por el modelo para *E. coli* O157: H7 en carne molida de res con diferentes niveles de grasa y carvacrol, cocinadas a diferentes temperaturas.

**Figura 2.** Agreement between experimental and predicted D values for *E. coli* O157: H7 in ground beef with different fat and carvacrol levels, cooked at different temperatures.

De acuerdo a los coeficientes de regresión de cada uno de los términos del modelo presentados en la ecuación anterior se aprecia que la temperatura ( $T = -1.25$ ) es el factor más influyente en la resistencia térmica de *E. coli* O157:H7, seguido de la grasa ( $G = 0.18$ ) y el carvacrol ( $C = -0.13$ ). También son significativos los efectos de interacción entre la grasa y el carvacrol ( $GC$ ) y los efectos cuadráticos de la temperatura ( $T^2$ ) y la grasa ( $G^2$ ).

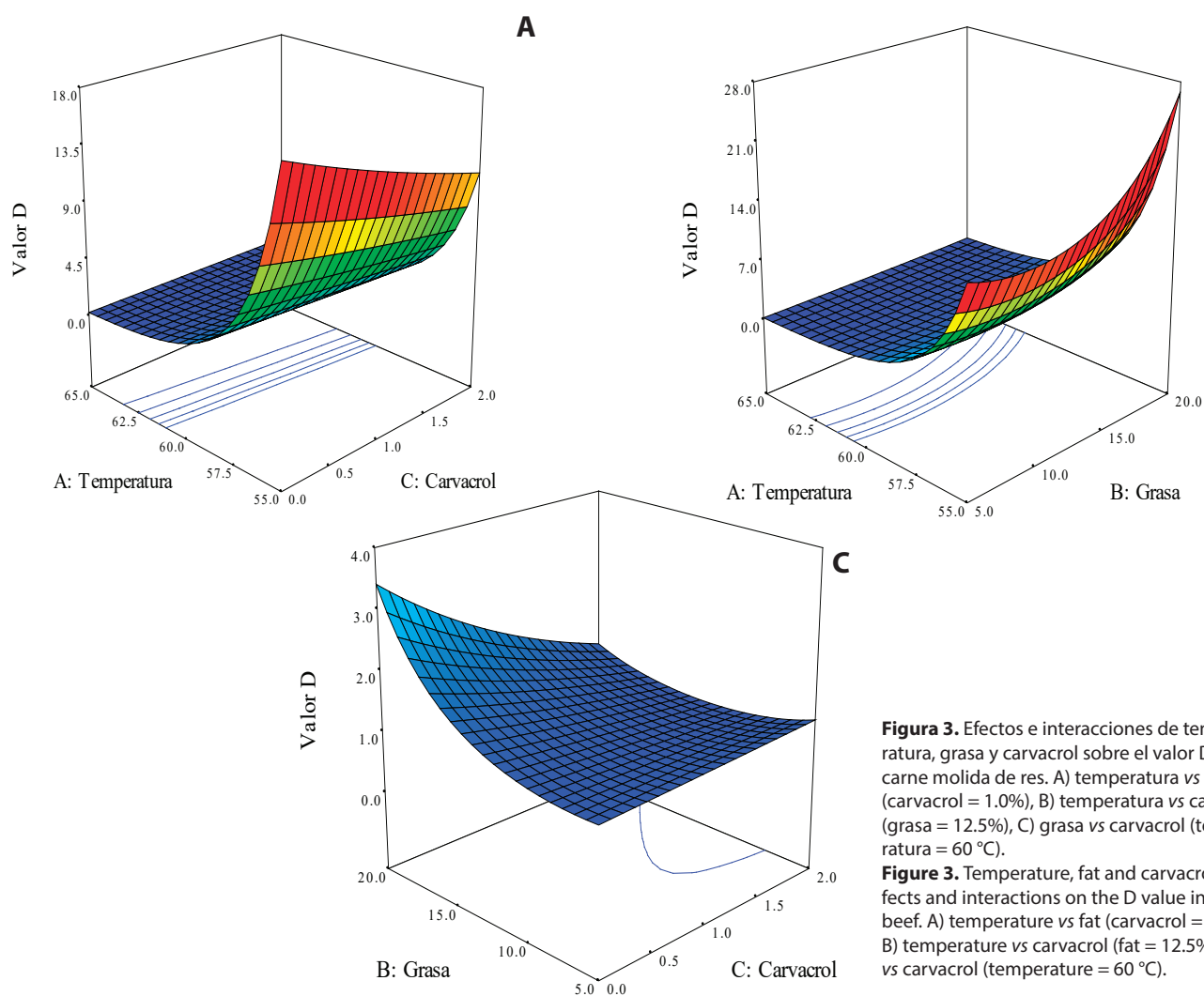
Los coeficientes de regresión negativo para la temperatura y para el carvacrol indican que a medida que éstos aumentan, el valor D disminuye. Por el contrario, la adición de grasa a la carne molida muestra un comportamiento opuesto (coeficiente de regresión positivo), con respecto al valor D estimado por el modelo. Estos comportamientos se pueden observar gráficamente en la Figura 3a y Figura 3b donde se muestran los efectos combinados de temperatura-grasa, y temperatura-carvacrol, respectivamente. El efecto cuadrático de la temperatura se evidencia en estas mismas figuras por la curvatura observada alrededor de los 61 °C, temperatura a partir de la cual *E. coli* O157:H7 no ofrece resistencia al calor.

El efecto de la temperatura en la inactivación de *E. coli* O157:H7 se debe principalmente a la acción del calor sobre

las membranas celulares y las proteínas. La configuración de la membrana se ve afectada porque los fosfolípidos que componen la bicapa, cambian su estructura haciéndola más fluida y más permeable a los componentes del medio. También se desnaturalizan las proteínas embebidas en la membrana celular y el citosol, causando un grave daño en la integridad de la membrana y el metabolismo celular.

Smith *et al.* (2001), realizaron la inactivación térmica de *E. coli* O157:H7 en carne molida de res con condiciones de temperatura (55, 58, 61 y 63 °C) y grasas (4.8%) similares a los controles del presente estudio (55, 57.5, 60 y 62.5 °C con 5% de grasa). Los valores D encontrados: 20.08 min a 55 °C, 1.22 min a 58 °C, 0.32 min a 61 °C y 0.16 min a 63 °C, muestran que, al aumentar la temperatura de cocción, el tiempo necesario para lograr la muerte térmica del patógeno se reduce significativamente.

La grasa tiene un efecto protector contra la inactivación térmica de *E. coli* O157:H7 en carne molida ( $G = 0.18$ ), por lo tanto, un aumento en ella causa la misma tendencia en el valor D. El efecto de la grasa sobre el valor D es solo a temperaturas inferiores a 60 °C, a partir de este valor no hay influencia en la resistencia del microorganismo al calor,



**Figura 3.** Efectos e interacciones de temperatura, grasa y carvacrol sobre el valor D en carne molida de res. A) temperatura vs grasa (carvacrol = 1.0%), B) temperatura vs carvacrol (grasa = 12.5%), C) grasa vs carvacrol (temperatura = 60 °C).

**Figure 3.** Temperature, fat and carvacrol effects and interactions on the D value in ground beef. A) temperature vs fat (carvacrol = 1.0%), B) temperature vs carvacrol (fat = 12.5%), C) fat vs carvacrol (temperature = 60 °C).



independientemente de la cantidad de grasa añadida (Figura 3a). A partir de los 60 °C, la temperatura tiene un efecto mayor sobre la mortalidad de los patógenos que no puede ser afectado por la presencia de la grasa en la matriz cárnica. La temperatura de fusión de la grasa de res está entre 40 y 48 °C, dependiendo de la zona de la que ésta provenga. A los 60 °C la grasa se encuentra en estado líquido y su efecto protector se ve reducido respecto a la temperatura debido a que la transmisión del calor es mucho más rápida que en estado sólido y las micelas de grasa que protegían a las bacterias del calor de la cocción se han perdido (Grompone *et al.*, 1991).

La grasa en los productos cárnicos juega un papel importante en el sabor y la textura y su influencia en la supervivencia de los microorganismos patógenos ha sido demostrada por su acción como barrera contra el calor durante los tratamientos térmicos (Juneja *et al.*, 2001). La matriz cárnica forma micelas de grasa que actúan como barrera y pueden contener bacterias patógenas como *E. coli* O157:H7. La transmisión de calor se vuelve heterogénea y se crean puntos térmicos aislados que favorecen la resistencia bacteriana y disminuyen la efectividad de los tratamientos térmicos. Las bacterias suspendidas en la grasa son más difíciles de destruir que las suspendidas en un medio acuoso, debido a una reducción en la actividad de agua. Un aumento en el contenido de grasa, disminuye el contenido de humedad lo cual altera la transferencia de calor (Ahmed *et al.*, 1995). Cuanto mayor sea la cantidad de grasa que tiene la carne molida, se debe prestar más atención a su cocción, ya que podría proteger o enmascarar microorganismos patógenos como *E. coli* O157:H7.

En relación al efecto del carvacrol sobre el valor D, este presenta un efecto significativo ( $p < 0.05$ ) y de acuerdo al coeficiente en el modelo ( $C = -0.13$ ), el signo negativo indica que cuando se añade el carvacrol a la carne, el valor D de *E. coli* O157:H7 disminuye. La influencia del carvacrol depende de la cantidad de grasa en el producto como lo indica el efecto significativo ( $p < 0.05$ ) de la interacción grasa-carvacrol ( $GC = 0.1$ ), este comportamiento se aprecia claramente en la Figura 3c. A bajas concentraciones de grasa, de alrededor del 5%, el efecto del carvacrol no es tan marcado como a altas concentraciones. Esta tendencia se debe a las propiedades químicas del carvacrol que lo hacen más soluble en compuestos no polares, ya que tiene un coeficiente de partición LogP = 3.49 (Nazzaro *et al.*, 2013). Un valor alto de LogP ( $> 2.5$ ) indica que una sustancia es más hidrofóbica. Por lo tanto, el carvacrol es más soluble en sustancias orgánicas como la grasa que en el agua (Baluja *et al.*, 2017).

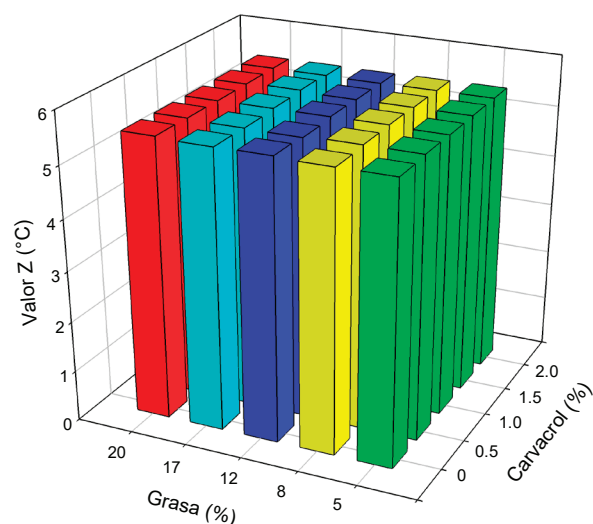
La acción antimicrobiana del carvacrol se basa en su interacción con las membranas bacterianas, provocando daños irreparables en la estructura al elevar la permeabilidad y la despolarización (Ait-Ouazzou *et al.*, 2013). Se ha observado que añadir carvacrol al medio de crecimiento de *E. coli* provoca un aumento del flujo de ATP y de iones  $PO_4$  y  $K^+$ , del interior hacia el exterior de la membrana bacteriana (Can Baser, 2008).

### Efecto de la grasa y carvacrol sobre la estimación de los valores z

El impacto de la adición de diferentes cantidades de grasa y carvacrol sobre la resistencia térmica de *E. coli* O157:H7 en carne molida se muestra en la Figura 4. El valor z obtenido para cada combinación de carvacrol y grasa en los rangos de 0 al 2% y de 5 al 20%, respectivamente, permaneció constante, siendo éste de 5.47 °C. Este valor indica que para lograr una reducción de un logaritmo en el valor D, la temperatura de tratamiento térmico del alimento debe aumentar en 5.47 °C. El valor z es un factor que se calcula para cada alimento y cada microorganismo a partir del valor D, y se utiliza para la implementación de tratamientos térmicos y el cálculo de la letalidad sobre los microorganismos de interés en el alimento.

### Optimización y validación de la condición óptima predicha por el modelo de regresión

La optimización de las condiciones de proceso para carne molida res se realizó de acuerdo a lo descrito en la sección de materiales y métodos. Las condiciones óptimas de proceso que minimizaron los valores D fueron: tratamiento térmico de 63 °C de carne molida de res adicionada con 11% de grasa y 1.6% de carvacrol. El valor D predicho por el modelo para estas condiciones fue de 0.30 min. Para determinar cuán preciso es el modelo de regresión en la predicción de los valores de D en carne molida de res, se comparó el valor D experimental ( $n = 8$ , rango de 0.20 a 0.36 min) contra el valor D predicho por el modelo (0.30 min) en las condiciones óptimas y no se encontraron diferencias ( $p > 0.05$ ). A partir de este resultado se puede afirmar que el modelo obtenido es capaz de predecir con una probabilidad mayor al 95% el valor D para las condiciones evaluadas. Validar el modelo



**Figura 4.** Valores z de *E. coli* O157:H7 calculados a partir de los valores D estimados en carne molida de res adicionada con carvacrol (0 al 2%) y grasa (5 al 20%).

**Figure 4.** *E. coli* O157:H7 z-values calculated from estimated D-values in ground beef added with 0 to 2% carvacrol and 5 to 20% fat.

permite demostrar la eficacia del mismo para ser usado en procesos térmicos con un elevado grado de confianza.

## CONCLUSIONES

En el presente trabajo se logró obtener un modelo de regresión por MSR que describe el comportamiento de la resistencia térmica de *E. coli* O157: H7 en función de la temperatura (55-65 °C), y la concentración de grasa (5-20%) y carvacrol (0-2%) en carne molida de res. La temperatura fue el factor que más influyó en la resistencia térmica del patógeno, seguido de la grasa y el carvacrol. Tanto la temperatura como el carvacrol disminuyeron la resistencia térmica del *E. coli* O157: H7, mientras que la grasa tuvo un efecto protector. Este efecto protector fue revertido por la adición de carvacrol, tal como lo indica el efecto de interacción entre estos factores. Las condiciones óptimas que minimizan el valor D fueron: 63 °C, 11% de grasa y 1.6% de carvacrol. Con estas condiciones, el valor D predicho por el modelo fue de 0.30 min. Durante la validación del modelo, se demostró que no existen diferencias entre el valor predicho por el modelo y los obtenidos experimentalmente. El procesador de alimentos puede seleccionar cualquier combinación de temperatura, grasa y carvacrol, en los límites establecidos, para estimar la reducción logarítmica de *E. coli* O157: H7 en carne molida de res.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada al primer autor durante sus estudios de Maestría en Ciencias.

## REFERENCIAS

- Ahmed, N. M., Conner, D. E., Huffman, D. L. 1995. Heat-resistance of *Escherichia coli* O157: H7 in meat and poultry as affected by product composition. *Journal of Food Science*. 60: 606-610.
- Ait-Ouazzou, A., Espina, L., Gelaw, T., de Lamo-Castellví, S., Pagán, R., García-Gonzalo, D. 2013. New insights in mechanisms of bacterial inactivation by carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*. 114: 173-185.
- Baluja, S., Kulshrestha, A., Movalia, J. 2017. 1-Octanol-water partition coefficient of some cyanopyridine and chalcone compounds. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*. 46: 342-356.
- Baranyi, J., Roberts, T. A. 1995. Mathematics of predictive food microbiology. *International Journal of Food Microbiology*. 26: 199-218.
- Can Baser, K. 2008. Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. *Current Pharmaceutical Design*. 14: 3106-3119.
- Cashman, K. D., Hayes, A. 2017. Red meat's role in addressing 'nutrients of public health concern'. *Meat Science*. 132: 196-203.
- Centers for Disease Control and Prevention. 2020. *E. coli* (*Escherichia coli*). Disponible en: <https://www.cdc.gov/ecoli/index.html>
- Grompone, M. A. 1991. Propiedades físicas y químicas de las grasas bovinas fraccionadas e interesterificadas. *Grasas y Aceites*, 42: 349-355.
- Juneja, V. K., Eblen, B., Marks, H. 2001. Modeling non-linear survival curves to calculate thermal inactivation of *Salmonella* in poultry of different fat levels. *International Journal of Food Microbiology*. 70: 37-51.
- Juneja, V. K., Friedman, M. 2008. Carvacrol and cinnamaldehyde facilitate thermal destruction of *Escherichia coli* O157: H7 in raw ground beef. *Journal of Food Protection*. 71: 1604-1611.
- Juneja, V. K., Novak, J. S. 2003. Heat resistance of *Escherichia coli* O157: H7 in cook-in-bag ground beef as affected by pH and acidulant. *International Journal of Food Science & Technology*. 38: 297-304.
- Juneja, V. K., Thippareddi, H., Friedman, M. 2006. Control of *Clostridium perfringens* in cooked ground beef by carvacrol, cinnamaldehyde, thymol, or oregano oil during chilling. *Journal of Food Protection*. 69: 1546-1551.
- Juneja, V. K., Yadav, A. S., Hwang, C.-A., Sheen, S., Mukhopadhyay, S., Friedman, M. 2012. Kinetics of thermal destruction of *Salmonella* in ground chicken containing trans-cinnamaldehyde and carvacrol. *Journal of Food Protection*. 75: 289-296.
- Kim, J.-S., Lee, M.-S., Kim, J. H. 2020. Recent Updates on Outbreaks of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and Its Potential Reservoirs. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 10: 1-10.
- Lin, C.-T. J. 2018. Self-reported methods used to judge when a hamburger is ready at-home in a sample of US adults. *Food Control*. 91: 181-184.
- Lyon, B., Berry, B., Soderberg, D., Clinch, N. 2000. Visual color and doneness indicators and the incidence of premature brown color in beef patties cooked to four end point temperatures. *Journal of Food Protection*. 63: 1389-1398.
- Mongomery, C. D. 2013. *Design and analysis of experiments* (eighth ed.): John Wiley & Sons Inc.
- Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., De Feo, V. 2013. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*. 6: 1451-1474.
- Ríos-Flores, J. A. y Castillo-Arce, M. L. 2015. La competitividad de la carne fresca de res mexicana en el mercado estadounidense. *Estudios Fronterizos*, 16: 221- 245.
- Scandorieiro, S., de Camargo, L. C., Lancheiros, C. A., Yamada-Ogatta, S. F., Nakamura, C. V., de Oliveira, A. G., Andrade, C. G., Duran, N., Nakazato, G., Kobayashi, R. K. 2016. Synergistic and additive effect of oregano essential oil and biological silver nanoparticles against multidrug-resistant bacterial strains. *Frontiers in Microbiology*. 7: 1-14.
- Smith, S., Maurer, J., Orta-Ramirez, A., Ryser, E., Smith, D. 2001. Thermal inactivation of *Salmonella* spp., *Salmonella typhimurium* DT104, and *Escherichia coli* O157: H7 in ground beef. *Journal of Food Science*. 66: 1164-1168.
- Surendran Nair, M., Lau, P., Belskie, K., Fancher, S., Chen, C.-H., Karumathil, D. P., Yin, H.-B., Liu, Y., Ma, F., Upadhyaya, I. 2016. Potentiating the heat inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 in ground beef patties by natural antimicrobials. *Frontiers in Microbiology*. 7: 1-8.
- USDA-FSIS. (2020). U.S. Department of Agriculture, Food Safety Inspection Service. Disponible en: <https://www.fsis.usda.gov/wps/portal/fsis/topics/food-safety-education/get-answers/foodsafety-fact-sheets/meat-preparation/color-of-cooked-ground-beef-as-itrelates-to-doneness>



## Efecto del tratamiento térmico en harina de avena utilizada en la sustitución de harina de trigo para la elaboración de pan

Heat treatment effect on oat flour used in the substitution of wheat flour for bread- making

Francisco Vásquez-Lara<sup>\*1,2</sup>, Samuel Verdú-Amat<sup>1</sup>, Alma R. Islas-Rubio<sup>2</sup>, José M. Barat-Baviera<sup>1</sup>, Raúl Grau-Meló<sup>1</sup>, María del Carmen Granados-Nevárez<sup>2</sup>, Benjamín Ramírez Wong<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Tecnología de Alimentos. Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera s/n, C.P. 46022, Valencia, España.

<sup>2</sup> Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Carretera Gustavo Enrique Astiazarán Rosas No. 46, Col. La Victoria, C.P. 83304, Hermosillo, Sonora, México.

<sup>3</sup> Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos. Universidad de Sonora, CP 83000, Hermosillo, Sonora, México.

### RESUMEN

La harina de avena fue tratada térmicamente a 80, 100 y 130 °C durante 30 min para después ser utilizada en sustitución del 10 y 20 % de harina de trigo para la elaboración de pan. Se determinó capacidad de retención de agua, perfil de viscosidad, volumen específico y análisis de perfil de textura a los 0, 2 y 7 días de elaborado el pan. Los parámetros de viscosidad fueron afectados por los dos niveles de sustitución de harina de avena y el tratamiento térmico. Al utilizar harina de avena tratada a 100 °C a 10 y 20 % de sustitución, el volumen específico de pan aumentó (2.64 y 2.75 cm<sup>3</sup>/g). El perfil de textura, también se vio afectado por el nivel de sustitución y el tratamiento térmico a los 7 días de almacenamiento, la firmeza del pan disminuyó cuando se usó 10 % de harina de avena tratada a 130 °C (12.86 N) en comparación al elaborado con harina de trigo (19.63 N). Los tratamientos térmicos en harina de avena empleada para sustituir la harina de trigo pueden ser una alternativa importante para mejorar la calidad en productos de panificación.

**Palabras clave:** Harina de trigo, harina de avena, tratamiento térmico, sustitución.

### ABSTRACT

Oat flour was heat treated at 80, 100 or 130 °C for 30 min, then used to replace 10 or 20 % wheat flour in bread-making process. Water retention capacity, viscosity profile, specific volume, and texture profile analysis were determined at 0, 2 and 7 days after bread-making. Viscosity parameters were affected by the two levels of oat flour substitution and heat treatment. When using oat flour treated at 100 °C and substitution level of 10 and 20 %, the specific volume of bread increased (2.64 and 2.75 cm<sup>3</sup>/g). The texture profile was also affected by the level of substitution and heat treatment at 7 days of storage, the firmness of the bread decreased when 10 % of oat flour treated at 130 °C (12.86 N) was used in comparison to that made with wheat flour (19.63 N). Heat treatments in oat flour used to replace wheat flour can be an important alternative to improve the quality of bread-making products.

**Key words:** Wheat flour, oat flour, heat treatment, substitution.

### INTRODUCCIÓN

Después de la molienda, la harina de trigo normalmente recibe ciertos tratamientos para mejorar algunas de sus propiedades. En particular puede ser la adición de aditivos como agentes de maduración u oxidantes (bromato de potasio, ácido ascórbico, azodicarbonamida o sulfato cúprico), blanqueamiento (peróxido o gas de cloro) o ingredientes para promover la fermentación. Los agentes de maduración causan cambios fisicoquímicos en la harina, propiedades similares a las realizadas en el proceso de envejecimiento natural que afectan las propiedades reológicas de la masa y, por lo tanto, la capacidad de retención de gas del gluten (Serna-Saldívar, 1996). Los agentes blanqueadores que reducen el contenido de pigmentos amarillos causan una coloración blanca en las harinas.

Un complemento al tratamiento anterior puede ser la aplicación de tratamientos térmicos en harinas que han sido utilizados ampliamente en la industria harinera mucho antes de la eliminación del proceso de cloración (blanqueo de harina con dióxido de cloro) a principios de los 90s (Ches-terton *et al.*, 2015). La harina tratada con calor tiene muchas aplicaciones dentro del procesamiento de alimentos, entre ellas: la preparación de alimentos para bebés, salsas, sopas, cremas y rellenos, espesante, alimentos instantáneos, alimentos precocinados, confitería, mayonesa, pan y productos derivados de trigo, entre otros. Russo & Doe (1970), fueron los primeros en patentar este proceso usando un rango de temperatura de 100 a 115 °C durante 60 min. Otros investigadores (Cauvain *et al.*, 1976) sugirieron un tratamiento térmico en el grano de trigo y sémola hasta un contenido de humedad del 6 %. Hanamoto & Bean (1979), patentaron el método para producir harinas tratadas térmicamente, utilizando una temperatura de 71 °C por 4 días. Estudios de Nakamura *et al.* (2008) observaron un aumento en el volumen del pastel Kasutera (pastel popular en Japón) cuando la harina de trigo se trató a 120 °C durante 30 min. Otras harinas de cereales

\*Autor para correspondencia: Francisco Vsásquez-Lara  
 Correo electrónico: fvas@ciad.mx

Recibido: 19 de octubre de 2020

Aceptado: 15 de enero de 2021



que han sido expuestas al tratamiento térmico son la harina de sorgo. Estudios de Marston *et al.* (2016) utilizaron harina de sorgo para preparar pan sin gluten, que se trató con calor a 95 °C y 125 °C durante 15, 30 o 45 min, observando efectos importantes en la viscosidad de la masa, volumen específico del pan y en la miga. También se realizaron tratamientos térmicos en almidones. Jiranuntakul *et al.* (2011), aplicaron temperaturas de 100 °C por 16 h a diferentes almidones de arroz, papa, maíz, entre otros, observando cambios significativos en la temperatura de gelatinización y la viscosidad. El tratamiento térmico en harinas y la eliminación de la humedad pueden modificar las propiedades físicas, reológicas y biológicas de las harinas. La eliminación de la humedad es esencial para lograr los cambios necesarios, sin embargo, es importante ajustar de nuevo la humedad de la harina para lograr resultados óptimos de cocción (Neill *et al.*, 2012). El tratamiento térmico afecta la extensibilidad de la masa y la absorción de agua, además de la gelatinización de almidón. En las harinas utilizadas en la fabricación de pan se ha observado que el tratamiento térmico ha aumentado la resistencia, la viscosidad y la rigidez (Gelinas *et al.*, 2001). Estos efectos tienden a aumentar la elasticidad de la masa y producir un efecto positivo en el volumen del pan (Pylar, 1988). En base a lo anterior, el objetivo de este trabajo de investigación, fue evaluar el efecto en las características texturales, reológicas y calidad del pan que tiene el uso de harina de avena tratada térmicamente en la sustitución de harina de trigo.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Materia prima

La harina de avena (HA) comercial (marca Biográ) se obtuvo de un productor local, La Carabasseta, Valencia, España. Su composición fue de: 11.3 % de proteína, 8.0 % de grasa, 12.6 % de humedad y 0.92 % de cenizas (base seca). La harina de trigo comercial (HT) fue suministrada por un productor local, Molí de Picó-Harinas Segura S. L. Valencia, España. Su composición fue: 12.7 % de proteína, 1.0 % de grasa, 13.09 % de humedad y 0.32 % de cenizas (base seca). Para mantener la homogeneidad en el tamaño de partícula, la HA se molió en un molino de acero inoxidable (Retsch GmbH, ZM 200, Haan, Alemania), hasta que se logró la misma distribución del tamaño de partícula que la HT utilizada (malla #80). Las harinas compuestas se obtuvieron sustituyendo 10 y 20 % (p/p) de HT con HA. El resto de los ingredientes utilizados para panificación fueron: aceite de girasol (Koipesol Semillas, S.L, España), levadura prensada (*Saccharomyces cerevisiae*, Lesafre Ibérica, S.A, España), azúcar blanco ( $\geq 99.8$  % de sacarosa, Azucarera Ebro, S.L España) y sal (sal marina refinada  $\geq 97$  % NaCl Salinera Española S.A, España), que se compraron en tiendas locales.

### Tratamientos térmicos en harina de avena

La HA fue sometida a tratamientos térmicos de 80, 100 y 130 °C durante 30 min en una estufa con aire caliente de convección forzada (Neill *et al.*, 2012). La temperatura se controló con termómetro digital (rango 0-300 °C, resolución

0.1 °C, precisión  $\pm 0.2$  °C). Durante este proceso, la humedad se redujo de 15 % al 10.5 %. La pérdida de humedad se calculó gravimétricamente en función de la diferencia de masa entre los pesos, antes y después del tratamiento térmico. Para recuperar los valores de humedad originales, las harinas se colocaron en una cámara (KBF720 Binder Tuttlingen Alemania) con humedad y temperatura controladas (15 % HR y 25 °C) por 48 h.

### Capacidad de retención de agua (CRA)

Se realizó de acuerdo con el método 56-11.02 (AACC, 2000). Las muestras de harina (5 g) se pesaron en tubos de centrífuga (50 mL) con tapones de rosca. Luego se añadieron 25.0 mL de agua y se agitó vigorosamente 5 s para suspender la harina. Las muestras se mantuvieron durante 20 min en un mezclador vórtex con agitación intermitente a los 5, 10, 15 y 20 min, seguido de 15 min de centrifugación 1000 x g (Centrifuge Beckman Coulter Allegra X-30R, Brea, California, EE. UU.). El sobrenadante se desechó y el sedimento húmedo obtenido se dejó decantar por 10 min, posteriormente se pesó. La CRA se calculó según lo descrito por Haynes *et al.* (2009).

### Perfil de viscosidad (Rapid Visco Analyser, RVA)

El perfil de viscosidad de las harinas se obtuvo por el método 76-21.02 (AACC, 2000). Se utilizó el viscosímetro RVA-S4 (Rapid Visco Analyzer Super 4, Newport Scientific, Warriewood, Australia). Las mezclas de harinas se analizaron sobre la base de 3.5 g  $\pm 0.01$  g de muestra ajustada al 14 % de humedad. La cantidad de agua incorporada fue de 25 g  $\pm 0.01$  g. El perfil de prueba fue de una temperatura inicial de 50 °C y 960 RPM, y disminuyó a 160 RPM a los 10 s. En el min 1 de la prueba, la temperatura fue de 50 °C, después se aumentó a 95 °C durante 4.42 min y permaneció así hasta los 7.42 min. Al min 11, la temperatura bajó a 50 °C y se mantuvo durante 2 min más hasta que la prueba finalizó a los 13 min. Los parámetros obtenidos fueron: temperatura de gelatinización, viscosidad pico, mínima, de rompimiento, de restitución y final.

### Proceso de panificación

La formulación utilizada para preparar la masa de pan fue la siguiente: 56 % de harina (HT o mezclas de harinas), 2 % de aceite de girasol refinado, 2 % de levadura prensada comercial, 4 % de azúcar blanca, 1.5 % de sal y 34.5 % de agua (Verdú *et al.*, 2015). El proceso se llevó a cabo mezclando todos los ingredientes en el mezclador de alimentos Thermomix TM31 (Vorwerk, Alemania). Los componentes líquidos (agua y aceite), azúcar y sal se mezclaron 2 min a 37 °C. Se añadió levadura para mezclar a la misma temperatura por 30 s. Se agregó harina y se mezcló con los ingredientes de acuerdo con un programa predeterminado para hacer una masa homogénea para panificación. El sistema se basa en mezclar los ingredientes con giros aleatorios de la hélice del mezclador en ambas direcciones (550 RPM). Este proceso se aplicó por 4.5 min a 37 °C. Después se colocaron 250 g de



masa en el molde de metal (8x8x30 cm) para llevar a cabo la fermentación. Esta se realizó en una cámara con humedad y temperatura controlada (KBF720, Binder, Tuttlingen, Alemania). Las condiciones del proceso de fermentación fueron 40 °C y 90 % de HR. Las masas fueron fermentadas durante 1 h. El proceso de horneado se realizó al finalizar la fermentación. Los moldes conteniendo la masa se colocaron en el horno (De Longhi, Italia) pre-calentado a 200 °C. El tiempo de horneado fue de 15 min.

### Evaluaciones en pan

Se midió el volumen de pan mediante el método de desplazamiento de semillas de colza (Cordero *et al.*, 2020). Lo anterior permitió determinar el volumen específico ( $\text{cm}^3/\text{g}$ ) que se calculó en base a la relación entre el volumen ( $\text{cm}^3$ ) y el peso de pan (g). El proceso de horneado también se estudió en función de la pérdida de peso producida (g). Se cuantificó por la diferencia entre el peso de la masa (g) y el peso de pan (g).

### Actividad de agua ( $A_w$ )

La actividad de agua ( $A_w$ ) de las migas se determinó con el higrómetro Aqualab® de punto de rocío (DECAGÓN Aqualab CX-2, Pullman, WA, EE. UU.).

### Análisis del perfil de textura (TPA)

El análisis del perfil de textura (TPA) se realizó a los 0, 2 y 7 días de almacenamiento a temperatura ambiente, siguiendo el método utilizado por Miñarro *et al.* (2012), donde se obtuvieron tres rebanadas de la sección transversal de 12.5 mm de espesor del centro de cada pan. El análisis de perfil de textura se realizó en el analizador de textura TA-TX2 (Stable Micro Systems, Surrey, Reino Unido). Se usó una celda de carga de 25 kg y la velocidad del ensayo fue de 1.7 mm/s para comprimir el centro de la miga del pan 50 % de su altura. El tiempo entre compresiones fue de 5 s.

### Análisis estadístico

Los resultados se analizaron aplicando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía utilizando el procedimiento de comparación múltiple para determinar que medias son significativamente diferentes de otras. Para discriminar entre las medias se utilizó el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Para el análisis se usó el programa Statgraphics Centurion XVI con un nivel de confianza del 95 %.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Capacidad de retención de agua (CRA)

En harinas de trigo esta propiedad es utilizada para determinar su calidad y capacidad para formar una masa visco-elástica, la cual es fundamental en la industria de los alimentos ya que puede determinar sus propiedades funcionales. La Figura 1A, muestra los resultados en la CRA cuando HT se sustituyó con 10 y 20 % de HA tratada térmicamente a 80, 100 y 130 °C. Se observó una tendencia a disminuir la

CRA al incrementar el tratamiento térmico en HA y el nivel de sustitución de HT. Todos los valores obtenidos resultaron menores al que se obtuvo en HT (69.03 %). Esto posiblemente ocasionado por un pre-cocimiento del almidón a causa de los tratamientos térmicos a la que fue sometida la HA utilizada en los diferentes niveles de sustitución.

También se ha observado que al aplicar altas temperaturas en harinas es posible llevar a cabo una desnaturalización de proteínas que son afectadas en la capacidad de retener agua (Protonotariou *et al.*, 2014). Otros estudios realizados por Berton *et al.* (2002) encontraron que la capacidad de retención de agua depende principalmente de la cantidad de almidón dañado, cuando utilizaron harina de trigo en sus investigaciones. Estudios realizados por Duyvejonck *et al.* (2011) también encontraron una relación muy importante entre el nivel de daño en el almidón y la capacidad de retención de agua en harinas de trigos europeos. Estudios realizados por Protonotariou *et al.* (2014), observaron un efecto altamente significativo entre la distribución de tamaño de partículas y propiedades funcionales en harinas de trigo como lo es la capacidad de retención de agua. Pauly *et al.* (2013) concluyeron que cuanto mayor es el área de superficie específica por unidad de peso, mayor es la tasa de hidratación y absorción de agua en harinas. Por lo anterior, es que la CRA juega un papel muy importante en las propiedades de los alimentos como puede ser la textura del producto final.

### Perfil de viscosidad (Rapid Visco Analyser, RVA)

El RVA normalmente se relaciona con el comportamiento del almidón, sin embargo, existen otros componentes muy importantes que pueden influir en esta prueba como son las proteínas y lípidos. Estos componentes interactúan con el almidón y afectan la medición de viscosidad en el RVA (Batey, 2009). En este trabajo se estableció el perfil de viscosidad de HT, además de las mezclas de harina de HT sustituidas con HA tratada térmicamente a 80, 100 y 130 °C a niveles de 10 y 20 %.

La Figura 1B, muestra el efecto que tuvo la sustitución de HT con HA tratada térmicamente sobre la temperatura de gelatinización (°C). Se observó una reducción significativa en HT (68.95 °C), con respecto a la que se obtuvo cuando HA se usó en la sustitución de HT al 10 y 20 %, tratada a 80 y 100 °C. Sin embargo, al aumentar el tratamiento térmico a 130 °C, para los dos niveles de sustitución este parámetro se redujo considerablemente (67.67 y 69.35 °C). Este comportamiento puede explicarse por la gelatinización previa de almidón cuando se emplean altas temperaturas, en este caso 130 °C, generando así una disminución en el contenido de gránulos de almidón disponibles para gelatinizar. El hinchamiento del gránulo de almidón comienza tan pronto como el gránulo empieza a hidratarse. La hidratación es un precursor esencial para la gelatinización. En la mayoría de los almidones, la gelatinización completa es un requisito previo esencial para que el cocimiento (empaste) sea observado (Batey, 2009). Estudios realizados por Neill *et al.* (2012) observaron éste mismo comportamiento al utilizar tratamientos térmicos en HT.

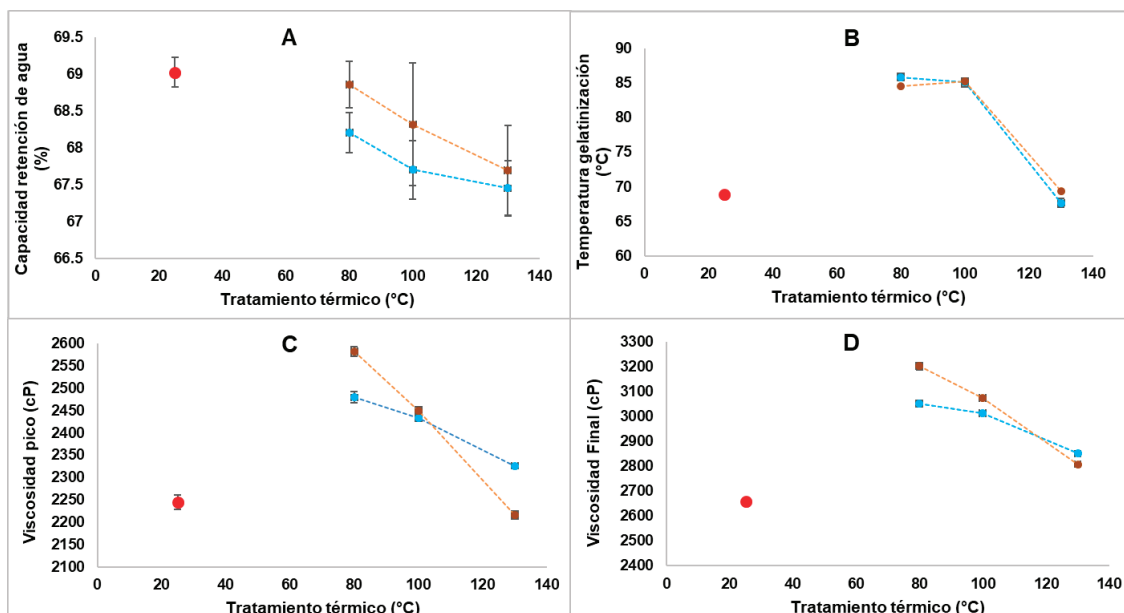
La Figura 1C, muestra los efectos que tuvieron los tratamientos térmicos mencionados anteriormente en la viscosidad pico de las harinas sustituidas con HA. La viscosidad pico, es la viscosidad máxima registrada por una muestra durante el calentamiento. Con respecto a este parámetro se observó un aumento significativo al utilizar HA al 10 y 20 % tratada a 80 y 100 °C, con respecto a HT (2245 cP). Al aumentar el tratamiento a 130 °C, la disminución en viscosidad fue más evidente cuando la sustitución fue del 20 % (2217 cP), incluso llegando a ser inferior a la obtenida para HT. Estudios realizados por Neill *et al.* (2012) en HT tratada térmicamente muestran disminuciones de 320 BU a 220 BU empleando el Viscógrafo Brabender. Ozawa *et al.* (2009) estudiaron el efecto del tratamiento térmico (120 °C durante 30, 60, 90 y 120 min) sobre el almidón de HT observando una disminución en la viscosidad pico de 694 a 646 RVU.

Los gránulos que tienen una alta capacidad de hinchamiento también tienden a tener una alta viscosidad. La velocidad de calentamiento tiene un efecto importante sobre la viscosidad pico. Contrario a lo anterior, la reducción en el hinchamiento de los gránulos de almidón es indicativo de las bajas viscosidades pico y la disminución en la ruptura de los gránulos de almidón (Ktenioudaki *et al.*, 2013).

Otro parámetro muy importante que se analizó fue la viscosidad final que es la formada por el gel durante el enfriamiento sucediendo una re-asociación entre moléculas de almidón, principalmente amilosa que resulta en la formación de un gel que incrementa dicha viscosidad (Lei *et al.*, 2008). La Figura 1D, muestra los resultados relacionados con la viscosidad final de HT y de sus mezclas con HA. Se observaron valores muy similares cuando la HT se reemplazó por 10 y 20 % de HA tratada a 80 y 100 °C, respectivamente. Al aumentar la temperatura del tratamiento térmico en HA a 130

°C, en los dos niveles de sustitución se puede observar que la viscosidad disminuye, siendo muy parecida a la registrada por HT (2660 cP). Este comportamiento puede generarse por una pérdida en la organización granular del almidón, lo que resulta en una disminución de la gelatinización, en este caso en particular como resultado de la aplicación de tratamientos con alto calor. Además de la gelatinización previa del almidón, las proteínas del gluten sufren pérdida de propiedades funcionales debido a su desnaturalización (Prakash & Haridas, 1999).

Otros resultados relacionados con el perfil de viscosidad de HT y de las mezclas de harinas son mostrados en la Tabla 1. Los valores de viscosidad mínima mostraron diferencias significativas entre los obtenidos en las sustituciones y HT (1421 cP). Se observaron también aumentos en este parámetro de viscosidad cuando HT se sustituyó con 10 y 20 % de HA tratada a 80 y 100 °C, y cuando se aumentó la temperatura del tratamiento a 130 °C se apreció una tendencia a disminuir, incluso alcanzando valores menores a los de HT. Lo anterior se observó en ambos niveles de sustitución. Con relación a la viscosidad de rompimiento, esta mostró una ligera tendencia a incrementar a medida que aumentó el tratamiento térmico al que fue sometida HA utilizada en la sustitución de HT. Se observó también que al utilizar HA al 20 % tratada a 80 y 100 °C no mostraron diferencias significativas con respecto a HT (823 cP). En lo que respecta a la viscosidad de restitución, se observaron diferencias significativas cuando HT (1238 cP) fue sustituida por HA tratada térmicamente a 80, 100 y 130 °C, en los dos niveles de sustitución. Para este parámetro de viscosidad, el comportamiento fue muy similar al observado en la viscosidad de restitución, donde las sustituciones de 10 y 20 % con HA tratada a 80 y 100 °C no mostraron diferencias significativas entre ellas.



**Figura 1.** Capacidad de retención de agua (A), temperatura de gelatinización (B), viscosidad pico (C) y viscosidad final (D) de HT (●) y de HT sustituida al 10 % (■) y 20 % (●) con HA tratada térmicamente a 80, 100 y 130 °C.

**Figure 1.** Water retention capacity (A), gelatinization temperature (B), peak viscosity (C) and final viscosity (D) of HT (●) and HT substituted at 10 % (■) and 20 % (●) with heat treated HA (80, 100 and 130 °C).

**Tabla 1.** Viscosidad mínima, rompimiento y restitución en HT y HT sustituida al 10 y 20 % con HA tratada térmicamente a 80, 100 y 130 °C.

**Table 1.** Results of minimum viscosity, breakdown and restitution in HT, and HT substituted at 10 and 20 % with heat treated HA (80, 100 and 130 °C).

Harina	Sustitución (%)	Tratamiento		Viscosidad (cP)		
		Térmico (°C)	Mínima	Rompimiento	Restitución	
Trigo			1421 ± 4.9 c	823 ± 10.6 a	1238 ± 10.6 a	
Avena	10	80	1633 ± 0.7 e	846 ± 7.1 c	1414 ± 11.3 b	
Avena	10	100	1610 ± 4.2 d	849 ± 3.5 c	1408 ± 0 b	
Avena	10	130	1393 ± 4.9 b	933 ± 5.6 d	1453 ± 8.4 d	
Avena	20	80	1781 ± 4.2 f	821 ± 9.8 a	1437 ± 4.9 cd	
Avena	20	100	1623 ± 4.9 e	825 ± 3.5 ab	1452 ± 4.2 d	
Avena	20	130	1378 ± 9.1 a	843 ± 9.8 bc	1434 ± 5.6 c	

cP, centipoise. Letra diferente dentro de la misma columna expresan diferencia significativa  $p < 0.05$ .

### Evaluaciones en pan

Los resultados de las mediciones de volumen específico y pérdida de peso de panes obtenidos de la sustitución de HT con HA tratada térmicamente a 80, 100 y 130 °C durante 30 min a niveles de sustitución de 10 y 20 % son mostrados en la Tabla 2.

Se observó el aumento en el volumen específico cuando se usó la sustitución de 10 y 20 % de HA tratada a 80, 100 y 130 °C con respecto al obtenido de HT (2.22 cm<sup>3</sup>/g), sin embargo, estos incrementos fueron mayores cuando se utilizó la sustitución del 20 % de HA tratada a 100 °C. El tratamiento térmico de la HA a 130 °C mostró una ligera disminución en el volumen específico para los dos niveles de sustitución. Sin embargo, todavía son mayores a los obtenidos en HT. Estudios realizados por Nakamura *et al.* (2008) indicaron un aumento gradual en el volumen del pastel kasutera (pastel de esponja japonesa) al tratar la harina térmicamente a 120 °C durante 30 min. Neill *et al.* (2012) también se observaron aumentos en la altura del pastel cuando la harina se trató a 120 y 130 °C durante 30 min. Los parámetros de calidad como el volumen

y la textura pueden atribuirse a las propiedades reológicas de la masa. Estas propiedades pueden verse afectadas por la naturaleza hidrofóbica en el almidón primario que ocurre durante el tratamiento térmico de la harina (Nakamura *et al.*, 2008). Los estudios sobre harina de trigo han demostrado que el tratamiento térmico puede aumentar la viscosidad de la masa y mejorar las propiedades de horneado de la harina (Catterall, 2001). Lo anterior puede ser originado a partir de la desnaturalización por calor de las proteínas en la superficie del gránulo de almidón, exponiendo más cadenas laterales hidrofóbicas de aminoácidos que están ocultas entre las proteínas nativas (Catterall, 2001).

Los resultados de la pérdida de peso mostraron aumentos significativos cuando la sustitución de HT se utilizó el 10 y 20 % de HA tratada térmicamente a 80 °C. A medida que aumentó el tratamiento en HA, se observó una disminución en la pérdida de peso, alcanzando los valores más bajos cuando se trató a 130 °C en los dos niveles de sustitución, incluso más bajo que el observado en HT (13.3 %). Este comportamiento puede explicarse en estudios realizados

**Tabla 2.** Volumen específico (cm<sup>3</sup>/g), pérdida de peso (%) y actividad de agua ( $A_w$ ) en HT y HT sustituida al 10 y 20 % con HA tratada térmicamente a 80, 100 y 130 °C.

**Table 2.** Results of specific volume (cm<sup>3</sup>/g), weight loss (%) and water activity ( $A_w$ ) in HT and HT substituted at 10 and 20 % with heat treated HA (80, 100 and 130 °C).

Harina	Sustitución (%)	Tratamiento		Volumen Específico (cm <sup>3</sup> /g)	Pérdida de Peso (%)	Actividad de Agua ( $A_w$ )
		Térmico (°C)				
Trigo				2.22 ± 0.04 a	13.3 ± 0.02 b	0.958 ± 0.00 bc
Avena	10	80		2.45 ± 0.05 c	13.8 ± 0.12 cd	0.958 ± 0.01 bc
Avena	10	100		2.64 ± 0.03 e	13.5 ± 0.22 bc	0.959 ± 0.01 cd
Avena	10	130		2.36 ± 0.02 b	12.7 ± 0.18 a	0.962 ± 0.00 d
Avena	20	80		2.55 ± 0.03 d	14.1 ± 0.09 d	0.953 ± 0.01 a
Avena	20	100		2.76 ± 0.04 f	13.6 ± 0.10 bc	0.952 ± 0.01 a
Avena	20	130		2.48 ± 0.03 c	12.7 ± 0.43 a	0.955 ± 0.01 ab

Los resultados mostrados son el promedio de 5 repeticiones ± desviación estándar. Letra diferente dentro de la misma columna expresan diferencia significativa  $p < 0.05$ .

por Neill *et al.* (2012) donde observaron que el tratamiento térmico redujo la extensibilidad del gluten y generó una mayor retención de humedad. Estudios realizados por Verdú *et al.* (2015) en harina de trigo para elaborar pan sometido a periodos de almacenamiento de hasta 7 días, mostraron que hay una pérdida de peso a medida que aumentaron los días de almacenamiento, llegando a perder hasta el 2 % en peso con respecto al día 0.

### Actividad de agua ( $A_w$ )

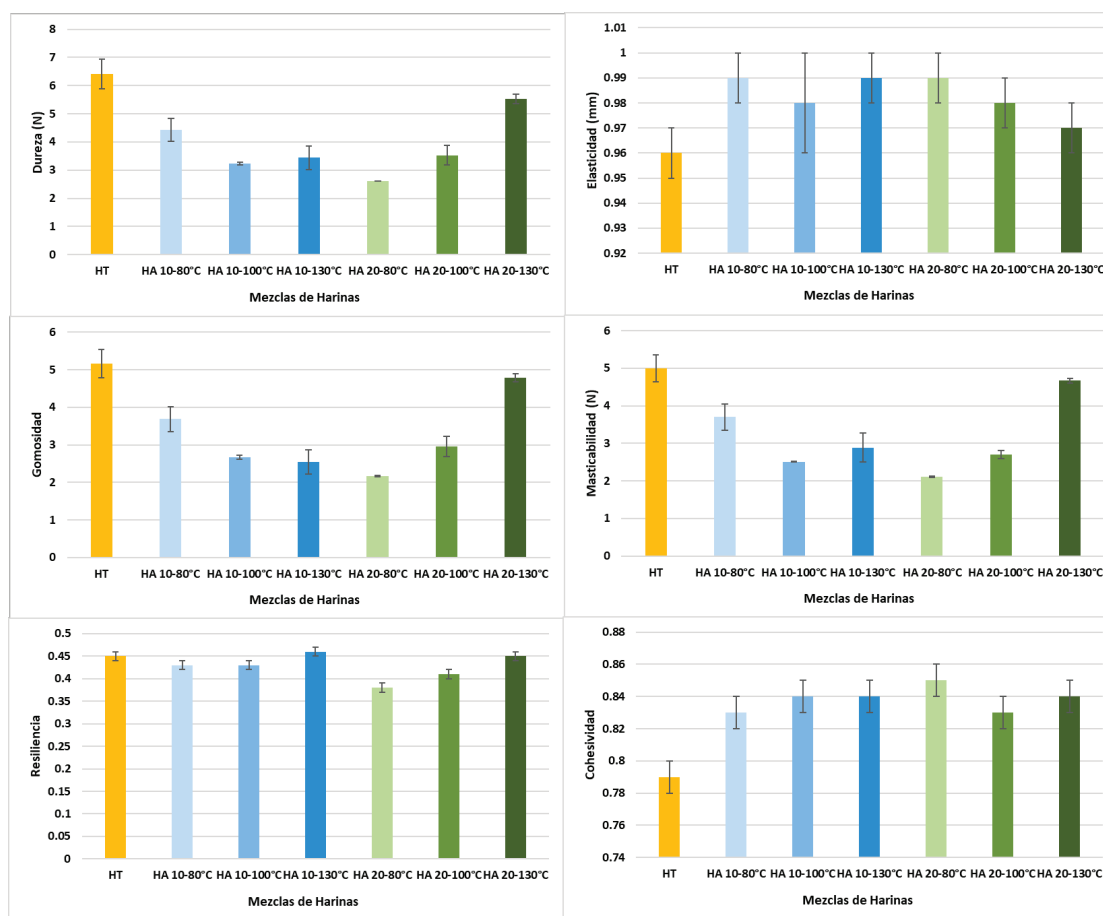
Los resultados de  $A_w$  son mostrados en la Tabla 2. El aumento de los tratamientos térmicos en HA utilizada al 10 % muestra una ligera tendencia a aumentar la  $A_w$ , siendo más evidente cuando se utilizó la harina tratada a 130 °C. En cambio, al incrementar el nivel de sustitución al 20 % de HA no se observaron diferencias significativas entre ellas, además de que los valores obtenidos fueron menores al obtenido en HT (0.958).

La actividad de agua es la cantidad de agua libre en el alimento, es decir, la cantidad de agua disponible para reaccionar químicamente con otras sustancias y causar crecimiento microbiano. Este parámetro es muy importante en el campo de la conservación de alimentos porque es in-

dicador microbiano de los alimentos y la tasa de deterioro, puede ser elemento importante para predecir el tipo de microorganismo que se desarrollará en el alimento. También es indicador de propiedades físicas, como textura, color, sabor, consistencia y aroma. En el pan, los valores de  $A_w$  que podrían considerarse adecuados varían de 0.90 a 0.95; sin embargo, para este caso particular, los valores obtenidos en nuestra investigación fueron superiores a 0.95, siendo esto más evidente cuando se utilizó HA al 10 % y se trató a 130 °C en la sustitución de HT para panificación, alcanzando valores superiores a 0.96. Estudios realizados por Verdú *et al.* (2015) al sustituir HT con harina de chí a en porcentajes de 5, 10 y 15 % observaron valores muy semejantes al día 0 de la medición (0.965  $A_w$ ) mientras que en HT el mismo día de la medición obtuvieron valores de casi 0.98 de  $A_w$ .

### Análisis de perfil de textura (TPA)

Los resultados relacionados con el perfil de textura de los panes elaborados con HT y HT sustituida al 10 y 20 % con HA tratada térmicamente a 80, 100 y 130 °C, analizados a los 0, 2 y 7 días de su elaboración son mostrados en las Figuras 2, 3 y 4. La Figura 2 muestra los resultados al día 0. En cuanto a la firmeza, se observó como todas las mezclas analizadas



**Figura 2.** Análisis del perfil de textura del pan elaborado al día 0 con harina de trigo (HT) y del elaborado con la mezcla de HT con harina de avena (HA) al 10 y 20 % tratada térmicamente a 80, 100 y 130 °C.

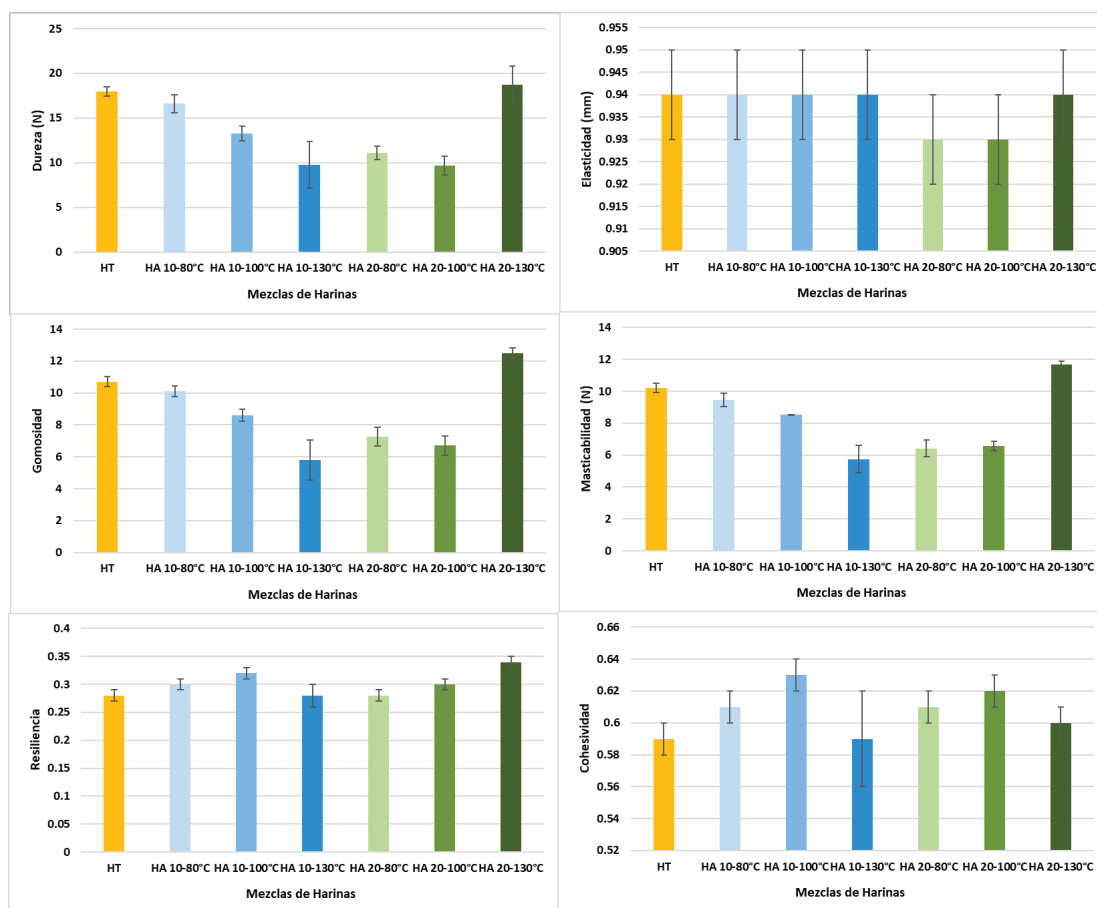
**Figure 2.** Analysis of the texture profile of bread made on day 0 with wheat flour (HT) and that made with HT substituted with oat flour (HA) at 10 and 20 %, heat-treated at 80, 100 and 130 °C.



presentaron valores con diferencias significativas respecto al obtenido de HT (6.41 N). Además de lo anterior, todos los valores obtenidos resultaron ser más bajos que el de HT, de ellos destaca la mezcla HT sustituida con HA al 20 % tratada a 80 °C, el valor alcanzado por este pan fue de 2.61 N, un producto mucho más suave que el obtenido de HT. En cuanto a elasticidad podemos decir que no se observaron cambios importantes, valores entre 0.96 y 0.99 fueron obtenidos sin mostrar diferencias significativas entre ellos. En lo que respecta a gomosidad y masticabilidad, se observó un comportamiento similar, disminución de este parámetro a medida que aumentó el tratamiento térmico cuando se utilizó HA al 10 %, caso contrario sucedió cuando se utilizó HA al 20 %, donde hubo un incremento de gomosidad y masticabilidad a medida que aumentó el tratamiento térmico, obteniendo los valores más altos al utilizar HA al 30 % (4.79 y 4.67), respectivamente. Otro parámetro analizado fue resiliencia, los valores más altos se obtuvieron cuando se analizó HT (0.45) y HT-HA al 10 y 20 % tratada a 130 °C (0.46 y 0.45) respectivamente, sin mostrar diferencias significativas con HT. Por último, el parámetro de cohesividad se vio afectado con el nivel de sustitución de HA y el tratamiento térmico ya que se observaron diferencias significativas con HT (0.79) cuando estos fueron

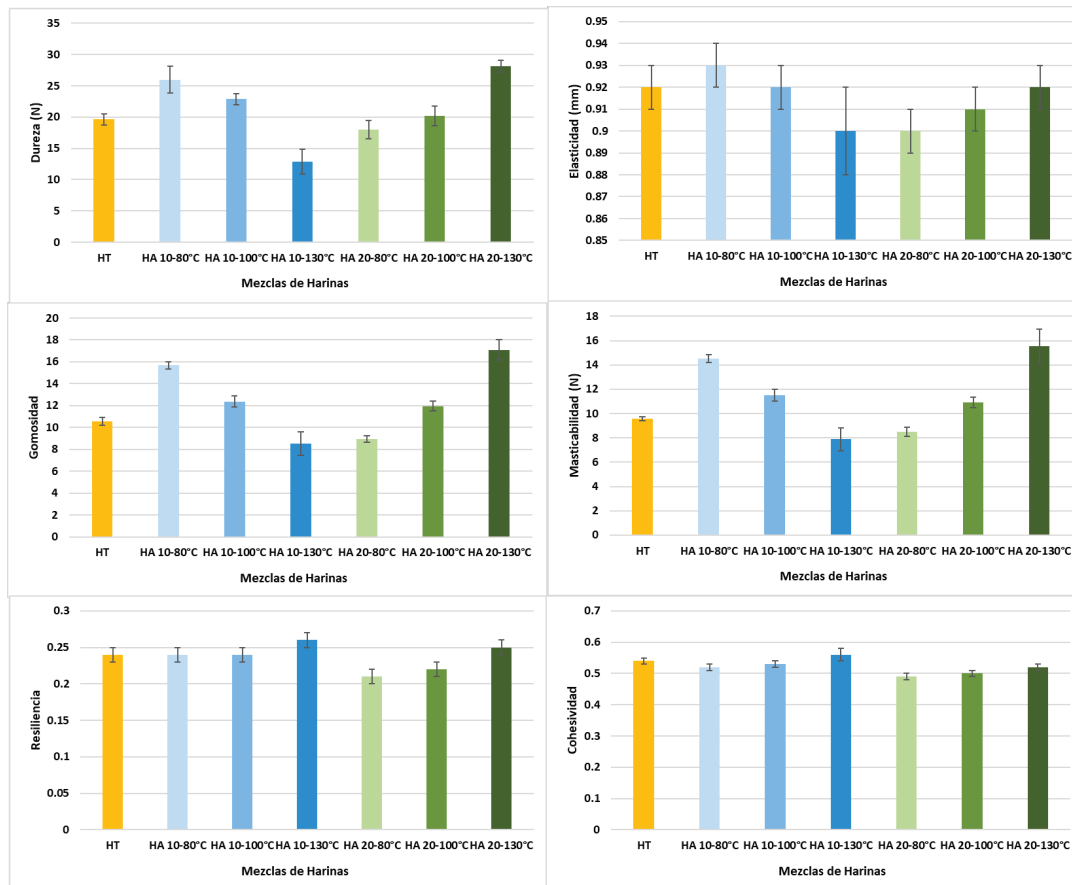
analizados. El pan elaborado con harina de avena mostró buenas propiedades de retención de humedad que pueden mantener el pan más suave durante períodos prolongados de tiempo (McKechnie, 1983). Tal vez esta característica tuvo una influencia importante en la firmeza del pan que se obtuvo en este estudio, ya que todas las mezclas utilizadas en el proceso de panificación resultaron en la obtención de panes más suaves que el de HT, al día 0 de almacenamiento.

La Figura 3 muestra los resultados de los parámetros analizados anteriormente, solo que al día 2 de almacenamiento. Los panes elaborados con las mezclas HT-HA al 10 % (tratada a 130 °C), HT-HA al 20 % (tratada a 80 °C) y HT-HA al 20 % (tratada a 100 °C) fueron los más suaves, incluso el obtenido de HT (17.99 N). Al analizar la elasticidad de los panes obtenidos de las diferentes mezclas de HT-HA, no se observaron diferencias significativas con respecto al obtenido de HT (0.94). Al igual que al día 0 de almacenamiento, los parámetros de gomosidad y masticabilidad mostraron un comportamiento muy similar. Cuando se utilizó HA al 10 %, la tendencia fue de disminuir a medida que aumentó el tratamiento térmico, observando los valores más bajos cuando se usó HA tratada a 130 °C (5.79), en cambio cuando la sustitución de HA incrementó al 20 %, la tendencia fue de aumentar.



**Figura 3.** Análisis del perfil de textura del pan elaborado al día 2 con harina de trigo (HT) y del elaborado con la mezcla de HT con harina de avena (HA) al 10 y 20 % tratada térmicamente a 80, 100 y 130 °C.

**Figure 3.** Analysis of the texture profile of bread made on day 2 with wheat flour (HT) and that made with HT substituted with oat flour (HA) at 10 and 20 %, heat-treated at 80, 100 and 130 °C.



**Figura 4.** Análisis del perfil de textura del pan elaborado al día 7 con harina de trigo (HT) y del elaborado con la mezcla de HT con harina de avena (HA) al 10 y 20 % tratada térmicamente a 80, 100 y 130 °C.

**Figure 4.** Analysis of the texture profile of bread made on day 7 with wheat flour (HT) and that made with HT substituted with oat flour (HA) at 10 and 20 %, heat-treated at 80, 100 and 130 °C.

Este comportamiento también se observó cuando se analizó masticabilidad. En lo que respecta a resiliencia, fueron pocos los cambios observados, valores de 0.28 a 0.34 se obtuvieron en el análisis de este parámetro. Finalmente, en relación a cohesividad, al igual que elasticidad no se observaron diferencias significativas, observando valores de 0.59 a 0.63.

Los resultados del perfil de textura obtenidos al día 7 de almacenamiento son mostrados en la Figura 4. El parámetro de firmeza mostró una tendencia a disminuir al incrementar el tratamiento térmico cuando se utilizó HA al 10 %, caso contrario fue cuando se utilizó HA al 20 %. Los incrementos más notables fueron observados en el pan elaborado de HT-HA al 20 % tratada a 130 °C (28.19 N). El pan de mayor suavidad se obtuvo cuando se utilizó HA al 10 % (12.86 N) también tratada a 130 °C, incluso mejoró el valor de firmeza observado en el pan elaborado de HT (19.63 N). También se analizó la elasticidad y se observó que no hubo diferencias significativas en los panes obtenidos con las diferentes mezclas de HT-HA, valores que resultaron muy similares a los obtenidos en el día 2 de almacenamiento. Los parámetros de gomosidad y masticabilidad mostraron un comportamiento muy similar al día 2 de almacenamiento, al igual que se observó en elasticidad, aunque también valores

más altos en estos parámetros fueron obtenidos cuando se utilizó HA al 20 % (17.09 y 15.54, respectivamente) tratada térmicamente a 130 °C.

Finalmente, parámetros como resiliencia y cohesividad tienden a disminuir a medida que aumentaron los días de almacenamiento. Rangos de entre 0.21 a 0.25 fueron observados para resiliencia, mientras que para cohesividad fueron de 0.49 a 0.54. Las mediciones de compresibilidad como lo son la medición del perfil de textura o TPA son un indicativo importante de cómo los consumidores perciben diferencias en el envejecimiento del pan. El envejecimiento del pan se refiere a los cambios indeseables que se presentan (además de la contaminación microbiana) entre el tiempo que pasa desde que el pan se elabora hasta que se consume. Comprendiendo los diferentes aspectos del envejecimiento y los factores que lo afectan, puede ayudar al productor a tomar las mejores decisiones en cuanto a las fórmulas, ingredientes y empaques a utilizar.

Estudios realizados por Martin *et al.* (1991) mostraron que la firmeza del pan es el resultado de la formación de puentes de hidrógeno entre los gránulos de almidón gelatinizado y la red de gluten en el pan, enlazándose juntos a la red de proteína continua y los gránulos remanentes dis-

continuos. También propusieron que durante el horneado se forman enlaces cruzados entre el almidón y el gluten, y durante el almacenamiento el número de interacciones como su fuerza se incrementan. Otros investigadores como Gerrard *et al.* (2001) concluyeron que la firmeza de la miga no está significativamente correlacionada con el tipo de proteínas de la harina o con su concentración. Londono *et al.* (2015) estudiaron el papel de  $\beta$ -glucanos de avena en sistemas de masas, concluyeron que masas hechas de harinas bajas en  $\beta$ -glucanos (<2%) mostraban una mayor capacidad de retención de gas. El impacto de  $\beta$ -glucanos en las propiedades de los sistemas de masa de avena está regulado por la concentración y viscosidad. Los  $\beta$ -glucanos son componentes claves que determinan la reología de masas donde está involucrada harina de avena, además de la funcionalidad tecnológica en los sistemas de masa (Hüttner *et al.*, 2010). Lo anterior puede ser una consideración muy importante que influye en las propiedades relacionadas con el perfil de textura del pan obtenido en este estudio.

## CONCLUSIONES

Los parámetros de viscosidad se vieron afectados por el nivel de sustitución de la harina de avena y por el tratamiento térmico al que fue sometida. Estos efectos fueron más evidentes cuando la harina de avena se trató térmicamente a 130 °C. Todos los tratamientos térmicos aplicados en harina de avena utilizada en la sustitución de harina de trigo favorecieron el volumen específico del pan, esto fue para los dos niveles de sustitución (10 o 20 %), sin embargo, cuando se utilizó harina de avena al 20 % tratada a 100 °C fue que se observó el mayor volumen, incluso mejor al obtenido del pan elaborado solo de harina de trigo. El uso del 20 % de la harina de avena tratada a 80 °C en la sustitución de la harina de trigo mejoró el valor de la firmeza, disminuyendo más que cualquiera de los tratamientos medidos en el día 0, incluso al obtenido al medir el pan elaborado solo con harina de trigo.

La sustitución del 10 % con harina de avena tratada a 130 °C favoreció la elaboración de un pan más suave, al medir este parámetro a los 7 días de almacenamiento.

## REFERENCIAS

AACC, 2000. Approved Methods of American Association of Cereal Chemists. 10th Ed. The Association, St. Paul, Minnesota, USA. Methods 56-11.02, 76-21.02.

Batey, I. L. 2009. Interpretation of RVA Curves. In G. B. Crosbie & A. S. Ross (Eds.). The RVA Handbook (pp. 19-30). USA: AACC International.

Berton, B., Scher, J., Villieras, F. y Hardy, J. 2002. Measurement of hydration capacity of wheat flour: Influence of composition and physical characteristics. *Powder Technology* (128) 326-331.

Cauvain, S. P., Hodge, G., Muir, D. M. y Dodds, N. J. 1976. Treatment of grain. U.S., A23B 4/04.

Catterall, P. F. 2001. The production of cakes from non-chlorinated cake flour. AACC, Annual meeting. Charlotte, North Carolina.

Chesterton, A. K. S., Wilson, D. I., Sadd, P. A. y Moggridge, G. D. 2015. A novel laboratory scale method for studying heat

treatment of cake flour. *Journal of Food Engineering* (144) 36-44.

Cordero, D. L., Granados, M. C., Islas, A. R., Verdú, S., Ramírez, B. y Vásquez, F. 2020. Utilización de fibra de avena con diferente tamaño de partícula en panificación: efecto reológico y textural. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, Vol. 11 (1) 161-173.

Duyvejonck, A. E., Lagrain, B., Pareyt, B., Courtin, C. M. y Delcour, J. A. 2011. Relative contribution of wheat flour constituents to solvent retention capacity profiles of European wheats. *Journal of Cereal Science* (53) 312-318.

Gelinas, P., Mckinnon, C. M., Rodrigue, N. y Montpetit, D. 2001. Heating conditions and bread-making potential of substandard flour. *Journal of Food Science* (66) 627-632.

Gerrard, J. A., Abbot, R.C., Newberry, M. P. Gilpin, M. J., Ross, M. y Fayle, S. E. 2001. The effect of nongluten proteins on the staling of bread. *Starch* 53(6): 278-280.

Hanamoto, M. y Bean, M. 1979. Process for improving baking properties of unbleached cake flours. US, A21D6/00.

Haynes L. C., Bettge A. D. y Slade, L. 2009. Soft wheat and flour products methods review: solvent retention capacity equation correction. AACC International Report 54, 174-175.

Hüttner, E. K., Dal Bello, F. y Arendt, E. K. 2010. Rheological properties and bread making performance of commercial wholegrain oat flours. *Journal of Cereal Science* (52) 65-71.

Jiranuntakul, W., Puttanlek, Ch., Rungsardthong, V. y Panchanon, S. 2011. Microstructural and physicochemical properties of heat-moisture treated waxy and normal starches. *Journal of Food Engineering* (104) 246-258.

Ktenioudaki, A., O'shea, N. y Gallagher, E. 2013. Rheological properties of wheat dough substituted with functional by-products of food processing: Brewer's spent grain and apple pomace. *Journal of Food Engineering* (116) 362-368.

Lei, F., Ji Chung, T., Cai Ling, S. y Chun, L. 2008. RVA and farinograph properties study on blends of resistant starch and wheat flour. *Agricultural Science in China* 7 (7) 812-822.

Londono, Diana M., Gilissen, Luud J.W.J., Visser, Richard G.F., Smulders, Marinus J.M. y Hamer, Rob J. 2015. Understanding the role of oat  $\beta$ -glucan in oat-based dough systems. *Journal of Cereal Science* (62) 1-7.

McKechnie, R., 1983. Oat products in bakery foods. *Cereal Foods World* (28) 635-637.

Marston, K., Khouryieh, H. y Aramouni, F. 2016. Effect of heat treatment of sorghum flour on the functional properties of gluten-free bread and cake. *LWT-Food Science and Technology* (65) 637-644.

Martin, M., Zeleznak, K. y Hoseney, R. 1991. A mechanism of bread firming. I. Role of starch swelling. *Cereal Chemistry* 68(1): 498-503.

Miñarro, B., Albanell, E., Aguilar, N., Guamis, B. y Capellas, M. 2012. Effect of legume flours on baking characteristics of gluten-free bread. *Journal of Cereal Science* (56) 476-481.

Nakamura, C., Yoshiki, K. y Seguchi, M. 2008. Increased volume of Kasutera cake by dry heating of wheat flour. *Food Science and Technology Research* (14) 431-436.

Neill, G., Al-Muhtaseb, A. H. y Magee, T. R. A. 2012. Optimisation of time/temperature treatment, for heat treated soft wheat flour. *Journal of Food Engineering* (113) 422-426.

Ozawa, M., Kato, Y. y Seguchi, M. 2009. Investigation of dry-heated hard and soft wheat flour. *Starch-Stärke*, 61(7), 398-406.

- Pauly, A., Pareyt, B., Fierens, E. y Delcour, J. A. 2013. Wheat (*Triticum aestivum* L. and *T. turgidum* L. ssp. durum) wheat kernel hardness: II. Implications there. *Compr. Rev. Food Sci. Saf.* 12 (4) 427-438.
- Prakash, M. y Haridas, R. P. 1999. Effect of steaming on the rheological characteristics of wheat flour dough. *European Food Research and Technology* 209(2), 122-125.
- Protonotariou, S., Drakos, A., Evangeliou, V., Ritzoulis, C. y Mandala, I. 2014. Sieving fractionation and jet mill micronization affect the functional properties of wheat flour. *Journal of Food Engineering* (134) 24-29.
- Pyler, E. J. 1988. *Cake baking technology. Baking science and technology (979-1027)*. Kansas City: Sosland Publishing.
- Russo, J. V. y Doe, C. A. 1970. Heat treatment of flour as an alternative to chlorination. *Journal of Food Technology* (5) 363-374.
- Serna-Saldívar, S. O. 1996. *Química, almacenamiento e industrialización de los cereales*. AGT, Editores. S.A.
- Verdú, S., Vásquez, F., Ivorra, E., Sánchez, A. J., Barat, J. M. y Grau, R. 2015. Physicochemical effects of chia (*Salvia hispánica*) seed flour on each wheat bread-making process phase and product storage. *Journal of Cereal Science* (65) 67-73.





# Optimization of lipophilic compounds in tortillas from native pigmented maize obtained from flours by the lime cooking extrusion process

Optimización de compuestos lipofílicos en tortillas de maíz pigmentado nativo obtenidas a partir de harinas por el proceso de extrusión cocción alcalina

Saraid Mora-Rochín<sup>1,2</sup>, Mariela Menchaca-Armenta<sup>2</sup>, Ada K. Milán-Noris<sup>1</sup>, Janet Alejandra Gutierrez-Urbe<sup>3</sup>, Edith O. Cuevas-Rodríguez<sup>1,2</sup>, Cuauhtémoc Reyes-Moreno<sup>1,2</sup>, Jorge Milán-Carrillo<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Programa de Posgrado Integral en Biotecnología, Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa, Culiacán, Sinaloa, C.P. 80000, México.

<sup>2</sup> Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa, Culiacán, Sinaloa, C.P. 80000, México.

<sup>3</sup> Departamento de Biotecnología e Ingeniería de Alimentos, Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey-Campus Monterrey, Av. Eugenio Garza Sada 2501 Sur, Monterrey, Nuevo León, C.P. 64849, México.

## ABSTRACT

The lime-cooking extrusion process depicts a technological alternative; however, it implies suitable combinations of the main extrusion process factors to obtain good quality flour and tortillas. Multi-response optimization by response surface methodology (RSM) was used as a tool to optimize the native pigmented maize lime-cooking extrusion process to obtain flours to develop tortillas with high lipophilic compounds. The effects of extrusion temperature (ET, 65–150 °C) and screw speed (SS, 78–240 rpm) were investigated. The best extruded blue maize tortillas were selected over response variables: Linoleic acid (LA), Oleic acid (OA), Campesterol (CP), Stigmasterol (SP), and  $\beta$ -sitosterol ( $\beta$ SP), where the quadratic predictive developed models were adequate and reproducible inside the specified array of process factors. Applying desirability function, the optimum lime-cooking extrusion conditions to develop extruded blue maize tortillas correspond to ET (119 °C), SS (79 rpm), with a global desirability value ( $D = 0.906$ ). Values response variables obtained from the predictive models were compared from experimental tests, and a close agreement between both values was observed. Hence, RSM is still convenient for optimization, particularly once used in a mixture with other procedures.

**Keywords:** Native maize, lime cooking extrusion, optimization, desirability function, response surface methodology

## RESUMEN

El proceso de cocción-alcalina por extrusión, representa una alternativa tecnológica, sin embargo, implica combinaciones adecuadas de los principales factores del proceso de extrusión para obtener harina y tortillas de buena calidad. Optimización de respuesta múltiple por metodología de superficie de respuesta (MSR) se aplicó como herramienta para optimizar el proceso de cocción-alcalina por extrusión sobre maíz pigmentado nativo para obtener harinas para elaborar tortillas con compuestos lipofílicos altos. El efecto de temperatura de extrusión (TE, 65–150 °C) y velocidad de tornillo (VT, 78–240 rpm) fueron investigadas. Las mejores

tortillas extruidas de maíz azul se seleccionaron sobre las variables de respuesta: ácido linoleico (AL), ácido oleico (AO), campesterol (FC), estigmasterol (FS) y  $\beta$ -sitosterol ( $\beta$ FS), los modelos cuadráticos de predicción fueron adecuados y reproducibles dentro de la matriz de factores de proceso. Empleando función de deseabilidad, condiciones óptimas de cocción-alcalina por extrusión para el desarrollo de tortillas de maíz azul corresponden a TE (119 °C), VT (79 rpm) y deseabilidad global ( $D = 0.906$ ). Los valores de las variables obtenidas de modelos predictivos fueron comparados con pruebas experimentales con estrecha concordancia entre ambos valores. Por lo tanto, MSR es recomendable para la optimización, particularmente en combinación con otros procedimientos.

**Palabras clave:** maíz nativo, extrusión cocción alcalina, optimización, función de deseabilidad, metodología de superficie de respuesta.

## INTRODUCTION

The making of table tortillas is established on the nixtamalization process, based on lime cooking of whole maize grains (Serna-Saldivar and Chuck-Hernandez, 2019). Nevertheless, this traditional process has several disadvantages, such as high-energy requirement, and abundant water consumption discarded as high alkaline effluent with a high soluble and suspended solids concentration. These wastewater solids, called nejayote, contain some nutrients associated with the maize pericarp tissue, lost during this alkaline treatment (Cuevas-Rodríguez *et al.*, 2009; Gutiérrez-Urbe *et al.*, 2010). Therefore, alternative processes to overcome disadvantages of the nixtamalization process are needed, especially in more environmental-friendly maize processing methods. The lime-cooking extrusion process has been studied with a technological alternative to make dough flours applicable to developing table tortillas with comparable attributes as those elaborated employing conventional processes (Milán-Carrillo *et al.*, 2006). These emerging technologies offer benefits such as energy-saving, null generation of wastewater production, and better-quality control (Cuevas-

\*Autor para correspondencia: Jorge Milán Carrillo  
 Correo electrónico: [jmilanc@uas.edu.mx](mailto:jmilanc@uas.edu.mx)

Recibido: 16 de noviembre de 2020  
 Aceptado: 27 de enero de 2021

Rodríguez *et al.*, 2009). Hence, the nutrients and bioactive compounds associated with the outermost layers of maize are preserved, and the developing foodstuffs are similar to whole grain (Serna-Saldivar and Chuck-Hernandez, 2019).

Mexican native pigmented maize and its products have gained prominence due to a relevant source of diverse phytochemicals such as phenolics, carotenoids, dietary fiber, triglycerides, and phytosterols (Acosta-Estrada *et al.*, 2014; Corrales-Bañuelos *et al.*, 2016; López-Martínez *et al.*, 2009; Mora-Rochín *et al.*, 2016). Most of these bioactive compounds exert antioxidant effects preventing oxidative stress related to chronic diseases and cancer (Reynoso-Camacho *et al.*, 2015; Urias-Lugo *et al.*, 2015). The current interest has been expressed concerning the health benefits of consuming phospholipids and phytosterols. These phytochemicals inhibit the absorption of cholesterol from the small intestine, thus effectively lowering total blood cholesterol and low-density lipoprotein (LDL), a potential risk factor for cardiovascular diseases (Barrera-Arellano *et al.*, 2019).

Fatty acids and phytosterols are unstable at high temperatures and, being unsaturated lipophilic compounds, are susceptible to oxidation. However, phytosterols are considered more stable than mono-unsaturated fatty acids (e.g., oleic acid) because of the steric hindrance in the ring structure. The extrusion process can prevent the release and oxidation of fatty acid by denaturing hydrolytic enzymes; on the other hand, phytosterols content can increase with a 90 to 110 °C extrusion temperature (Camire *et al.*, 1990; Hu *et al.*, 2018; Tolve *et al.*, 2020). However, little has been reported about maize extrusion process conditions to prevent a decreased in these compounds.

Response surface methodology (RSM) is a collection of techniques used in empirical studies to determine the relationship between a response variable and several input variables. It is a useful mathematical statistics method for establishing models evaluating the relative significance of variables and determining optimal conditions of desirable responses (Khuri and Cornell, 1987). Desirability optimization (DOM) is an analytical technique for optimizing multiple response variables employing mathematical transformations, developed by Harrington (1965), and later modified and extended by Derringer and Suich (1980). Some authors have reported that the extrusion cooking process could be resolved using RSM and DOM (Escalante-Aburto *et al.*, 2014; Ramos-Enriquez *et al.*, 2018; Ortiz-Cruz *et al.*, 2020). Therefore, it could be used to optimize process conditions that lead to minimal changes (or maximization) in flours and tortillas lipophilic compounds, considering that no studies have been reported on fatty acids and phytosterols throughout the different steps of maize tortilla processing. Thus, this study's purpose was to use RSM and DOM to optimize lime cooking extrusion conditions from Mexican native blue maize, that would maximize lipophilic compounds to obtain a high-quality flour to make tortillas.

## MATERIALS AND METHODS

### Material

The study was performed on blue maize kernels from the Elotero Sinaloa landrace of Mexico's northwestern region. These pigmented maize accessions were collected during 2018 from open-pollinated maintained by traditional farmers at their villages in the municipality of Concordia located at (23° 17' 18" N, 106° 4' 3" W), in the state of Sinaloa México. Maize samples were stored at -4 °C until use.

### Production of extruded maize flour

The extrusion cooking experiments of pigmented maize grits (moisture content of 28%) were carried out on a single screw laboratory extruder Model 20 DN (CW Brabender Instruments, Inc., NJ, USA), with a length-to-diameter rate of 20:1, an internal diameter of 19 mm, nominal compression ratio 1:1 and die opening of 2.4 mm. A screw-operated feed hopper-fed the extruders at 30 rpm. The extruder feed was manual at 70 g/min. Extrusion temperature (ET) was defined as the temperature at the die end of the barrel. Table 1 shows the combinations of extrusion temperature (ET) and screw speed (SS) used for producing tortillas from extruded pigmented maize flours. Extrudates were cooled and dried, using ambient conditions (25 °C, RH = 65%), for one day and milled (UD Cyclone Sample Mill, UD Corp, Boulder, CO, USA) to pass through an 80-US mesh (0.180 mm) screen, packed in plastic bags, and stored at 4 °C.

### Tortilla preparation from extruded maize flours

Tortillas were made by mixing 200 g of extruded maize flours with 200 mL of water to achieve an adequate masa consistency to produce table tortillas. According to Cuevas-Rodríguez *et al.* (2009), the fresh dough was divided into 30 g pieces and flattened using a manual machine. The resulting disks were baked on a hot griddle at  $220 \pm 5$  °C for 10 s on each side, until the puffing of the tortilla occurred. The fresh tortillas were dried and milled to pass through an 80-US mesh (0.180 mm) sieve and packed in plastic bags. Tortillas made by lime extrusion cooking flours were stored at -20 °C until use.

### Lipid extraction

Lipids were extracted by mixing 4 g of maize samples with n-hexane/dichloromethane (40 mL, 1:1, v/v) under stirring conditions for 1 h at room temperature as previously described (Esche *et al.*, 2012).

### Lipophilic biocompounds identification and quantification

The identification and quantification of lipophilic biocompounds were performed in a HPLC-ELSD-UV (Model G1969A Agilent 1100 Santa Clara, CA, USA) as previously reported (Chávez-Santoscoy *et al.*, 2014). The separation was performed in a Luna C8 (250 mm x 4.6 mm, 5 µm; Phenomenex, Torrance, CA, USA) column, set at 40 °C, and an injection volume of 20 µL. The mobile phase consisted of acetonitrile

**Table 1.** Experimental design<sup>1</sup> used to obtain combinations of lime cooking extrusion variables for extruded maize flours production from native blue maize and experimental results for response variables.**Tabla 1.** Diseño experimental utilizado para obtener la combinación de variables del proceso de extrusión cocción alcalina empleadas para la producción de harinas de maíz extrudidas a partir de maíz azul nativo y resultados experimentales de las variables de respuesta.

Assay <sup>2</sup>	Process variables <sup>3</sup>		Response variables <sup>4</sup>				
	[ET, (X <sub>1</sub> )]	[SS, (X <sub>2</sub> )]	Fatty acids		Phytosterols		
			Linoleic Acid (LA) Y <sub>LA</sub>	Oleic Acid (OA) Y <sub>OA</sub>	Campesterol (CP) Y <sub>CF</sub>	Stigmasterol (SP) Y <sub>SF</sub>	β-sitosterol (βSP) Y <sub>βSF</sub>
1	65 (-1)	78 (-1)	2,127.0	1,098.9	3,257.3	2,392.9	20,393.5
2	135 (+1)	78 (-1)	2,883.6	1,556.5	4,353.9	3,108.7	22,465.1
3	65 (-1)	212 (+1)	2,139.5	868.6	3,157.2	2,990.2	17,945.3
4	135 (+1)	212 (+1)	2,193.2	1,092.6	2,578.6	2,855.4	16,504.7
5	51 (-1.414)	145 (0)	2,362.2	945.0	3,193.6	2,374.0	15,465.7
6	150 (+1-414)	145 (0)	3,005.8	1,130.9	3,824.6	2,631.2	18,222.6
7	100 (0)	50 (-1.414)	3,020.9	1,480.1	4,839.9	3,208.3	24,447.6
8	100 (0)	240(+1.414)	2,123.7	1,161.2	3,268.1	2,954.7	18,471.1
9	100 (0)	145 (0)	3,066.3	1,491.9	3,627.8	3,299.5	20,211.4
10	100 (0)	145 (0)	3,198.3	1,492.2	3,832.2	3,292.9	19,991.4
11	100 (0)	145 (0)	3,190.4	1,512.3	3,775.9	3,408.9	21,224.1
12	100 (0)	145 (0)	3,295.6	1,462.1	3,007.6	3,170.9	19,789.1
13	100 (0)	145 (0)	3,025.6	1,578.3	2,990.2	3,154.7	20,849.4

<sup>1</sup>Central composite design with two factors and five levels; 13 assays. <sup>2</sup>Does not correspond to order of experiments. <sup>3</sup>ET = Extruded temperature (°C), SS = Screw speed (rpm); values in parentheses are coded levels. <sup>4</sup>LA = Linoleic acid (μg/100 g DW), OA = Oleic acid (μg/100 g DW), CP = Campesterol (μg/100 g DW), SP = Stigmasterol (μg/100 g DW), βSP = β-sitosterol (μg/100 g DW).

(A) and 55% methanol, with 1% formic acid in water (solvent B). The gradient elution was: 0-7 min 0% B (flow rate 0.6 mL/min), 7-15 min 0-15% B (flow rate 0.6-1.2 mL/min), 15-20 min 15-80% B (flow rate 1.2-1.5 mL/min) and 20-50 min 80-100% (flow rate 1.5 mL/min). The quantification was compared with linoleic and oleic acids, β-sitosterol, campesterol, and stigmasterol standards (Sigma-Aldrich Co). Results expressed in μg of fatty acids or phytosterols/100 g of dry sample.

### Regression analysis and optimization

In this research, the RSM was used to determine the optimal experimental lime cooking extrusion process conditions (extrusion temperature and speed screw) to obtain extruded flour from mexican blue maize. The optimal response variables: fatty acids [linoleic (LA) and oleic (OA) acids], and phytosterols [campesterol (CP), stigmasterol (SP) and β-sitosterol (βSP)], in a central composite design (CCD) with two control variables, extruded temperature (ET) and speed screw (SS) were used. Maximum and minimum values were chosen according to previous data from preliminary trials. Table 1 shows the experimental design and the response data of tortillas made with extruded blue maize flours. The quadratic model applied to predict the response variables is given below.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^2 \beta_i X_i + \sum_{i=2}^2 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^2 \beta_{ij} X_i X_j + \epsilon$$

Data were subjected to the stepwise regression analysis; the significant terms ( $P < 0.05$ ) were used to fit the predictive model for each response variable (Khuri and Cornell, 1987). According to the software program, multiple response optimization was implemented throughout the desirability function (Derringer and Suich, 1980). To establish the desirability of several arrangements of the experimental process variables (ET and SS) were set as "in the range", whereas that of response variables (LA, OA, CP, SP, and βSP) was a goal set to obtain maximum, and the desirability value was calculated. The arrangement of experimental factors yielding the uppermost desirability was nominated as the optimal lime extrusion cooking condition.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Appropriate models by response variables

The quadratic polynomial equations for each response variable (LA, OA, CP, SP, and βSP), efficiently fitted to the experimental values of lime extrusion cooking conditions (ET and SS) using multiple regression analysis, are shown in Table 1. The regression coefficients and analysis of variance of the quadratic models, showing the relationships among response variables and process variables for tortillas produced from extruded blue maize, are shown in Table 2. According to Vera-Candiotti *et al.* (2014), a good predictive model should have the following statistical parameters: coefficient of determination ( $R^2$ ) and adjusted- $R^2$  high ( $> 0.80$ ), very small P-value ( $< 0.05$ ), coefficient of variation ( $CV < 10\%$ ), lack

**Table 2.** The regression analysis of second order polynomial models for each of the response variables studied  
**Tabla 2.** Análisis de regresión de modelos polinomiales de segundo orden para cada una de las variables de respuestas estudiadas.

Parameter	Regression parameter coefficients				
	Fatty acids		Phytosterols		
	Linoleic (LA) Coded values	Oleic (OA) Coded values	Campesterol (CP) Coded values	Stigmasterol (SP) Coded values	β-Sitosterol (βSP) Coded values
<b>Intercept</b>					
β <sub>0</sub>	3,155.2	1,495.4	3,743.3	3,285.3	20,393.1
<b>Linear</b>					
β <sub>1</sub>	215.1**	119.2**	213.8**	118.1**	566.2**
β <sub>2</sub>	-243.3**	-144.3**	-549.8**	-1.8 <sup>NS</sup>	-2,107.6**
<b>Quadratic</b>					
β <sub>11</sub>	-308.7**	235.6**	-209.6**	-380.2**	-1,740.6**
β <sub>22</sub>	-364.6**	-94.2**	62.9 <sup>NS</sup>	-90.7 <sup>NS</sup>	567.0 <sup>NS</sup>
<b>Interactive</b>					
β <sub>12</sub>	-175.7 <sup>NS</sup>	-56.2 <sup>NS</sup>	-493.8**	-212.7**	-878.1**
Model F-values	12.62	22.19	16.36	14.24	32.75
p-value	0.002	0.0004	0.001	0.002	0.0001
R <sup>2</sup>	0.900	0.941	0.921	0.911	0.959
R <sup>2</sup> <sub>adjust</sub>	0.829	0.898	0.865	0.847	0.825
Lack of Fit	0.06 <sup>NS</sup>	0.123 <sup>NS</sup>	0.085 <sup>NS</sup>	0.31 <sup>NS</sup>	0.36 <sup>NS</sup>
CV	7.1	6.2	6.2	4.5	3.2
Ade Pre	8.15	12.1	13.7	10.1	19.4

NS = Not significant (p>0.05); \*\* Significant (p<0.05)

of fit test (P>0.05), and adequate precision > 4. The models were adequate for predicting the five response variables at different lime extrusion cooking conditions based on these criteria. In this study, the results reveal that the regression response models could depict the experimental region's responses (Table 2).

#### Response surface model for linoleic acids

The regression analysis showed that Linoleic acid (LA) was significantly dependent on linear terms of extruded temperature (ET) and screw speed (SS), and quadratic terms [(ET)<sup>2</sup>, (SS)<sup>2</sup>] (Table 2). The following equation can be described as the predicted model for LA in terms of coded values:

$$Y_{LA} = 3,155.2 + 215.1X_1 - 243.3X_2 - 308.7X_1^2 - 364.6X_2^2$$

The response regression model exhibitions, show lower (P<0.002) and CV = 7.1% values, a satisfactory level by the correlation coefficients (R<sup>2</sup> = 0.900; R<sup>2</sup> adjust = 0.829), lack of fit (P > 0.06), and PRESS > 8.2 (Table 2). These statistical parameters demonstrated that the fitted model was suitable and reproducible. The surface response plots are revealed in Fig. 1A. The highest amounts of LA (3,280.9 μg/100 g DM) were observed at ET = 115–120 °C/SS = 110–120 rpm.

#### Response surface model for oleic acid

The oleic acid (OA) content in the blue maize tortillas prepared from extruded flours was dependent on linear

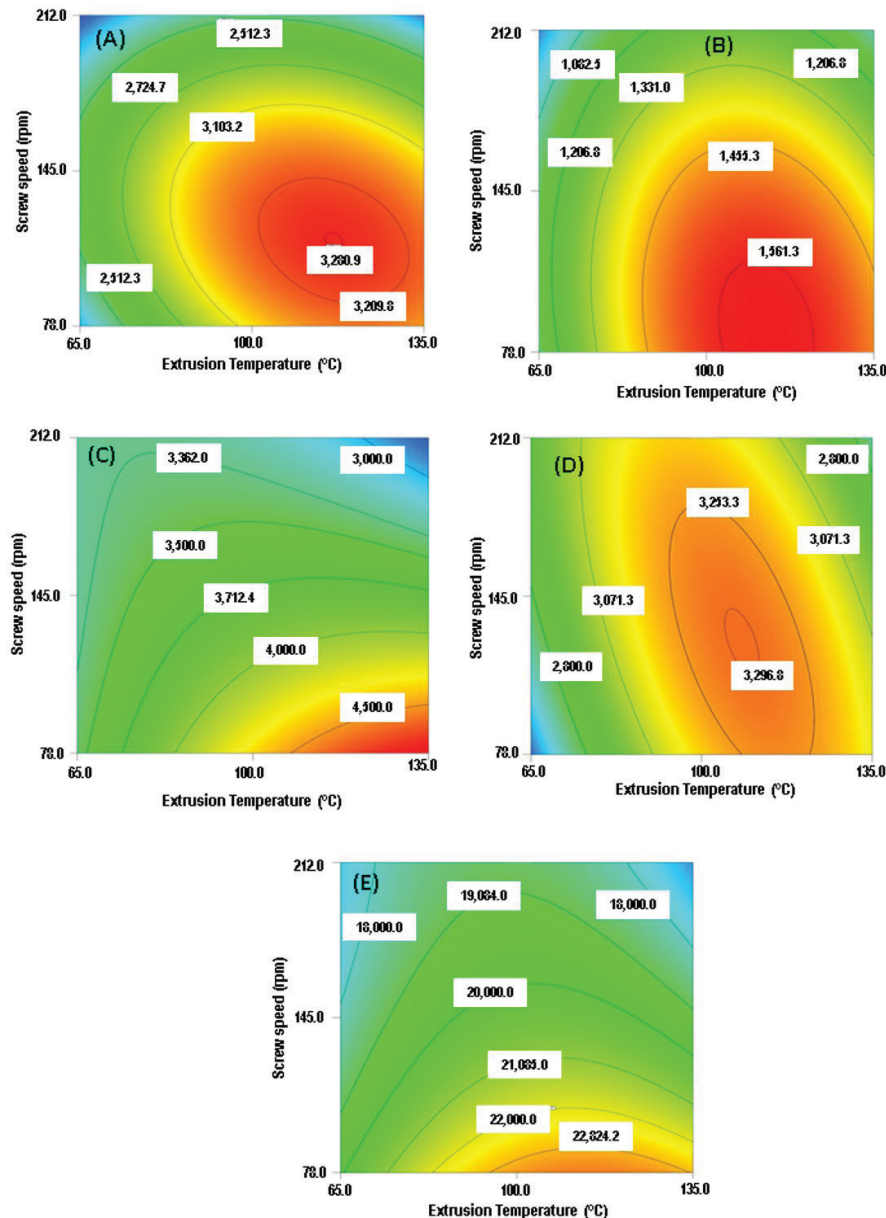
terms ET, SS, and quadratic terms [(ET)<sup>2</sup>, (SS)<sup>2</sup>] (Table 2), the following regression equation confirmed the estimate of the effects of independent variables on OA:

$$Y_{OA} = 1,495.4 + 119.2X_1 - 144.3X_2 - 235.6X_1^2 - 94.2X_2^2$$

The response regression model displays the lower (P<0.0004) and CV = 6.2%, PRESS > 12.1, and coefficient of correlation (R<sup>2</sup>) from the developed model, which described 94.1% of the total variability to OA on extruded blue maize tortillas, suggesting the selected model adequately illustrates the information for this response. Response surface contours for OA as functions of the independent process variables are represented in Fig. 1B. The maximum (1,561.3 μg/100 g DM) values of OA were observed at ET = 110–120 °C/SS = 78–85 rpm.

The behavior of fatty acids as a function of the lime cooking extrusion variables is shown in the surface graphs of Fig 1A and Fig 1B. In general, LA and OA's desirable values in tortillas made with extruded flours were observed in the ET range (100–125 °C) values and lowest SS values. Some research indicated that during cooking extrusion, the only processing variable that had a significant effect on the fat loss was temperature profile. Its increase caused an augment of fat loss, which could be attributed to forming a bond between starch and lipid fraction. Moreover, the highest barrel temperature values favor the migration of fat fraction outside from mass extruded (De Pilli *et al.*, 2011).





**Fig. 1** Contour plots showing the effect of the lime cooking extrusion condition (ET and SS) on the response variables (A) Linoleic acid (LA), (B) Oleic acid (OA), (C) Campesterol (CP), (D) Stigmasterol (SP), and (E) β-sitosterol (βSP) of extruded blue maize tortillas.

**Fig. 1** Gráficos de contorno mostrando el efecto de las condiciones de extrusión cocción alcalina (TE and VT) sobre las variables de respuesta (A) Ácido linoleico (LA), (B) Ácido oleico (OA), (C) Campesterol (CP), (D) Estigmasterol (SP) y (E) β-sitosterol (βSP) de tortillas de maíz azul extruidas.

### Response surface model for campesterol

Changes in campesterol (CP) of tortillas prepared with extruded blue maize flours were affected by ET, SS, the quadratic term  $(ET)^2$ , and interaction  $(ET)(SS)$  (Table 2); the following regression equation was used to estimate of the effects of independent variables on CP using coded variables.

$$Y_{CP} = 3,743.3 + 213.8X_1 - 549.8X_2 - 209.6X_1^2 - 493.8X_1X_2$$

The predictive model explained 92.1% of the total variability ( $P < 0.001$ ) in CP values (Table 2). The response sur-

face contour plot for CP as a function of the lime extrusion cooking process variables is shown in Fig. 1C. The maximum (4,500.0  $\mu\text{g}/100 \text{ g DM}$ ) value of CP were observed at  $ET = 120\text{--}135 \text{ }^\circ\text{C}/SS = 78\text{--}85 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### Response surface model for stigmasterol

The stigmasterol (SP) of tortillas prepared from extruded native pigmented maize flours were influenced significantly by linear terms of ET, the quadratic term  $(ET)^2$ , and interaction  $(ET)(SS)$  (Table 2). The regression equation relating the response function SP, measured as independent

variables, was given in terms of uncoded variables by the following equation:

$$Y_{SP} = 3,284.3 + 118.1X_1 - 380.2X_1^2 - 217.7X_1X_2$$

The significance ( $P < 0.002$ ) of the developed model for SP is given in Table 2. The lack of fit ( $P \geq 0.05$ ), CV, and PRESS had satisfactory levels, indicating that the experimental data were satisfactorily explained in a 91.1%. The response surface contour plot for SP is shown in Fig. 1D. The maximum SP (3,296.3  $\mu\text{g}/100\text{ g DM}$ ) value was observed at  $ET = 105\text{--}128\text{ }^\circ\text{C}/SS = 78\text{--}85\text{ rpm}$ .

### Response surface model for $\beta$ -Sitosterol

The regression analysis showed in linear terms (ET and SS), quadratic terms (ET)<sup>2</sup>, and interaction (ET)(SS), a significant effect on  $\beta$ -Sitosterol ( $\beta$ SP) of extruded blue maize tortillas (Table 2). The following equation can describe the predicted model for  $\beta$ SP in terms of coded values:

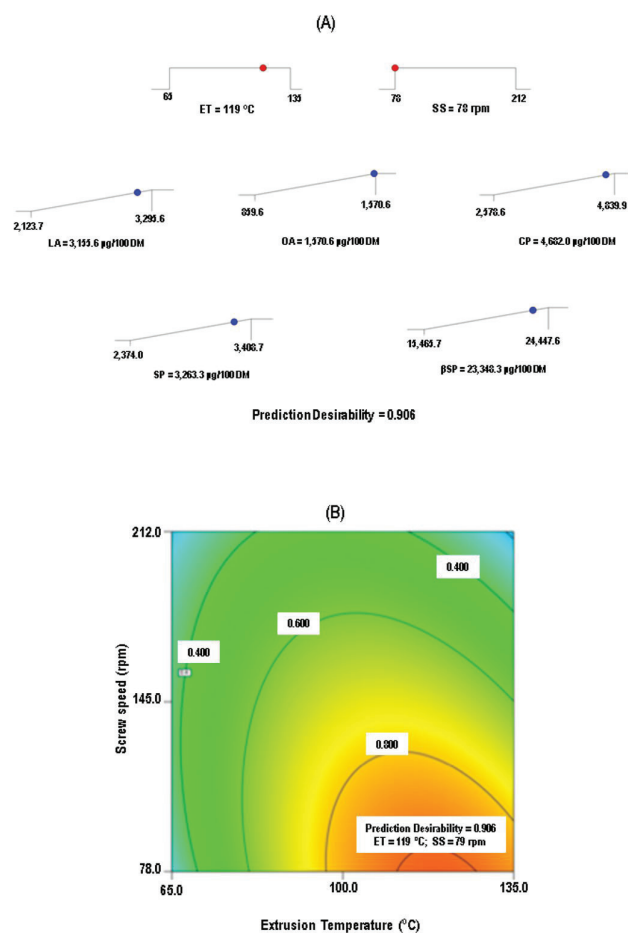
$$Y_{\beta SP} = 20,393.1 + 566.2X_1 - 2,107.6X_2 - 1,740.6X_1^2 - 878.1X_1X_2$$

The predictive model explained 95.9% of the total variability ( $P \leq 0.0001$ ) in  $\beta$ SP values (Table 2). The response surface contour plot for  $\beta$ SP is shown in Fig. 1E. Increases in extrusion temperature result in increases in  $\beta$ SP content, reaching a maximum (22,824.2  $\mu\text{g}/100\text{ g DM}$ ) at 100 to 135  $^\circ\text{C}$  ET and  $SS = 79$  to 90 rpm. The remaining CP, SP, and  $\beta$ SP amounts in tortillas from extruded Mexican blue maize varied from 25.8 to 48.4, 23.7 to 34.1, and 139.5 to 244.5  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ , respectively (Table 1). Our results showed that phytosterol levels tested in the present study were within the range of 25 varieties of raw maize reported by Esche *et al.* (2013). Overall, these significant losses of pigmented maize samples' phytosterols during the tortillas elaboration could be attributed to the higher temperature during processing, facilitating thermo-oxidative degradation of phytosterols, including oxidized phytosterols, fragmented phytosterol molecules, volatile compounds, and oligomers (Rudzinska *et al.*, 2009).

### Optimization and validation of extrusion conditions

Fig. 2 exhibited the desirability functions response surface to attain optimum conditions in optimized tortillas made with extruded Mexican blue maize. By applying the desirability function method, the optimum lime extrusion cooking conditions for the development of extruded native blue maize tortillas correspond to extrusion temperature (ET, 119  $^\circ\text{C}$ ) and screw speed (SS, 79 rpm) with global desirability value ( $D = 0.906$ ).

The fitness of the established model for the estimate was confirmed by relating the estimated and experimental values. The optimum condition ( $ET = 119\text{ }^\circ\text{C}$  and  $SS = 78\text{ rpm}$ ) was experimentally tested to confirm the accuracy of the model equations, using the average values obtained in LA and OA experiments. CP, SP, and  $\beta$ SP under these optimal conditions were 3,019.9, 1,625.6, 4,484.9, 3,101.8, and 22,152.9  $\mu\text{g}/100\text{ g DW}$ , respectively, which was in agreement with the predicted information (Table 3). The experimental results denote the correctness of the established quadratic models. It is noteworthy to mention that these best values are acceptable inside the specified array of process factors.



**Fig. 2** Desirability analysis. (A) plots ramp showing the optimal experimental parameters (ET and SS) that maximize LA, OA, CP, SP and  $\beta$ SP, (B) Contour plot of overall desirability showing the best combination of lime cooking extrusion condition (ET and SS) for producing optimized extruded blue maize tortillas.

**Fig. 2** Análisis de deseabilidad. (A) gráficos de parámetros experimentales óptimos (TE and SS) que maximizan AL, AO, PC, PS y  $\beta$ PS, (B) Gráfico de contorno de deseabilidad global mostrando la mejor combinación de condiciones de extrusión cocción alcalina (TE y VT) para elaborar tortillas de maíz azul extruidas optimizada.

**Table 3.** Comparison of predicted and experimental values for each response variables.

**Tabla 3.** Comparación de valores de predicción y experimentales para cada variable de respuesta.

Response variables <sup>a</sup>	Predicted values <sup>b</sup>	Experimental values <sup>c</sup>	Percent relative error <sup>d</sup>
Linoleic acid (LA)	3,155.6	3,019.9 $\pm$ 184.2	4.30
Oleic acid (OA)	1,570.6	1,625.6 $\pm$ 87.8	3.50
Campesterol (CP)	4,682.0	4,484.9 $\pm$ 331.9	4.21
Stigmasterol (SP)	3,263.3	3,101.8 $\pm$ 151.9	4.95
$\beta$ -sitosterol ( $\beta$ SP)	23,348.3	22,152.9 $\pm$ 1,572.8	5.12

<sup>a</sup>  $\mu\text{g}/100\text{ g DW}$

<sup>b</sup> Predicted using response surface, quadratic model.

<sup>c</sup> Mean  $\pm$  standard deviation of triplicate determinations from experiments.

<sup>d</sup> Percent error (percentage error) is the difference between an experimental and predicted value, divided by the predicted value, multiplied by 100 to give a percent.

## CONCLUSIONS

Mexican pigmented maize used in this study was suitable for tortillas preparation throughout the lime cooking extrusion process. RSM and DOM were useful in producing predictive models and establishing relationships between processing factors and key responses for tortillas production from blue maize landrace. The optimum combination of lime extrusion cooking process variables, to produce optimized tortillas from extruded native blue maize, correspond to extrusion temperature of 119 °C and screw velocity of 79 rpm. Additional studies are needed to determine the nutraceutical potential of tortillas using optimized extruded blue maize landrace.

## ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT-México, Project 168279) and Programa de Mejoramiento al Profesorado (PROMEP-México, Project 103.5/12/3360).

## REFERENCES

- Acosta-Estrada, B.A., Gutierrez-Urbe, J.A. and Serna-Saldivar, S.O. 2014. Bound phenolics in food, a review. *Food Chemistry*, 152(1):46-55. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.093>
- Barrera-Arellano, D., Badan-Ribeiro, A.P. and Serna-Saldivar, S.O. 2019. Corn Oil: Composition, Processing and Utilization. In *Corn Chemistry and Technology* (3<sup>rd</sup> ed., 593-613). ST Paul, MN: AACCI International. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811971-6.00021-8>
- Camire, M.E., Camire, A.L. and Krumhar, K. 1990. Chemical and nutritional changes. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 29(1): 35-57. <https://doi.org/10.1080/10408399009527513>
- Chávez-Santoscoy, R.A., Tovar, A.R., Serna-Saldivar, S.O., Torres, N. and Gutiérrez-Urbe, J.A. 2014. Conjugated and free sterols from black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seed coats as cholesterol micelle disruptors and their effect on lipid metabolism and cholesterol transport in rat primary hepatocytes. *Genes and Nutrition*, 9(1):367. <https://doi.org/10.1007/s12263-013-0367-1>
- Corrales-Bañuelos, A.B., Cuevas-Rodríguez, E.O., Gutiérrez-Urbe, J.A., Milán-Noris, E.M., Reyes-Moreno, C., Milán-Carrillo, J. and Mora-Rochín, S. 2016. Carotenoid composition and antioxidant activity of tortillas elaborated from pigmented maize landrace by traditional nixtamalization or lime cooking extrusion process. *Journal of Cereal Science*, 69:64-70. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2016.02.009>
- Cuevas-Rodríguez, E.O., Reyes-Moreno, C., Eckhoff, S.R. and Milán-Carrillo, J. 2009. Nixtamalized instant flour from corn (*Zea mays* L.) meal: optimization of nixtamalization conditions. *Cereal Chemistry*, 86(1):7-11. <https://doi.org/10.1094/CCHEM-86-1-0007>
- De Pilli, T., Derossi, A., Talja, R.A., Jouppila, K. and Severini, C. 2011. Study of starch-lipid complexes in model system and real food produced using extrusion-cooking technology. *Inne Food Science & Emer Tech.* 12(4):610-616.
- Derringer, G. and Suich, R. 1980. Simultaneous optimization of several response variables. *Journal of Quality Technology*, 12:214-219.
- Escalante-Aburto, A., Ramírez-Wong, B., Torres-Chávez, P., López-Cervantes, J., Figueroa-Cárdenas, J., Barrón-Hoyos, J. and Gutiérrez-Dorado, R. 2014. Obtaining ready-to-eat blue corn expanded snacks with anthocyanins using an extrusion process and response surface methodology. *Molecules* 19(12):21066-21084. <https://doi.org/10.3390/molecules191221066>
- Esche, R., Barnsteiner, A., Scholz, B. and Engel, K.H. 2012. Simultaneous analysis of free phytosterols/phytostanols and intact phytosterol/phytostanyl fatty acid and phenolic acid esters in cereals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(21):5330-5339. <https://doi.org/10.1021/jf300878h>
- Esche, R., Scholz, B. and Engel, K.H. 2013. Online LC-GC analysis of free sterols/stanols and intact sterol/stanyl esters in cereals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(46):10932-10939.
- Gutiérrez-Urbe, J.A., Rojas-García, C., García-Lara, S. and Serna-Saldivar, S.O. 2010. Phytochemical analysis of wastewater (nejayote) obtained after lime-cooking of different types of maize kernels processed into masa for tortillas. *Journal of Cereal Science*, 52(3):410-416. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2010.07.003>
- Harrington, E.C. 1965. The desirability function. *Industrial Quality Control*, 21:494-498.
- Hu, Z., Tang, X., Zhang, M., Hu, X., Yu, C., Zhu, Z. and Shao, Y. 2018. Effects of different extrusion temperatures on extrusion behavior, phenolics acids, antioxidants activity, anthocyanins and phytosterols of black rice. *Royal Society of Chemistry Advances*, 8: 7123-7132. <http://doi.org/10.1039/c7ra13329d>
- Khuri, A.L. and Cornell, J.A. 1987. Response surface: Designs and analyses. Marcel Dekker Inc., New York
- López-Martínez, L.X., Oliart-Ros, R.M., Valerio-Alfaro, G., Lee, C.H., Parkin, K.L. and Garcia, H.S. 2009. Antioxidant activity, phenolic compounds and anthocyanins content of eighteen strains of Mexican maize. *LWT-Food Science and Technology*, 42(6):1187-1192. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.10.010>
- Milán-Carrillo, J., Gutiérrez-Dorado, R., Perales-Sánchez, J.X., Cuevas-Rodríguez, E.O., Ramírez-Wong, B. and Reyes-Moreno, C. 2006. The optimization of the extrusion process when using maize flour with a modified amino acid profile for making tortillas. *International Journal of Food Science & Technology*, 41(7):727-736. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.00997.x>
- Mora-Rochín, S., Gaxiola-Cuevas, N., Gutiérrez-Urbe, J.A., Milán-Carrillo, J., Milán-Noris, E.M., Reyes-Moreno, C., Serna-Saldivar, S.O. and Cuevas-Rodríguez, E.O. 2016. Effect of traditional nixtamalization on anthocyanin content and profile in Mexican blue maize (*Zea mays* L.) landraces. *LWT- Food Science and Technology*, 68:563-569. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.01.009>
- Ortiz-Cruz, R.A., Ramírez-Wong, B., Ledesma-Osuna, A.I., Torres-Chávez, P.I., Sánchez-Machado, D.I., Montañón-Leyva, B., López-Cervantes, J. and Gutiérrez-Dorado, R. 2020. Effect of Extrusion Processing Conditions on the Phenolic Compound Content and Antioxidant Capacity of Sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) Bran. *Plant Foods for Human Nutrition*, 75, 252-257. <https://doi.org/10.1007/s11130-020-00810-6>

- Ramos-Enríquez, J.R., Ramírez-Wong, B., Robles-Sánchez, R.M., Robles-Zepeda, R.E., González-Aguilar, G.A. and Gutiérrez-Dorado, R. 2018. Effect of extrusion conditions and the optimization of phenolic compound content and antioxidant activity of wheat bran using response surface methodology. *Plant Foods for Human Nutrition*, 73(3): 228-234. <https://doi.org/10.1007/s11130-018-0679-9>
- Reynoso-Camacho, R., Guerrero-Villanueva, G., Figueroa, J.D., Gallegos-Corona, M.A., Mendoza, S., Loarca-Piña, G. and Ramos-Gomez, M. 2015. Anticarcinogenic effect of corn tortilla against 1, 2-Dimethylhydrazine (DMH)-induced colon carcinogenesis in sprague-dawley rats. *Plant Food for Human Nutrition*, 70:146-152. <https://doi.org/10.1007/s11130-015-0471-z>
- Rudzińska, M. and Przybylski, R. 2009. Products formed during thermo-oxidative degradation of phytosterols. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 86(7):651-662.
- Serna-Saldivar, S.O. and Chuck-Hernandez, C. 2019. Food uses of lime-cooked corn with emphasis in tortillas and snacks. In *Corn, Chemistry and Technology* (3<sup>rd</sup> ed., 469-500). ST Paul, MN: AACCI International. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811971-6.00017-6>
- Tolve, R., Cela, N., Condelli, N., Di Cairano, M., Caruso, M.C. and Galgano, F. 2020. Microencapsulation as a tool for the formulation of functional foods: the phytosterols' case study. *Foods*, 9(4):470-489. <https://doi.org/10.3390/foods9040470>
- Urias-Lugo, D.A., Heredia, J.D., Muy-Rangel, M.D., Valdez-Torres, J.B., Serna-Saldivar, S.O. and Gutiérrez-Urbe, J.A. 2015. Anthocyanins and phenolic acids of hybrid and native blue maize (*Zea mays* L.) extracts and their antiproliferative activity in mammary (MCF7), Liver (HepG2), Colon (Caco 2 and HT29) and prostate (PC3) cancer cells. *Plant Food for Human Nutrition*, 70(2):193-199. <https://doi.org/10.1007/s11130-015-0479-4>
- Vera-Candioti, L., De Zan, M.M., Cámara, M.S. and Goicoechea, H.C. 2014. Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. *Talanta*, 124:123-138. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.01.034>





# Estudio comparativo de la producción de biomasa y omega 3 y 6 en *Thraustochytrium Kinnei*

Comparative study of the production of biomass and omega 3 and 6 in *Thraustochytrium Kinnei*

David Silva-Rodríguez<sup>1\*</sup>, Yayne Beltrán-Guilarte<sup>2</sup>, Edgardo R. Ángulo-Mercado<sup>3</sup>, Benita H. Quilodrán-Toloza<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidad de Los Lagos, Departamento de Recursos Naturales y Medio Ambiente, Campus Chiquihue km. 6 s/n, Puerto Montt, Chile.

<sup>2</sup> Universidad de Los Lagos, Departamento de Gobierno y Empresa, Campus Chiquihue km. 6 s/n, Puerto Montt, Chile.

<sup>3</sup> Universidad del Atlántico, km. 7 antigua vía Puerto Colombia, Atlántico, Colombia.

## RESUMEN

Thraustochytridos se caracterizan por producir aceites microbianos del tipo omega 3 y 6. VAL-B1 y EMA-T5 son cepas del mismo género y aprovechan fuentes puras de carbono y residual para producir ácidos grasos poliinsaturados. Se utilizó glicerol puro (GP) y crudo (GC) para comparar la producción de biomasa, el rendimiento y producción de omega 3 y 6, utilizando 3 concentraciones diferentes de sustrato. Empleando 100 mL de cultivo a 25°C y 180 rpm, se observó un crecimiento de las cepas por 7 días, posteriormente se centrifugaron y cuantifico la biomasa por cromatografía gaseosa, el perfil de ácidos grasos. Los resultados muestran que EMA-T5 genera mayor cantidad de biomasa al 5to día usando 20 g/L de GC con 6,984 ± 0,66 g/L. Respecto al rendimiento y producción de omega 3 y 6, VAL-B1 obtuvo los mejores resultados con 91,80 ± 8,78 mg/g y 1167,71 ± 70,88 mg/L, siendo el omega 3 más abundante, en especial DHA con 52,72 ± 4,94 % de ácidos grasos totales (AGT). Se concluye, que EMA-T5 genera mayor producción de biomasa usando GC y VAL-B1 presenta los mejores resultados de rendimiento y producción de omega empleando GP, lo cual indica que ambas cepas, aprovechan de buena forma tanto la fuente pura como cruda del glicerol.

**Palabras clave.** Ácidos grasos poliinsaturados, glicerol crudo, aceites microbianos, ácido docosahexaenoico (DHA).

## ABSTRACT

Thraustochytrids are characterized by producing omega 3 and 6 type microbial oils. VAL-B1 and EMA-T5 are strains of the same genus that take advantage of pure sources of carbon and residual to produce polyunsaturated fatty acids. Pure (GP) and crude (GC) glycerol were used to compare biomass production and omega 3 and 6 yield and production, using three different substrate concentrations. Using 100 mL of culture at 25 ° C and 180 rpm, the strains were grown for 7 days, then the biomass was centrifuged, and the fatty acid profile quantified by gas chromatography. The results show that EMA-T5 generates a greater amount of biomass at day 5 using 20 g/L of GC with 6.984 ± 0.66 g/L. Regarding the yield and production of omega 3 and 6, VAL-B1 produced the best results with 91.80 ± 8.78 mg/g and 1167.71 ± 70.88

mg/L, being omega 3 the most abundant, especially DHA which presented the highest abundance with 52.72 ± 4.94 % total fatty acids (TFA). It is concluded that EMA-T5 generates higher biomass production using GC and VAL-B1, presents the best performance and omega production results using GP, which indicates that both strains make good use of both the pure and raw sources of glycerol.

**Keywords.** Polyunsaturated fatty acids, crude glycerol, microbial oils, docosahexaenoic acid.

## INTRODUCCION

Los Thraustochytridos (TH) son protistas marinos pertenecientes a la clase Labyrinthulomycetes del reino Chromista y se hallan dispersos en diferentes latitudes alrededor del mundo (Mar del Norte, océano índico, océano pacífico, mar de Tasmania y la Antártida). Estos microorganismos se caracterizan por producir aceites microbianos (SOCs) con un alto valor y diversos usos a nivel industrial (Raghukumar, 2008). Dentro de los ácidos grasos poliinsaturados (AGP) que producen destacan los omegas 3 y 6, los cuales tienen una amplia gama de usos en la industria farmacéutica, cosmética y de alimentos principalmente. En esta clasificación sobresalen principalmente ácido araquidónico (AA, C20:4n6), ácido eicosapentaenoico (EPA, C20:5n3), ácido docosapentaenoico (DPA, C22:5n6 y C22:5n3) y el ácido docosahexaenoico (DHA, C22:6n3). Los ácidos grasos omega 3(n3) y omega 6(n6) son componentes importantes de las membranas de las células y los precursores de muchas otras sustancias del organismo, como las que regulan la presión arterial y la respuesta inflamatoria. Cada vez hay más pruebas que indican que los ácidos grasos omega-3 protegen de las enfermedades cardíacas, y también se conoce su efecto antiinflamatorio importante contra estas enfermedades y muchas otras. Para la producción de AGP se han utilizado diversas fuentes de sustrato como glucosa, galactosa, fructosa, manosa, sucrosa (Shene *et al.*, 2010), materia orgánica compleja (Bongiorni *et al.*, 2005), biomasa proveniente de la celulosa (Hong *et al.*, 2012) y últimamente hasta miga de pan (Thyagarajan *et al.*, 2014). Además, con el fin de potenciar la producción de AGP también se han empleado diversos aditivos y/o suplementos

\*Autor para correspondencia: David Silva Rodríguez  
Correo electrónico: david.silva2@ulagos.cl

Recibido: 8 de diciembre de 2020

Aceptado: 9 de marzo de 2021

como el aceite de linaza (Gaffney *et al.*, 2014) y elementos traza como el hierro y el zinc (Nagano *et al.*, 2013).

Los TH han ganado importancia en los últimos 25 años, ya que han generado beneficios aplicables a la biotecnología dado su potencial uso en la obtención y producción de biodiesel y AGP del tipo omega 3 y 6, particularmente DHA (ácido docosahexaenoico), EPA (ácido eicosapentaenoico) y DPA (ácido docosapentaenoico) (Gupta *et al.*, 2012). Estos son conocidos también por secretar enzimas, polisacáridos, carotenoides, escualeno y coenzimas (Armenta *et al.*, 2006). Una cepa comercial, *Schizochytrium limacinum* SR21, ha sido empleada por investigadores para producir AGP, utilizando glicerol derivado del biodiesel y licor de maíz; en otros casos cepas han utilizado nutrientes orgánicos provenientes de las aguas residuales de las destilerías, plantas de soya, residuos líquidos de procesos de producción de la cerveza, cáscaras de papa y jugo de sorgo (Zhu *et al.*, 2008; Quilodrán *et al.*, 2009; Ethier *et al.*, 2011). Últimamente, también se están empleando medios a base de algas verdes y pardas (Pino *et al.*, 2015).

En forma general, la glucosa ha sido la mayor fuente de carbono utilizada en los procesos fermentativos, obteniéndose altos rendimientos de biomasa y productividad de lípidos en comparación con otras fuentes de carbono (Burja *et al.*, 2006; Beopoulos *et al.*, 2009; Gupta *et al.*, 2012). Sin embargo, en los últimos 10 años el glicerol crudo (GC) está siendo usado como una fuente alterna de carbono en lugar de la glucosa, debido a que es un compuesto abundante, de menor costo comparado con la glucosa y que se genera como subproducto en una gran variedad de procesos productivos. Justamente en la producción de biodiesel se obtiene GC, el cual puede ser utilizado como fuente de carbono para obtener metabolitos primarios, dando de esta forma un valor agregado al subproducto obtenido en la refinación del biodiesel (Abad, 2012; Chang *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2015).

En este estudio, se utilizaron 2 cepas de TH (VAL-B1 y EMA-T5) pertenecientes a la misma especie (*Thraustochytrium kinnei*) pero aisladas de dos zonas costeras diferentes (centro y Antártida chilena), y se produjeron en GC y GP con el fin de comparar y ver si hay alguna influencia significativa en su crecimiento y producción de AGP. Se analizaron tres concentraciones de GC, se obtuvo la producción de biomasa y omega 3 y 6, y los resultados obtenidos se compararon contra muestras crecidas en glicerol puro (GP) a los mismos valores de concentración.

## MATERIALES Y METODOS

El glicerol usado de 99,9 % pureza (GP) fue obtenido de Sigma-Aldrich (USA) y el glicerol crudo (GC) se obtuvo de la producción de biodiesel a partir de aceite de soya. Glutamato de sodio y extracto de levadura se obtuvieron de Becton, Dickinson and Co. (USA), el agar y peptona fueron conseguidos comercialmente de Oxoid (UK). Estreptomycin y penicilina fueron adquiridas a Calbiochem (Canadá). La ADN polimerasa fue obtenida de Biotools B&M Labs (SA, España). El polen de pino fue recolectado de *Pinus radiata*, autoclavado y alma-

cenado a condiciones de oscuridad y sequedad. El estándar de ácidos grasos empleado fue Supelco 37 Component FAME Mix, Varied conc. en diclorometano (Supelco, Sigma-Aldrich, USA). Todas las muestras trabajadas fueron preparadas con agua natural de mar filtrada (ANM) ajustada a un pH de 6,8.

## Cepas de TH

*Thraustochytrium kinnei* VAL-B1 y EMA-T5 fueron aisladas de agua marina en la costa chilena de la ciudad de Valparaíso (Centro, 33°03'47"S) y la antártica chilena (Sur, 75°00'30"S). Durante el período de muestreo la salinidad y temperatura del agua fue de 34,4 ppm y 16°C en Valparaíso y 33 ppm y 3°C en la antártica, lo cual muestra condiciones de adaptación diferenciada para cada cepa aislada. El aislamiento se llevó a cabo empleando el método de polen de pino (Gaertner, 1968; Bremer, 2000), con el cual se obtienen buenos resultados. Se toman 10 mg de polen de pino y se añaden a la muestra de agua (10 mL) manteniéndose por un período de 7 días a una temperatura de 25°C. Los granos de polen con los microorganismos adheridos son separados por filtración (filtro de nailon, 20 µm) y esparcidos sobre una placa de Petri con agar B: extracto de levadura (EL) 2 g/L, peptona (PEP) 2 g/L, agar 10 g/L, glucosa 5 g/L y sales en agua ANM preparada a una concentración final de 70 % p/v que contiene 300 mg/L de antibióticos (sulfato de estreptomycin y penicilina G) respectivamente, para evitar la proliferación de bacterias. Las placas fueron incubadas a 25°C hasta obtener colonias visibles. Luego colonias individuales fueron subcultivadas de nuevo en placas con agar B hasta obtener aislados puros, los cuales fueron comprobados por inspección en microscopio óptico (Zeiss, Estándar 20, Alemania), tal y como se aprecian en la figura 1.

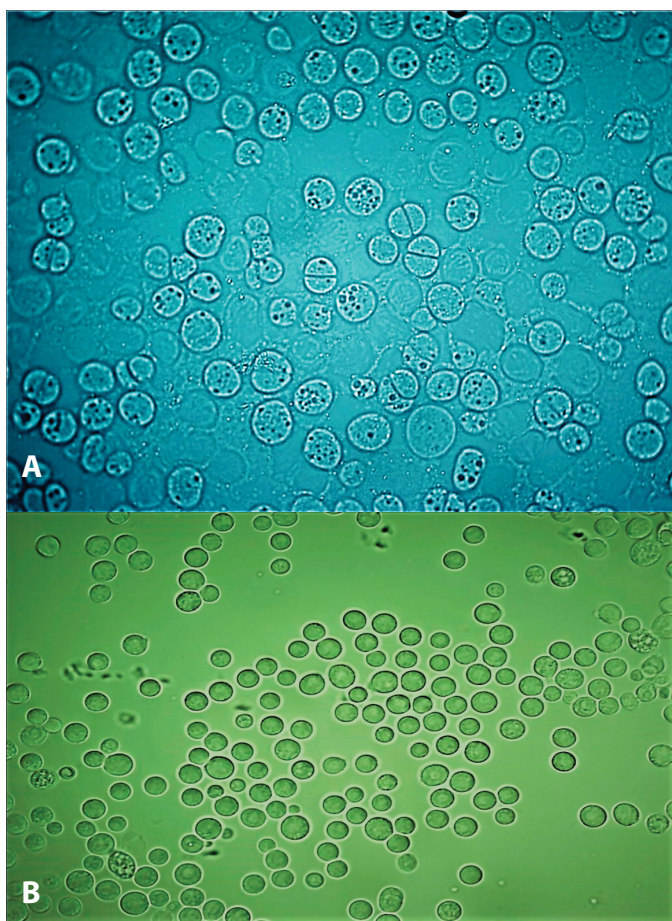
## Identificación genética

Las células colectadas desde las placas de agar fueron suspendidas en agua destilada (200 µL) y centrifugadas (8000 *xg*, 5 min. a 4°C). El precipitado fue re suspendido con buffer de lisis (200 µL; 0,25 M Tris-Cl; 0,1 M Na<sub>2</sub>-EDTA; 2 % p/v SDS; 0,1 M NaCl a pH 8,2). El ADN fue extraído con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico y precipitado con etanol. Los fragmentos de ADN secuenciados (ABI-3100, Applied Biosystem, California, USA) con números de acceso KF718865 y KF709393 fueron comparados con los disponibles en la base de datos de GenBank (Nacional Center for Biotechnology Information, USA: NCBI página <http://www.ncbi>). Las secuencias determinadas en este trabajo fueron alineadas con otras secuencias del gen que codifica para el ARN de la subunidad pequeña ribosomal 18S rRNA de organismos relacionados, obtenidas desde el Banco de Genes NCBI, utilizando el programa Clustal X (<http://www-igbmc.u-strasbg.fr/BioInfo/>). Para las dos cepas identificadas, hubo un 99 % de coincidencia con *Thraustochytrium kinnei* de los fragmentos secuenciados.

## Condiciones de cultivo

El inóculo se preparó transfiriendo células de la placa de agar en 50 mL de medio estéril B2 (para 1 L: glicerol, 10





**Figura 1.** Aislados puros en placa de Petri de VAL-B1 (A) y EMA-T5 (B).

**Figure 1.** Pure isolates in a Petri dish of VAL-B1 (A) and EMA-T5 (B).

g, EL, 2 g, glutamato de sodio (GS), 2 g y ANM filtrada a una concentración final de 70 % p/v). Se incubaron matraces de 250 mL por 48 h a 25°C con agitación orbital a 180 rpm. El material obtenido se utilizó para inocular (10 % v/v, densidad óptica del inóculo 0,4 a 600 nm) los fermentadores de 1 L que contenían 900 mL de medio, durante 7 días. Los experimentos con el GP y GC se trabajaron con valores de concentración de 1,10 y 20 g/L, empleándose un control. Las soluciones con la fuente de carbono y nitrógeno fueron esterilizadas separadamente (121 °C, 15 min.) y mezcladas para obtener la concentración requerida. Después de la esterilización, el pH del medio fue ajustado (con HCl o NaOH) a 6,8. Los datos empleados para realizar la curva de crecimiento se obtuvieron de cada fermentador utilizado cada 24 h. Los resultados corresponden al promedio de experimentos realizados por triplicado.

#### Cuantificación de biomasa

La biomasa fue separada por centrifugación (6000 *xg*, 15 min a 4 °C); el precipitado fue lavado tres veces con agua desionizada y liofilizado, determinándose gravímetricamente la concentración de biomasa seca. Las muestras se guardaron a -20 °C para posteriormente extraer los AGP. Los resultados obtenidos fueron el promedio de experimentos realizados por triplicado.

#### Cuantificación de AGP

Las muestras de biomasa liofilizada (30 a 50 mg) fueron empleadas para extraer los AGP por transesterificación directa. Los AGP extraídos con hexano fueron separados por centrifugación (4000 *g* y 20 °C) y cuantificados por cromatografía gaseosa (Agilent, 7890A) equipado con columna capilar DB-23 (60 m de largo, 0,25 mm de diámetro y 0,25  $\mu$ m de espesor) empleando el software ChemStation. La temperatura de la columna fue programada desde 50 °C hasta 260 °C con una velocidad de incremento de 10 °C/min. Se utilizó detector de ionización de llama (FID) con gas helio como transportador (200 °C). El inyector se mantuvo a 250 °C y el volumen de inyección fue de 1  $\mu$ L. Los picos de los metil ésteres ácidos grasos (FAMES) fueron identificados y cuantificados utilizando un estándar de ácidos grasos (Supelco 37 Component FAME Mix, Sigma Aldrich, USA). De igual forma se empleó como estándar interno en la muestra, metil éster ácido tricosianoico, C23:0 (Sigma Aldrich, USA).

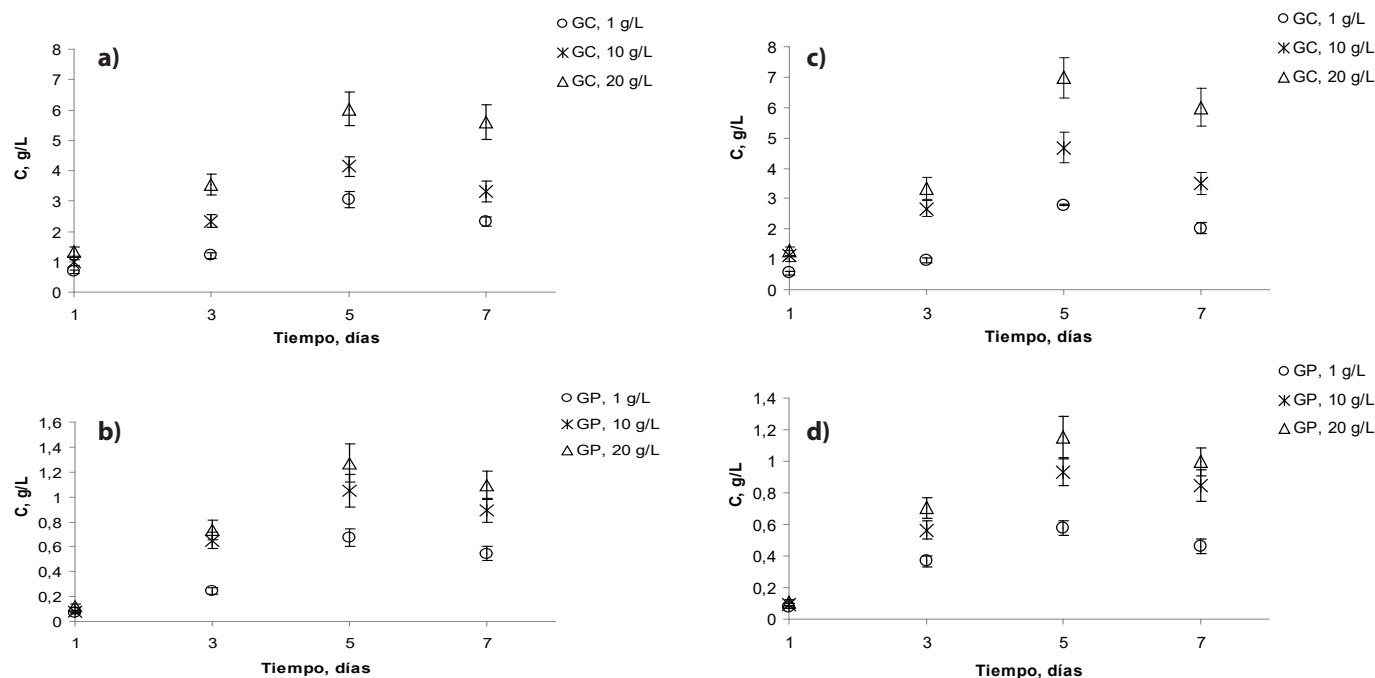
#### Análisis estadístico

Los datos fueron sometidos en un análisis de varianza (ANOVA) y las diferencias significativas se identificaron mediante la prueba de comparación entre las medias con un nivel de significación del 5 % ( $p < 0.05$ ). Antes de realizar ANOVA fue necesario comprobar si los datos tenían correlación y sus variaciones tendieran a ser igual. Muestras por triplicado se realizaron a lo largo de toda la experimentación. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo empleando el software SigmaPlot 10.0 (Systat Software Inc., Chicago, IL). Los resultados fueron expresados como medias  $\pm$  SD (desviación estándar) para cada experimento.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### Producción de biomasa

Los resultados para los cultivos de VAL-B1 y EMA-T5 empleando GP y GC se pueden apreciar en la Figura 2. En ambos casos se ve que los mayores valores de producción de biomasa se obtienen al usar GC como sustrato con una concentración de 20 g/L, siendo el quinto día el de mayor crecimiento (VAL-B1: 6,033 g/L y EMA-T5: 6,984 g/L). Al comparar estos resultados con los obtenidos usando GP a 20 g/L, se nota que la producción de biomasa es mayor en más de 400 %, representando una diferencia significativa en la transformación de la fuente de carbono. También se aprecia, que a medida que aumenta la concentración del sustrato en cada una de las fuentes de glicerol, el crecimiento celular de los microorganismos también tiende a incrementarse. La razón de este comportamiento está dada por el hecho de que los TH aprovechan de mejor forma la mayor presencia de nutrientes en los residuos, como es el caso del GC, versus lo que pueden transformar al emplear el GP. Scott *et al.* (2011), generaron 31,66 g/L de biomasa al quinto día de cultivo, usando GC con la cepa *Thraustochytrium* sp. ONCT18. Pyle *et al.* (2008), obtuvieron 8,1 g/L de masa celular al emplear la cepa *S. limacinum* SR-21 (ATCCMYA-1381) usando GC obtenido a partir de biodiesel del aceite de soya. Raghukumar (2008), usando



**Figura 2.** Crecimiento de biomasa para cepas de TH en función del tiempo (a) VAL-B1 en GC; (b) VAL-B1 en GP; (c) EMA-T5 en GC y (d) EMA-T5 en GP. C: concentración de biomasa, GC: glicerol crudo y GP: glicerol puro. Datos expresados son medidas de tres réplicas  $\pm$  desviación estándar para cada experimento ( $p < 0.05$ ).

**Figure 2.** TH strains biomass growth as a function of time (a) VAL-B1 in GC; (b) VAL-B1 in GP; (c) EMA-T5 in GC and (d) EMA-T5 in GP. C: biomass concentration, GC: crude glycerol and GP: pure glycerol. Data expressed are measures of three replicates  $\pm$  standard deviation for each experiment ( $p < 0.05$ ).

*A. limacinum* obtuvo 22,1 g/L empleando GC en un cultivo batch y Silva *et al.* (2015), obtuvieron 14,1 g/L al emplear la cepa AS4-A1 *Ulkenia* sp. de la misma fuente anterior. Por tal razón, se corrobora que al utilizar GC como sustrato residual y fuente de crecimiento para los TH, se obtienen mayores valores de producción de biomasa que al emplear como fuente pura de carbono GP, donde los TH sólo se valen del único componente presente en el sustrato, versus la variedad que se puede encontrar en un componente residual.

### Perfil de AGP

Los perfiles de AGP para cada una de las cepas crecidas tanto en GP como para GC se pueden ver en la Tabla 1. Los mayores valores en porcentaje de ácidos grasos totales (AGT) para ambas cepas, se obtuvieron para DHA y EPA, al hacer crecer los cultivos en GP y empleando una concentración de 20 g/L. En el caso de VAL-B1 los valores de los perfiles de DHA y EPA estuvieron por encima del 50 % y 8 % respectivamente y para EMA-T5 se obtuvo valores superiores al 43 % y 8 % para los mismos AGP. Algo importante es la presencia del DPAn6 en ambos casos con valores por encima de 1 %, dado que este ácido graso poliinsaturado de cadena muy larga es un precursor en la generación del DHA y por tal razón podría estar aportando en los valores finales de la obtención del DHA (Gupta *et al.*, 2012; Armenta y Valentine, 2013). Al usar GC como sustrato en el crecimiento de las dos cepas de *Thraustochytrium kinnei*, se aprecia al igual que cuando se emplea GP, que a medida que aumenta la concentración en el medio de cultivo también se incrementa el perfil de

los AGP. Al respecto, se puede decir que los mayores valores en porcentaje en p/p base seca de AGT para DHA y EPA se dan al usar 20 g/L de GP. En este caso, se observa que tanto para VAL-B1 como para EMA-T5 los valores de composición para DHA y EPA están por encima del 8 % y 40 % respectivamente, no habiendo diferencias significativas entre ambas cepas. Tanto para los cultivos crecidos en GP como en GC se nota que existe una correlación directa en el aumento de la producción de los AGP, a medida que se aumenta la concentración de sustrato en los respectivos cultivos (Pérez-García *et al.*, 2011; Chang *et al.*, 2013). Esto demuestra que los TH son capaces de aprovechar en forma eficiente el glicerol, tanto puro como crudo, con el fin de transformarlo en AGP con una alta importancia a nivel de procesos industriales (Beligon *et al.*, 2016; Shene *et al.*, 2018).

Otro aspecto tiene que ver con el hecho de que, aunque ambas cepas pertenecen a la misma especie, *Thraustochytrium kinnei*, provienen de hábitats con condiciones climáticas muy diferentes. VAL-B1 fue aislada de la zona central chilena y EMA-T5 de la zona subantártica, donde existe una diferencia apreciable en la temperatura de sus aguas. No obstante, los valores obtenidos en el perfil de AGT para los diferentes AGP al usar GC como sustrato, no muestran diferencias significativas. Al usar GP tampoco existen diferencias apreciables en el caso del AA, EPA, DPAn6 y DPAn3, sin embargo al analizar el DHA se nota que hay un aumento en el % p/p base seca de la cepa VAL-B1 versus la EMA-T5, lo que podría explicarse en parte a que VAL-B1 tiene mejores condiciones ambientales de temperatura, salinidad, suminis-



**Tabla 1.** Perfil de AGP para cepas VAL-B1 y EMA-T5 usando como sustrato GP y GC. Cs: concentración de sustrato  
**Table 1.** AGP profile for VAL-B1 and EMA-T5 strains using GP and GC as substrate. Cs: substrate concentration

Cepas	Sustrato	Cs (g/L)	AGP				
			ARA	EPA	DPAn6	DPAn3	DHA
			(% p/p base seca)				
EMA-T5	GP	1	0,51±0,053	6,30±0,52	1,03±0,15	0,52±0,044	37,56±2,64
		10	0,61±0,067	7,73±0,59	1,09±0,19	0,63±0,056	41,99±3,92
		20	0,80±0,077	8,75±0,78 <sup>b</sup>	1,33±0,14	0,69±0,061	44,84±4,01
	GC	1	0,087±0,007 <sup>aA</sup>	1,12±0,10	0,23±0,021	0,11±0,013	8,53±0,75
		10	0,23±0,016	2,14±0,23	0,54±0,047	0,43±0,045	9,34±0,83
		20	0,39±0,041	4,15±0,35 <sup>B</sup>	0,83±0,071	0,55±0,044	10,71±0,95
VAL-B1	GP	1	0,52±0,045	7,31±0,63	1,32±0,14	0,59±0,063	43,35±3,73
		10	0,77±0,053	7,73±0,59	1,66±0,17	0,74±0,086	48,47±4,90
		20	1,13±0,102 <sup>a</sup>	8,47±0,74 <sup>b</sup>	1,59±0,15	0,88±0,090	52,72±4,94 <sup>d</sup>
	GC	1	0,103±0,011	1,77±0,19	0,46±0,05	0,40±0,051	8,01±0,84 <sup>d</sup>
		10	0,33±0,034	2,16±0,34	0,62±0,07	0,50±0,063	9,10±0,94
		20	0,43±0,045	4,55±0,47 <sup>B</sup>	0,70±0,05	0,59±0,052	9,90±0,74

Datos expresados son medidas de tres réplicas  $\pm$  desviación estándar para cada experimento ( $p < .05$ ). <sup>a-c</sup> Diferencias estadísticamente significativas para cada AGP (vertical). <sup>A-D</sup> Diferencias estadísticamente significativas entre Cs (horizontal).  
 Data expressed are measures of three replicates  $\pm$  standard deviation for each experiment ( $p < .05$ ). <sup>a-c</sup> Statistically significant differences for each AGP (vertical). <sup>A-D</sup> Statistically significant differences between Cs (horizontal).

tro de nutrientes y oxígeno en las aguas de la zona central versus las que puede tener EMA-T5 en las gélidas aguas de la zona subantártica (Rosa *et al.*, 2011; Loperena *et al.*, 2012; Caamaño *et al.*, 2017).

### Rendimiento y producción de omega 3 y 6

El rendimiento de ácidos grasos omega 3 y 6, aumenta al emplear GP como sustrato tanto en VAL-B1 como en EMA-T5 (Tabla 2). Para ambas cepas se obtienen los mayores valores de omega 3 en EPA y DHA. Sin embargo, el mayor rendimiento se da para DHA, donde con VAL-B1 se producen 91,80±8,78 mg/g siendo superior un 13,28 % con respecto a lo que se obtiene con EMA-T5. Es interesante indicar que, aunque ambas cepas pertenecen al mismo género y que su producción de biomasa en GP es muy similar, ya que no hay diferencia significativa, los valores de producción tanto en omega 3 y 6 favorecen más a VAL-B1. Por tanto, se puede decir que la biotransformación que realiza VAL-B1 del GP, presenta mayor afinidad de condiciones que las que tiene EMA-T5, dado que ella no se halla en su entorno habitual de condiciones extremas, y por esta razón sus valores de producción de AGP son menores a los que se pudiesen encontrar, si efectivamente estuviera produciendo en las condiciones naturales de su hábitat. Estudios precedentes indican que cuando TH están sometidos a condiciones extremas, sean bajas temperaturas o altas concentraciones de salinidad, la forma en que ellos reaccionan a dicho estrés es produciendo más metabolitos primarios, en este caso AGP (Rosa *et al.*, 2011; Loperena *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2019). No obstante, como los cultivos de EMA-T5 fueron trabajados en condiciones de temperatura de 25 °C y salinidad de 29 ppm, con una fuente de ANM enriquecida con sales específicas,

esta puede ser la explicación de que los ácidos grasos omega 3 y 6 sean menores en comparación con lo producido por VAL-B1, que crece y está adaptada a las condiciones que se emplearon para los experimentos. Sin embargo, es de destacar, que el aprovechamiento que hacen tanto VAL-B1 como EMA-T5 de las dos fuentes de glicerol (GP y GC), presentan a lo menos valores similares o mayores rendimientos cuando se les compara con otras cepas de TH en la producción del EPA y DHA. Por ejemplo, con *A. limacinum* SR21 que usa GC, y que produce 22,1 g/L de biomasa y 32,2 mg/g, las dos cepas aquí estudiadas tienen un rendimiento mayor al 55 % para producir omega 3, con una cantidad de biomasa tres veces menor que la indicada (Raghukumar *et al.*, 2008). Chang *et al.* (2015), uso 50 g/L de glicerol crudo con *Aurantochytrium* sp. y obtuvo un rendimiento de 91 mg/g de DHA, valor que no está muy lejos del máximo obtenido con VAL-B1 que fue de 82,68 mg/g. En el caso de EPA, *Thraustochytrium* sp ONCT18 produce con GR 31,66 g/L de biomasa y tiene un rendimiento de 8,52 mg/g según lo indicado en el estudio de Scott *et al.* (2011); y las dos cepas estudiadas aquí con 4 veces menos de cantidad de biomasa tienen un rendimiento por encima de 80 % al producir este omega 3. Cuando se compara la producción de ácidos grasos omega 6 de EMA-T5 con las de otras especies de TH, se aprecian valores similares de rendimiento (10-13 mg/g) al usar GP como fuente de carbono en los cultivos (Adarme-Vega *et al.*, 2014; Gupta *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2015).

La producción de omegas 3 y 6, presenta un comportamiento diferente al hallado en los datos de rendimiento. Al comparar el GC versus el GP en las dos cepas estudiadas, los valores tienden a disminuir en la mayor parte de los omegas (contrario a lo que presento el rendimiento), excepto en el

**Tabla 2.** Rendimiento y producción de omega 3 y 6 con GP y GC, empleando 20 g/L de Cs al 5to día de cultivo.  
**Table 2.** Omega 3 and 6 yield and production with GP and GC, using 20 g / L of Cs at day 5 of culture.

Omega 3 y 6	VAL-B1	VAL-B1	EMA-T5	EMA-T5
	GC	GP	GC	GP
<i>Rendimiento (mg a. graso / g biomasa)</i>				
DPA <sub>n</sub> 6	9,24±0,75	35,34±2,02 <sup>b</sup>	7,32±0,83	10,15±1,12 <sup>d</sup>
DPA <sub>n</sub> 3	6,12±0,56	20,31±1,84 <sup>b</sup>	5,76±0,79	6,01±0,98 <sup>d</sup>
AA	9,36±1,23	26,77±1,93 <sup>b,c</sup>	7,92±0,91	13,2±2,24 <sup>d</sup>
EPA	61,2±5,12 <sup>a</sup>	71,14±6,73	34,68±4,46 <sup>c</sup>	53,63±3,34
DHA	82,68±5,68	91,80±8,78 <sup>b</sup>	66,6±7,54 <sup>c,d</sup>	79,6±4,96
<i>Producción (mg a. graso / L cultivo)</i>				
DPA <sub>n</sub> 6	55,74±3,34	44,96±2,12	51,12±7,11	38,48±2,92 <sup>D</sup>
DPA <sub>n</sub> 3	36,92±2,48	25,83±1,63	40,23±5,02	28,91±3,89
AA	56,47±3,23	34,06±2,46 <sup>B</sup>	55,31±6,34	15,22±1,76 <sup>D</sup>
EPA	369,22±18,46 <sup>A</sup>	217,7±10,23	242,21±23,22	121,48±12,15 <sup>D</sup>
DHA	498,81±34,94	1167,71±70,88 <sup>B</sup>	465,13±41,57	633,39±73,33 <sup>D</sup>

Datos expresados son medidas de tres réplicas ± desviación estándar para cada experimento (p<.05).

<sup>a-d</sup> Diferencias estadísticamente significativas para el rendimiento de cada omega 3 y 6. <sup>A-D</sup> Diferencias estadísticamente significativas para la producción de cada omega 3 y 6.

Data expressed are measures of three replicates ± standard deviation for each experiment (p<.05). <sup>a-d</sup> Statistically significant differences for the performance of each omega 3 and 6. <sup>A-D</sup> Statistically significant differences to produce each omega 3 and 6.

caso de la omega 3 DHA donde se nota una alta producción comparado con el GC, obteniéndose un valor máximo de producción de 1167,71 ± 70,88 mg/L con VAL-B1 al utilizar GP como sustrato. En el caso de EMA-T5 hay un aumento del 26,56 % al comparar el GP con el GC, sin embargo, aunque el valor de producción de DHA es alto - 633,39 ± 73,33 mg/L - con GP, este valor es menor al compararlo con el de VAL-B1 (ver Tabla 2). Un estudio realizado por Ethier *et al.* (2011), empleando *S. limacinum* SR21 con una concentración de GP de 90 g/L en un cultivo continuo, produjo 1740 mg/L de DHA, un valor cercano a lo reportado por Pyle *et al.* (2008) quién obtuvo 1630 mg/L de DHA usando la misma cepa con GC obtenido de la producción de biodiesel a partir de aceite de soya como sustrato y mayor un 49 % que lo reportado en este estudio con VAL-B1 creciendo en GP.

No obstante, la alta producción de DHA que obtuvieron Ethier *et al.* (2011), difiere significativamente de los máximos valores que reportaron Huang *et al.*, 2012, en donde *A. limacinum* SR21 produjo 20300 mg/L empleando 50 g/L de GP y usando un cultivo continuo.

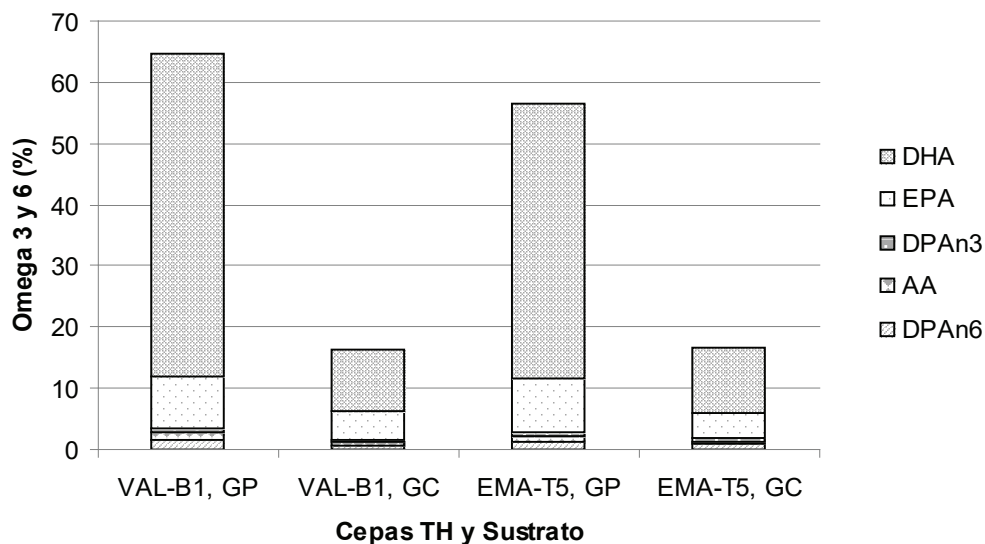
### Porcentaje total de AGP omega 3 y 6

Las cepas al crecer en GP generaron mayores cantidades de omega 3 y 6, destacándose el DHA producido por VAL-B1 con valores por encima del 52 % de AGT (ver Figura 3). En el caso de la omega 6, el DPA<sub>n</sub>6 obtenido en GP con la cepa anterior fue el más alto con un valor de 1,59 % de AGT. Al tomar en conjunto el contenido total de omega 3, tanto VAL-B1 como EMA-T5 presentan valores de porcentaje total de ácidos grasos por encima del 50 %, destacando que VAL-B1 produce 62,07 % lo cual es un valor representativo cuando se compara con otras cepas usando el mismo sustrato. Chang

*et al.* (2015), reportó un valor total de omega 3 de 53 % AGT usando *Aurantochytrium* sp. con GP a una concentración de 4 % (p/v), obtuvo además 49 % AGT omega 3 empleando *Thraustochytrium* sp a la misma concentración de GP y 20 % AGT omega 3 con *Ulkenia* sp. a las mismas condiciones de GP. Singh *et al.* (2015), empleo GP al 3 % (p/v) y obtuvo 47 % DHA en cultivos con *Schizochytrium* sp. S31 al séptimo día, valor superior 3 veces al obtenido con EMA-T5 en este estudio para omega 3 DHA con 15,41 % AGT (ver Figura 3). Caso contrario a lo anterior, Chang *et al.* (2015), obtuvo con GC y empleando *Aurantochytrium* sp. mayores valores para omega 3 que los que reportó Singh *et al.* (2015), por encima del 50 % para dos cepas de la misma familia. En este caso, dichas cepas de TH presentaron condiciones de adaptación distintas, ya que fueron aisladas y crecidas con otros valores de temperatura y salinidad.

Además de lo anterior, Chi *et al.* (2007), reportó con *Schizochytrium limacinum* un contenido de DHA de 33,6 % empleando GC obtenido de biodiesel industrial, siendo superior al reportado por Pyle *et al.* (2008), quién obtuvo 24,5 % de DHA con la misma cepa y sustrato. No obstante, Singh *et al.* (2015), empleo GP al 3 % (p/v) con *Schizochytrium* sp. S31 suplementado con hidroxitolueno butilado, y obtuvo un 54,76 % más de DHA que Chi *et al.* (2007), y el mismo valor obtenido en este estudio con VAL-B1 y GP (52 % AGT de DHA).

Los porcentajes totales de AGP omega 3 en esta investigación, empleando GP son muy similares a los obtenidos en otros estudios, lo cual indica que dicho sustrato es aprovechado de igual forma por varias especies de TH y que efectivamente hay una afinidad importante por esta fuente de carbono. GC es una alternativa interesante, ya que es un subproducto que puede emplearse para obtener omega 3 y



**Figura 3.** Contenido total de omegas 3 y 6 en cepas de VAL-B1 y EMA-T5 en concentración de sustrato de 20 g/L para GP y GC. Omega 3: DHA, EPA y DPAn3, y Omega 6: AA y DPAn6.

**Figure 3.** Total content of omegas 3 and 6 in VAL-B1 and EMA-T5 strains at a substrate concentration of 20 g / L for GP and GC. Omega 3: DHA, EPA and DPAn3, and Omega 6: AA and DPAn6.

6 de una fuente que no sea pura y aprovechar el menor costo que podría tener en un proceso productivo.

## CONCLUSIONES

Las dos cepas de *Thraustochytrium kinnei* analizadas en este estudio produjeron mayor cantidad de biomasa cuando utilizaron GC como su fuente de sustrato en comparación con el GP. EMA-T5 destacó al generar  $6,984 \pm 0,66$  g/L al día 5 de crecimiento y con una concentración de GC de 20 g/L. El perfil de AGP en GP en ambos casos indicó que el ácido graso más abundante fue el DHA, donde VAL-B1 obtuvo un  $52,72 \pm 4,94$  % AGT en base seca, siendo igualmente el omega 3 presente mayoritariamente cuando se emplea GC. Tanto el rendimiento como producción de omega 3 y 6 obtuvo sus mejores resultados con VAL-B1 y empleando GP, donde los mayores valores arrojaron  $91,80 \pm 8,78$  mg DHA / g biomasa y  $1167,71 \pm 70,88$  mg DHA / L de cultivo, siendo en general los omegas 3 los más abundantes. Respecto al porcentaje total de AGP de igual manera los omegas 3 son los que están presentes en mayor proporción cuando se compara las dos cepas, donde VAL-B1 destaca con 62,07 % al emplear GP.

Estos resultados permiten concluir que las dos cepas del género *Thraustochytrium kinnei* emplean eficientemente la fuente pura (GP) y cruda (GC), para producir omega 3, pero destaca principalmente la biotransformación que realiza VAL-B1 al usar de mejor manera el GP sobre el GC.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Dirección de Investigación y el Departamento de Recursos Naturales de la Universidad de Los Lagos, por el apoyo y colaboración de esta investigación.

## REFERENCIAS

- Abad, S., Turon X. (2012). Valorization of biodiesel derived glycerol as a carbon source to obtain added-value metabolites: focus on polyunsaturated fatty acids. *Biotechnol. Adv.* 30:733-741.
- Adarme-Vega, T.C., Thomas-Hall, S R., and Peer M Schenk, P.M. (2014). Towards sustainable sources for omega-3 fatty acids production. *Current Opinion in Biotechnology* 26:14-18.
- Armenta, R.E., Burja A., Radianingtyas H. and Barrow C.J. (2006). Critical assessment of various techniques for the extraction of carotenoids and co-enzyme Q10 from the thraustochytrid strain ONC-T18. *J. Agric. Food Chem.* 54: 9752-9758.
- Armenta, R.E. and Valentine M. (2013). Single-Cell oils as a source of omega-3 fatty acids: an overview of recent advances. *Journal of the American Oil Chemists' Society.* 90(2):167-82.
- Beligon V., Christopher G., Fontanille P. and Larroche C. (2016). Microbial lipids as potential source to food supplements. *Current Opinion in Food Science.* 7:35-42.
- Beopoulos, A., Cescut J., Haddouche R., Uribelarrea J-L., Molma-Jouve C. and Nicaud J-M. (2009). *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. *Prog. Lipid Res.* 48:375-387.
- Bongiorni, L., Pusceddu A. and Danovaro R. (2005). Enzymatic activities of epiphytic and benthic thraustochytrids involved in organic matter degradation. *Aquat. Microb. Ecol.* 41:299-305.
- Bremer, G. (2000). Isolation and culture of thraustochytrids. *Marine Mycology – A Practical Approach.* p. 49-61. In Hyde KD & Pointing SB (ed.) Fungal Diversity Press, Hong Kong.
- Burja, A.M., Radianingtyas H., Windust A., and Barrow C.J. (2006). Isolation and characterization of polyunsaturated fatty acid producing *Thraustochytrium* species: screening of strains and optimization of omega-3 production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72:1161-1169.
- Caamaño, E., Loperena L., Hinzpeter I., Pradel P., Gordillo F., Corsini G., Tello M., Lavín P., González A. (2017). Isolation

- and molecular characterization of *Thraustochytrium* strain isolated from Antarctic Peninsula and its biotechnological potential in the production of fatty acids. *Brazilian Journal of Microbiology*. 48:671-79.
- Chang, W., Gao N., Tian G., Wu Q., Chang M., Wang X. (2013). Improvement of docosahexaenoic acid production on glycerol by *Schizochytrium* sp. S31 with constantly high oxygen transfer coefficient. *Bioresource Technology*. 142:400-406.
- Chang K., Paul H., Nichols P.D., Koutoulis A. and Blackburn S.I. (2015). Australian thraustochytrids: Potential production of dietary long-chain omega-3 oils using crude glycerol. *Journal of Functional Foods* 19:810-20.
- Chi, Z., Pyle D., Wen Z., Frear C. and Chen S. (2007). A laboratory study of producing docosahexaenoic acid from biodiesel-waste glycerol by microalgal fermentation. *Process Biochem*. 42:1537-1545.
- Ethier, S., Woisard K., Vaughan D. and Wen Z. (2011). Continuous culture of the microalgae *Schizochytrium limacinum* on biodiesel derived crude glycerol for producing docosahexaenoic acid. *Bioresour. Technol.* 102:88-93.
- Gaertner A. (1968). Eine Methode des quantitativen Nachweises niederer mit Pollen köderbarer Pilze im Meerwasser und im Sediment. *Veröff Inst Meeresforsch Bremerh Suppl.* 3:75-92.
- Gaffney M., O'Rourke R. and Murphy R. (2014). Manipulation of fatty acid and antioxidant profiles on the microalgae *Schizochytrium* sp. through flaxseed oil supplementation. *Algal Research* 6:195-200.
- Gupta, A., Barrow C.J. and Puri M. (2012). Omega-3 biotechnology: thraustochytrids as a novel source of omega-3 oils. *Biotechnol. Adv.* 30:1733-1745.
- Gupta, A., Reinu A., Barrow C. and Puri M. (2015). Omega-3 fatty acid production from enzyme saccharified hemp hydrolysate using a novel marine thraustochytrid strain. *Bioresource Technology* 183:373-78.
- Hong, K., Rairakhwada, K. and Kondo H. (2012). Growth of the oleaginous microalgae *Aurantiochytrium* sp. KRS101 on cellulosic biomass and the production of lipids containing high levels of docosahexaenoic acid. *Bioprocess Biosys. Eng.* 35:129-133.
- Huang, T.Y., Lu W.C. and Chu I.M. (2012). A fermentation strategy for producing docosahexaenoic acid in *Aurantiochytrium limacinum* SR21 and increasing C22:6 proportions in total fatty acid. *Bioresource Technology* 123:8-14.
- Loperena L., Soria V., Varela H., Lupo S., Bergalli A., Guigou M., Pellegrino A., Bernardo A., Calviño A., Rivas F. and Batista S. (2012). Extracellular enzymes produced by microorganisms isolated from maritime Antarctica. *World J. Microbiol Technol.* 28:2249-2256.
- Nagano N, Taoka Y., Honda D. and Hayashi M. (2013). Effect of trace elements on growth of marine eukaryotes, thraustochytrids. *J Biosci Bioeng.* 116(3):337-9.
- Pérez-García, O., Escalante F.M., Bashan L.E. and Bashan Y. (2011). Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research*. 45:11-36.
- Pyle D.J., García R.A., Wen Z. (2008). Producing docosahexaenoic acid (DHA)-rich algae from biodiesel-derived crude glycerol: effects of impurities on DHA production and algal biomass composition. *J Agric Food Chem.* 56:3933-3939.
- Pino, N., Socias C. and González R. (2015). Marine fungoids producers of DHA, EPA and carotenoids from central and southern Chilean marine ecosystems. *Revista de Biología Marina y Oceanografía.* 50(3):507-20.
- Quilodrán B., Hinzpeter I., Quiroz A. and Shene C. (2009). Evaluation of liquid residues from beer and potato processing to produce docosahexaenoic acid (C22:6n-3, DHA) by native thraustochytrid strains. *World J. Microbiol Biotechnol.* 25:2121-2128.
- Raghukumar, S. (2008). Thraustochytrid Marine Protists: Production of PUFAs and Other Emerging Technologies. *Mar Biotechnol.* 10:631-640.
- Rosa, S.M., Galvagno M.A. and Vélez C.G. (2011). Adjusting culture conditions to isolate thraustochytrids from temperate and cold environments in southern Argentina. *Mycoscience.* 52:242-52.
- Scott S.D., Armenta R., Berryman K.T and Norman A.W. (2011). Use of raw glycerol to produce oil rich in polyunsaturated fatty acids by a thraustochytrid. *Enzyme and Microbial Technol.* 48:267-272.
- Shene C., Leyton A., Esparza Y., Flores L., Quilodrán B., Hinzpeter I. and Rubilar M. (2010). Microbial oils and fatty acids: Effect of carbon source on docosahexaenoic acid (C22:3 n-3, DHA) production by Thraustochytrid strains. *J. Soil Sci. Plant. Nutr.* 10:207-216.
- Shene, C., Garcés M., Vergara D., Peña J., Claverol S., Rubilar M. and Leyton A. (2018). Production of lipids and proteome variation in a Chilean *Thraustochytrium stratum* strain cultured under different grown conditions. *Marine Biotechnol.* 21(1):99-110.
- Silva D., Roa A., Quevedo R. and Quilodrán B. (2015). Production of biodiesel from soybean frying oil using native strains of Thraustochytrids. *Chilean J Agric Anim Sci;* 31(1):29-41.
- Singh, A., Mathur A., Tuli D., Puri M. and Barrow C. (2015). Propyl gallate and butylated hydroxytoluene influence accumulation of saturated fatty acids, omega-3 fatty acid and carotenoids in thraustochytrids. *Journal of functional foods* 15:186-92.
- Thyagarajan, T., Puri M., Vongsivut J. and Barrow C.J. (2014). Evaluation of Bread Crumbs as a Potential Carbon Source for the Growth of Thraustochytrid Species for Oil and Omega-3 Production. *Nutrients.* 6:2104-2114.
- Wang, Q., Ye H., Xie Y., He Y., Sen B. and Wang G. (2019). Culturable Diversity and Lipid Production Profile of Labyrinthulomycete Protists Isolated from Coastal Mangrove Habitats of China. *Mar. Drugs.* 17, 268; doi:10.3390/md17050268.
- Zhu, L., Zhang X., Ren X. and Zhu Q. (2008). Effects of culture conditions on growth and docosahexaenoic acid production from *Schizochytrium limacinum*. *J. Ocean Univ. China.* 7:83-88.





# Diurnal and seasonal *hsp70* gene expression in a cryptic reef fish, the bluebanded goby *Lythrypnus dalli* (Gilbert 1890)

Expresión diurna y estacional del gen *hsp70* en un pez críptico arrecifal, el gobio azul rayado *Lythrypnus dalli* (Gilbert 1890)

Priscila Conde-Guerrero<sup>1</sup>, Tania Zenteno-Savín<sup>1\*</sup>, Crisalejandra Rivera-Pérez<sup>2</sup>, Fausto Valenzuela-Quíñonez<sup>1</sup>, Juan Antonio De Anda-Montañez<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. Instituto Politécnico Nacional 195, Col. Playa Palo de Santa Rita Sur; La Paz, BCS 23096, México.

<sup>2</sup> CONACYT-Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. Instituto Politécnico Nacional 195, Col. Playa Palo de Santa Rita Sur; La Paz, BCS 23096, México.

## ABSTRACT

Physiological responses of marine organisms are influenced by environmental variations, particularly in dynamic habitats. These variations could be at a diel or seasonal scale, and requires acclimation responses that, at a molecular level, are facilitated by gene expression regulation. Circadian rhythms allow organisms to adjust to recurring environmental changes and to synchronize physiological processes. Increased Hsp70 gene expression allows organisms to protect themselves against heat and other stressors, conferring them a periodically changing thermotolerance. This study aimed at analyzing whether the variability of exogenous factors (temperature, dissolved oxygen, salinity) in diurnal or seasonal scales affects *hsp70* expression in cryptic reef fishes in their natural environment. The study model was *Lythrypnus dalli*, an endemic cryptic reef fish inhabiting shallow waters throughout the Gulf of California. Physical parameters varied seasonally; temperature increased 6°C during the warm season, salinity and dissolved oxygen remained with minor variation. Minimal changes in temperature ( $\pm 1$  °C) occurred diurnally. Expression levels of *hsp70* increased significantly during the warm season ( $p < 0.05$ ), perhaps related to seasonal thermal changes. No difference in *hsp70* was observed during the diurnal cycle ( $p > 0.05$ ). *L. dalli* has apparently developed phenotypic plasticity to face environmental variability at diurnal and seasonal scales.

**Key words:** circadian rhythm, cryptic reef fish, heat shock protein 70, *Lythrypnus dalli*, temperature.

## RESUMEN

Las respuestas fisiológicas de los organismos marinos son influenciadas por variaciones ambientales, particularmente en hábitats dinámicos. Éstas pueden ser a escala diurna o estacional y requieren respuestas que, a nivel molecular, son facilitadas por inducción de expresión génica. Los ritmos circadianos permiten ajustar cambios ambientales recurrentes y sincronizarlos con procesos fisiológicos. El incremento en la expresión de *hsp70* es una estrategia para enfrentar cambios térmicos y otros estresores, confiriendo termotolerancia que cambia periódicamente. El objetivo de este estudio fue analizar si la variabilidad de factores exógenos (temperatura, oxígeno disuelto, salinidad) en escalas diurna

o estacional afecta la expresión de *hsp70* en peces crípticos en su medio natural. El modelo de estudio fue *Lythrypnus dalli*, un pez críptico arrecifal que habita el Golfo de California. Los parámetros físicos variaron estacionalmente; la temperatura aumentó 6°C durante la temporada cálida, salinidad y oxígeno disuelto permanecieron con variaciones mínimas. Se observaron cambios mínimos ( $\pm 1$ °C) en temperatura en el ciclo diurno. Los niveles de expresión de *hsp70* aumentaron durante la estación cálida ( $p < 0.05$ ). No se observaron diferencias en *hsp70* durante el ciclo diurno ( $p > 0.05$ ). *L. dalli* aparentemente ha desarrollado plasticidad fenotípica para enfrentar la variabilidad ambiental diurna y estacional.

**Palabras clave:** ritmo circadiano, pez críptico arrecifal, proteína choque térmico 70, *Lythrypnus dalli*, temperatura.

## INTRODUCTION

Environmental variability in the marine environment plays an important role in the distribution of species and could be a promoter of biodiversity, since it gives rise to genetic and phenotypic variations (Culumber *et al.*, 2012) This variability can occur drastically throughout a diel cycle due to the influence of tide, rainfall or primary productivity (Kwiatkowski *et al.*, 2016) lowering seawater aragonite (CaCO<sub>3</sub>). In addition, the seasonal variation is also significant and temperature is one of the factors with evident seasonal fluctuation due to the annual cycle of solar radiation, and is closely related to other abiotic factors (Gunderson *et al.*, 2016).

Marine organisms adapt to the environmental changes that prevail in their natural habitat. These variations require specific and rapid responses in some molecular pathways associated with acclimatization responses; modulation of gene expression is one of these first responses (Tine, 2017). Circadian rhythms are biological cycles with a duration close to a 24-hour period that persist even in the absence of external stimuli, involving oscillations in gene expression and the consequent modulation of various physiological processes (Podrabsky, 2004). Circadian rhythms are an important adaptive trait, since they allow a concordance between environmental events and the organization of biological functions, preparing organisms to respond to predictable environmental conditions (Vera *et al.*, 2013).

\*Autor para correspondencia: Tania Zenteno Savín  
 Correo electrónico: tzenteno04@cibnor.mx

Recibido: 3 de diciembre de 2020  
 Aceptado: 2 de febrero de 2021

Climate change could have a significant impact on survival strategies in marine organisms. Thus, the adaptive responses of organisms to their current conditions can provide important clues about how they might face future environmental changes (Habary *et al.*, 2016). A large number of studies analyzing the molecular response to fluctuating environmental conditions have been conducted under controlled laboratory conditions. However, in the natural environment this response is affected by the synergistic action of different environmental parameters and is less known. Therefore, it is important to expand knowledge about the expression and regulation of genes related to individual physical condition to better understand the adaptive processes of wild populations (Evans and Hofmann, 2012).

Studies that analyze the effect of environmental variability on the molecular response of marine organisms have focused on the expression of heat shock proteins (HSPs) (Tomanek, 2010). These proteins act as chaperones and contribute to the stabilization of denatured polypeptides preventing their aggregation during stressful conditions. The HSP70 family has been well studied because it is highly conserved and has been found in a wide variety of organisms (Madeira *et al.*, 2012; Yamashita *et al.*, 2010).

Fishes, particularly reef fishes, are a potential model for studying these responses, as they are organisms whose physiology is closely linked to the environment. Tropical reefs are coastal areas influenced by a convergence between ocean and land variability, making them appropriate systems for studying temporal and spatial fluctuations in physical parameters and their effects on the organisms inhabiting them. Furthermore, rocky reefs can host a great diversity of fish species, from which a large proportion could be composed of cryptic species (Brandl *et al.*, 2018).

The aim of this study was to evaluate the effect of the variation in environmental factors, such as temperature, dissolved oxygen, and salinity, at diurnal and seasonal scale on the expression of *hsp70* gene in cryptic reef fish. The blue-banded goby *Lythrypnus dalli* (Gilbert, 1890) was chosen as the model species due to its high site fidelity and preference for shallow waters. These traits allow to analyze the physiological responses to fluctuating conditions of its natural environment. To achieve this, we quantified the expression of a stress related gene (*hsp70*) during a 24-hour period, both during warm and cold seasons, in order to contrast the responses to extreme environmental conditions.

## MATERIALS AND METHODS

### Field sampling

Specimens of *L. dalli* were collected during a diel cycle in a warm (October 2017) and a cold (April 2018) season in a rocky shore named Punta Diablo in Bahía La Paz, Baja California Sur, Mexico (24° 18' 45" N, 110° 20' 13" W). Sample collection was performed by SCUBA diving every 4 h over each 24-hour period in both seasons. A total of 6 dives per day were performed at 12 m depth, during 20 min approximately and started at 12:00 hr. During each dive, an ethanol-

clove oil solution was spread over holes and crevices found in the sampling rocky wall. Anesthetized individuals were caught with nets and taken to the surface, where they were immediately frozen in liquid nitrogen. Physical parameters (temperature, dissolved oxygen and salinity) were measured *in situ* every hour to determine 24-hour changes. All parameters were measured at the same time using a multiparameter probe (YSI Pro 2030, OH, USA). The sensor was submerged 10 m depth from the surface, as closely as possible to the sampling area.

### RNA isolation and cDNA synthesis

Five individuals for each hour of sampling were considered for quantification of the target transcripts (5 biological replicates), for both seasons. It was not possible to capture organisms in all the sampling hours in October. Thereby, total RNA was extracted from 47 individuals (~100 mg) according to the acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform method of Chomczynski and Sacchi (1987). Since these fishes have small body size (< 3 cm), the whole fish was used for RNA extraction. DNA present in samples was removed by Turbo DNase treatment (TURBO DNA-free™ Kit, Invitrogen). RNA concentration in samples was assessed by measuring the absorption at 260 and 280 nm using a Nanodrop ND-2000 spectrophotometer (Thermo Scientific); an absorption ratio of 1.8-2.1 indicated pure RNA samples. The RNA integrity was evaluated by 1 % agarose gel electrophoresis; presence of 18S and 28S rRNA bands confirm RNA quality. Complementary DNA (cDNA) was synthesized using one microgram of RNA and ImProm-II™ Reverse Transcriptase (Promega) according to the instructions provided by the manufacturer and stored at -20 °C.

### Primers design

Specific forward and reverse primers for both *hsp70* and the reference gene  $\beta$ -actin were designed (~150 bp amplicon length, ~55 % GC content, 60 °C primer  $T_m$ ) using Primer3v.0.4.0 (Untergasser *et al.*, 2012).  $\beta$ -actin is one of the most commonly used reference gene to quantify mRNA and its stability has been analyzed in some fish species under thermal stress conditions (Ma *et al.*, 2019; Nascimento *et al.*, 2016; Purohit *et al.*, 2015). The primers were F: 5-GAGAAGTGCAGGACCTGCT-3, R: 5-CCGGGCTGGTTGTCGAAGTA-3 for *hsp70*; and F: 5-TGAAGATCCTGACAGAGCGTGGC-3, R: 5-TTGCCGATGGTGATGACCTGT -3 for  $\beta$ -actin. For each gene, primers were designed from the alignment of homologous sequences of phylogenetically related fish, which were found in the NCBI database.

A polymerase chain reaction (PCR) was carried out to confirm primer amplification size. In a 12.5  $\mu$ L reaction, the PCR was performed using 1  $\mu$ L of template cDNA (50 ng  $\mu$ L<sup>-1</sup>), 1  $\mu$ L of forward and reverse primer (5  $\mu$ M) each, 6.25  $\mu$ L of GoTaq® DNA polymerase 2X (Promega) and 3.25  $\mu$ L of Milli-Q® sterile water. Cycling parameters for PCR were as follows: 95 °C for 5 min; 40 cycles of 94 °C for 1 min, 50–60 °C for 1 min, then 72 °C for 1 min; and 72 °C for 10 min. PCR products were

separated on 1 % TBE agarose/Synergel® gels and visualized using Uview on a UV transilluminator (Chemi-Doc). The resulting amplicons were sequenced, and the identities of the genes were confirmed by BLAST searches.

**qPCR analysis**

Real time PCRs (qPCR) were done to amplify and measure *hsp70* gene expression. The specific primers used to amplify *hsp70* and the reference gene  $\beta$ -*actin* were the same previously used for the conventional PCR. In a 15  $\mu$ L reaction, the PCR was performed using 5  $\mu$ L of template (5 ng  $\mu$ L<sup>-1</sup> of cDNA), 1.5  $\mu$ L of buffer 10X, 0.75  $\mu$ L of MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0.25  $\mu$ L of dNTPS (10 mM), 0.7  $\mu$ L of forward and reverse primer (5  $\mu$ M) each, 0.07  $\mu$ L of recombinant Taq polymerase (5 U  $\mu$ L<sup>-1</sup>), 0.75  $\mu$ L of Eva Green 20X (Biotium) and 5.8  $\mu$ L of Milli-Q® sterile water. Cycling parameters for qPCR were as follows: 95 °C for 10 min; 40 cycles of 95 °C for 15 s, 60 °C for 1 min, then 72 °C for 20 s; and 72 °C for 10 min; and melt curve from 65 °C to 95 °C, at 0.5 °C for 10 s. All samples were run in triplicate. No-template controls (NTCs) were included to ensure the lack of contamination. Amplification efficiencies of the primers were verified by doing standard curves for both genes (Table 1). Furthermore, melting curves were analyzed to verify PCR specificity. The relative expression levels of *hsp70* was measured against  $\beta$ -*actin* (reference gene) and was calculated according to the method of Pfaffl (2001).

**Statistical analysis**

Statistical differences in *hsp70* gene expression between different hours of sampling and seasons were analyzed using STATISTICA v10 (STATISTICA®, v10, StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA). The assumptions of normality (Shapiro-Wilk) and homogeneity of variances (Levene’s test) were tested. Because neither assumption was met, statistical differences were analyzed by a non-parametric analysis (Kruskall-Wallis). All differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

**RESULTS**

A total of 62 specimens of *L. dalli* (n = 62 individuals, Lt (mean  $\pm$  SD) = 2.3  $\pm$  0.38 cm; Wt (mean  $\pm$  SD) = 123.98  $\pm$  53.24 mg) were collected during the sampling periods. In October 2017, a total of 25 individuals were obtained; however, this species was not found in all sampling hours (Figure 1). In April 2018, 37 individuals were obtained in all sampling hours.

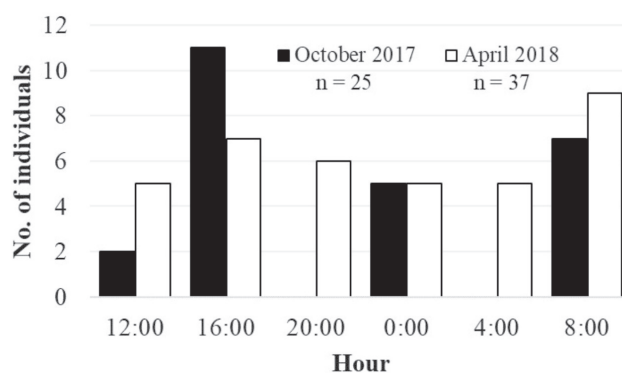
**Environmental data**

Temperature, salinity and dissolved oxygen measurements are shown in Figure 2. Averaged water temperature

**Table 1.** Efficiency analysis for the target gene (*hsp70*) and the reference gene ( $\beta$ -*actin*).

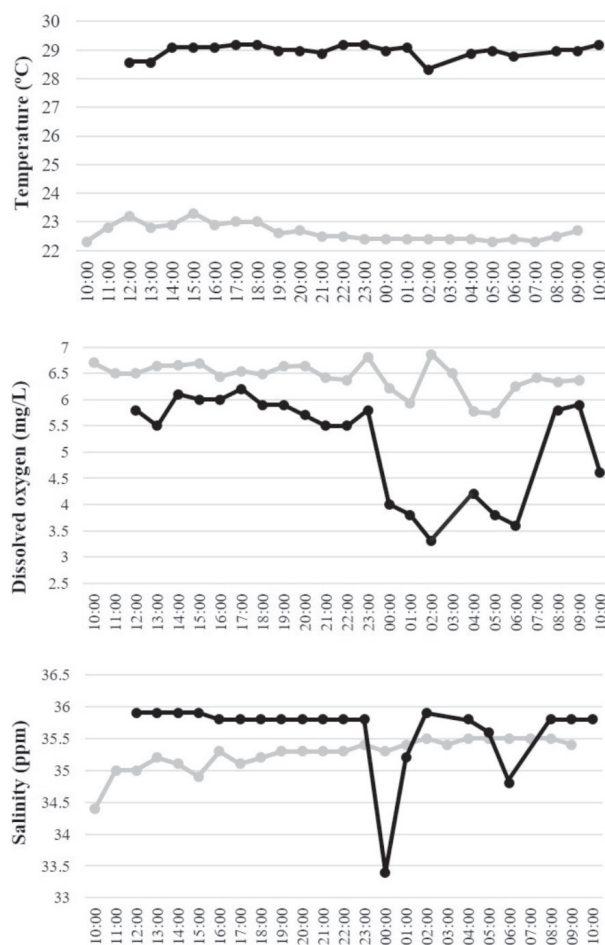
**Tabla 1.** Análisis de eficiencia para el gen de interés (*hsp70*) y el gen de referencia ( $\beta$ -*actin*).

Gene	Slove	R <sup>2</sup>	Efficiency	Percent
<i>Hsp70</i>	-2.33	0.97	2.68	168.15
$\beta$ - <i>actin</i>	-2.68	0.99	2.36	136.00



**Figure 1.** Abundance of *Lythrypnus dalli* during a diel cycle, in two seasons: warm (October 2017) and cold (April 2018) at Punta Diablo, La Paz, Baja California Sur, Mexico.

**Figura 1.** Abundancia de *Lythrypnus dalli* durante el ciclo diurno a diel cycle, en dos estaciones: cálida (Octubre 2017) y fría (Abril 2018) en Punta Diablo, La Paz, Baja California Sur, México.



**Figure 2.** Physical parameters during the sampling diel cycle, in a warm (October 2017; black line) and cold season (April 2018; gray line) at Punta Diablo, La Paz, Baja California Sur, Mexico.

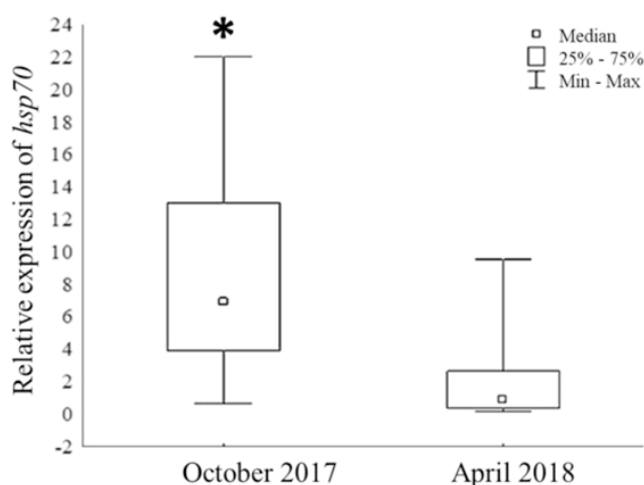
**Figura 2.** Parámetros físicos a lo largo del día de muestreo en la temporada cálida (Octubre 2017; línea negra) y temporada fría (Abril 2018; línea gris) en Punta Diablo, La Paz, Baja California Sur, México.

differed by 6.35 °C between seasons, it was higher in October compared to April, with an average recorded value of 28.98 ± 0.23 °C in October and 22.3 ± 0.30 °C in April (cold season). Salinity was lower in October (35.62 ± 0.57 ppt) than in April (35.26 ± 0.26 ppt). Dissolved oxygen concentration was higher in April (6.43 ± 0.29 mg L<sup>-1</sup>) compared to October (5.19 ± 0.98 mg L<sup>-1</sup>).

During the diel cycle, no significant changes were recorded in these parameters in both seasons. Water temperature changed by 1 °C during a 24-hour period in both seasons, from 28.3 to 29.2 °C in October (warm season) and 22.3 to 23.3 °C in April (cold season). Salinity ranged from 33.4 to 35.9 ppt in October, and from 34.9 to 35.5 ppt in April. Dissolved oxygen concentration ranged from 3.3 to 6.2 mg L<sup>-1</sup> in October, and from 5.74 to 6.86 mg L<sup>-1</sup> in April.

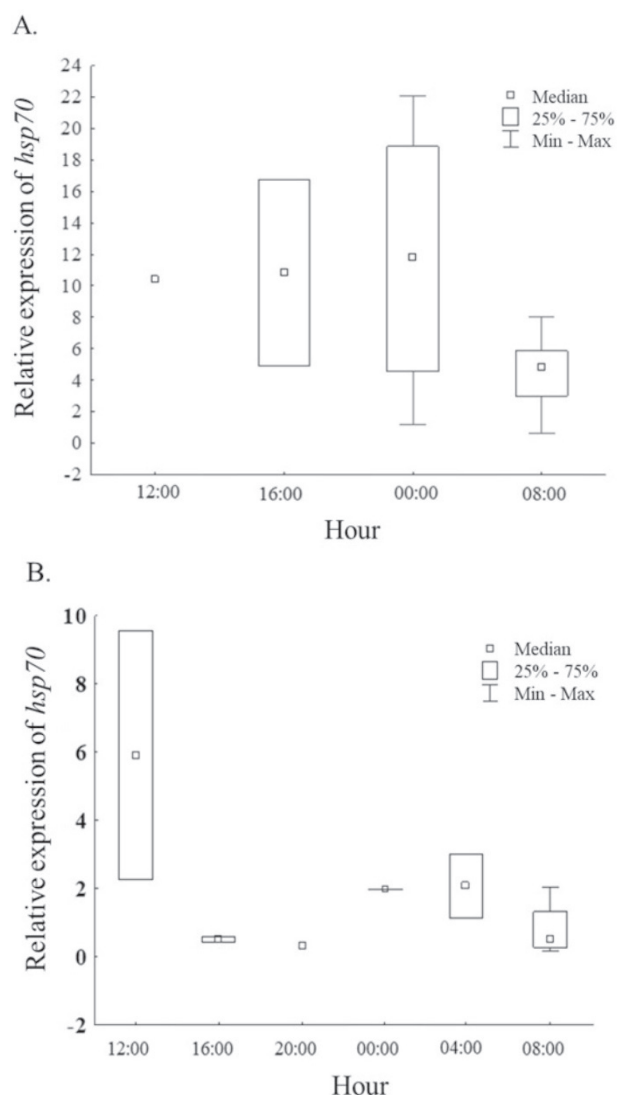
### Comparison of *hsp70* gene expression between seasons and daytime

Real time PCR analysis was done using cDNA template generated from 47 organisms. *Hsp70* expression level was measured in each individual specimen; however, only 25 samples amplified during the qPCR analysis. The results of the relative *hsp70* expression levels were normalized to that of the  $\beta$ -*actin* gene and were expressed as the median ± percentiles (25 - 75 %). Significant differences between seasons were revealed according to the Kruskal-Wallis test ( $H_{1,25} = 9.9526; p = 0.0016$ ). *Hsp70* gene expression was higher during October compared to April (Figure 3). The effect of the 24-hour period was also analyzed (Figure 4). No significant differences were observed during the diel cycle in October ( $H_{3,12} = 9.9526; p = 0.3910$ ) or April ( $H_{5,13} = 8.6703; p = 0.1230$ ).



**Figure 3.** Expression of *hsp70* gene between seasons in *Lythrypnus dalli* samples (n=25) obtained at Punta Diablo, La Paz, Baja California Sur, Mexico. \*  $p < 0.05$ .

**Figura 3.** Análisis de expresión de *hsp70* entre estaciones en muestras de *Lythrypnus dalli* (n=25) obtenidas en Punta Diablo, La Paz, Baja California Sur, México. \*  $p < 0.05$ .



**Figure 4.** Analysis of *hsp70* expression during a 24-hour period in A. warm (n=13) and B. cold season (n=12), in *Lythrypnus dalli* samples obtained at Punta Diablo, La Paz, Baja California Sur, Mexico. \*  $p < 0.05$ .

**Figura 4.** Análisis de expresión de *hsp70* durante un periodo de 24 horas en A. temporada cálida (n=13) y B. temporada fría (n=12), en muestras de *Lythrypnus dalli* obtenidas en Punta Diablo, La Paz, Baja California Sur, México. \*  $p < 0.05$ .

### DISCUSSION

Changes in the *hsp* genes expression in response to thermal variability, particularly *hsp70* has been a widely studied response in several fish species (Lund *et al.*, 2002; Podrabsky, 2004; Heredia-Middleton *et al.*, 2008; Yamashita *et al.*, 2010; Logan and Somero, 2011; Lewis *et al.*, 2016; Tunnah *et al.*, 2017; Hassan *et al.*, 2017). However, information about *hsp70* expression in response to thermal changes in the natural environment and the effect that temporality (diel, seasonal) has on the modulation of *hsp70* gene expression is scarce.

In the present study, the results showed that *hsp70* expression levels in *L. dalli* was significantly higher during October. It may be possible that *hsp70* is up-regulated in response to an increase in temperature during the warm season (< 6



°C). Similar results showing a higher *hsp70* expression during warm conditions has been previously reported in other fish species; *Epinephelus coioides* and *Sparus aurata* from the Suez Canal showed an up-regulation with increased water temperature during the hot season, when temperature increases from 19 to 24 °C (Guerrero *et al.*, 2018). In *Salmo salar*, a thermal increase from 20 °C in spring to 27 °C in summer induced *hsp70* expression (Lund *et al.*, 2002). The positive regulation of *hsp70*, as observed in *L. dalli*, may have a cytoprotective role as an acclimatization mechanism that allows organisms to face a seasonal temperature variability. This mechanism is critical for the maintenance of cellular functions, since the *hsp70* gene participates in folding thermally damaged proteins and preventing their cytotoxic aggregation (Feder and Hofmann, 1999). The mechanisms involved in detecting thermal changes and the consequent induction of gene expression, are not entirely clear. However, some studies suggest that the regulation of *hsp70* expression occurs primarily at the transcriptional level (Silver and Noble, 2012). In contrast, a different seasonal pattern in *hsp70* expression was observed in *Sparus aurata* from the Mediterranean (Feidantsis *et al.*, 2013). In this species, *hsp70* expression levels increased in early spring (March) when the lowest water temperatures were recorded (11 °C). Hassan *et al.* (2017) found no differences in *hsp70* expression levels between summer conditions in August (36 °C) and December (14 °C) in *Oreochromis niloticus* from Kaferelsheik, Egypt. The differences between these results and those reported in the present study suggest that thermal threshold for *hsps* gene expression depends on the temperature at which the organisms are acclimatized (Dietz, 1994; Buckley and Hofmann, 2002).

The effect of thermal variability may differ between species, and even populations, according to phenotypic tolerance and plasticity derived from acclimatization to the thermal conditions prevailing in their environment (Veilleux *et al.*, 2018). Some organisms that inhabit environments with high thermal variability have a greater capacity to modulate the expression levels of some *hsps*, including *hsp70* (Logan and Somero, 2011; Jesus *et al.*, 2013). In contrast, organisms that inhabit narrower thermal ranges (tropical or polar regions) tend to lack a thermal shock response when exposed to acute thermal changes (Hofmann, 2005; Veilleux *et al.*, 2018). Measurement of physical parameters suggest a marked seasonal variation in Punta Diablo, particularly in temperature. A minimum value of 22.3 °C was recorded in April and a maximum of 29.2 °C in October. This variability is similar to that reported by other authors in Bahía de La Paz (Bernal *et al.*, 2001; Martínez-López *et al.*, 2001; Martínez-Flores, 2007) whom, in addition, observed slightly higher temperatures from August to October (30 to 31 °C), and lower from January to March (21 to 24 °C). According to this information, the population of *L. dalli* that inhabits Punta Diablo should be facing a thermal variability within a range of up to 10 °C. It is possible that this population has developed tolerance and plasticity in their thermal response, which is reflected as the modulation of *hsp70* expression levels. Further studies are re-

quired to determine the relationship between the tolerance threshold temperature of *L. dalli* and the induction of *hsp70* gene expression.

In the present study, the variability in salinity at Punta Diablo was minimal (0.36 ppm). Obeso-Nieblas *et al.* (2004) reported that salinity remained homogeneous throughout the year and between years in Bahía de La Paz. Additionally, the seasonal variability in dissolved oxygen concentration was minimal (1.2 mg L<sup>-1</sup>). It is evident that the seasonality in the study area is marked by temperature, so this factor is suggested as the main modulator of the molecular response of *L. dalli*. Aquatic organisms are not only exposed to seasonal environmental variability, but also on a diel scale. Nonetheless, the response to these fluctuating conditions compared to constant conditions has been poorly studied. In the present study, no significant differences were observed in *hsp70* expression levels during a 24-hour period, in either of the two seasons (cold, warm) studied. The environmental variability to which aquatic organisms are exposed on a diel scale can also induce a response, which will potentially depend on the magnitude of the changes.

Diel fluctuations in Bahía de La Paz sea surface temperature differ according to the time of the year; during cold months temperature changes approximately 1 °C, while during the warm period this variation is up to 2 °C (Martínez-Flores, 2007). This is similar to what was recorded in the present study, the diel variation in Punta Diablo during the sampling days was around 1 °C in both seasons. Salinity remained stable; however, dissolved oxygen concentration showed a decrease from 6.2 to 3.3 mg L<sup>-1</sup> at 0:00 and 06:00 h, respectively. Hypoxia can occur when the level of dissolved oxygen falls below 2.0 mg L<sup>-1</sup> or less (Pollock *et al.*, 2007; Vaquer-Sunyer and Duarte, 2008). The variation in dissolved oxygen concentration observed in the present study may not have been enough to induce a *hsp70* response in *L. dalli* during a 24-hour period. In contrast, diel oscillations have been reported in the expression of *hsps* in other marine species. *Hsp70* expression has a marked daytime regulation in the anemone *Nematostella vectensis*, reaching higher expression levels at midnight (Oren *et al.*, 2015). Authors conclude that these organisms have circadian mechanisms that allow a thermal compensation response to changing environmental conditions. This response may enable organisms to prevent a series of physiological functions from changing with temperature. A circadian oscillation in *hsp70* and *hsp90* expression in the coral *Acropora millepora* were observed, with higher levels reported during the afternoon (16:00 hours); these pattern was attributed to a potential oxidative stress defense, as a result of the coral symbiotes photosynthesis (Levy *et al.*, 2011). However, previous studies show diurnal oscillations in the expression of *hsps* genes, which may depend on the magnitude, duration and type of stressors that organisms experience in their natural habitat. It is unclear if this gene modulation is an anticipated response to constant acute environmental changes; more evidence is necessary to clarify the underlying mechanisms.

Different mechanisms for coping with environmental variability have been analyzed to understand lethal and sublethal stress and the differences in the response capacity between species (Evans and Hofmann, 2012). However, the results suggest that organisms have an optimal physiological response within a limited range in environmental conditions, and thresholds in which physiological performance is compromised. This type of data is important to assess how vulnerable organisms are to climate change and, therefore, useful in the context of conservation (Hoey *et al.*, 2016; Illing and Rummer, 2017).

Tropical oceans are expected to increase their temperature by ~3 °C by the end of the century, which represents a challenge for all reef organisms, especially those at low latitudes (Rummer *et al.*, 2014). It has been suggested that marine organisms could show three possible responses to the environmental conditions projected for the future. First, they could disperse to better conditions (migration); second, organisms could adapt to new environmental conditions over time through genetic change (adaptation); and third, they could modify their phenotype to the predicted new conditions (phenotypic plasticity) (Evans and Hofmann, 2012; Harborne, 2013). While larger or conspicuous fish may disperse to more favorable conditions, the limited dispersal capacity of cryptic fishes makes them particularly susceptible to these changes (Munday *et al.*, 2017; Brandl *et al.*, 2018). Instead, it is possible that these organisms modulate their phenotype and improve their acclimatization capacity. Since information about the physiological and molecular responses of cryptic fish is scarce, further studies are required to elucidate acclimatization capacity, the mechanisms involved and the tolerance ranges at different time-space scales in this group of fishes.

## CONCLUSION

This study suggests a seasonal pattern in *hsp70* gene expression in the cryptic reef fish, *L. dalli*. Apparently, temperature is the main factor that modulates the *hsp70* expression, as this factor showed a marked difference between seasons (~6 °C). As a result, *hsp70* expression levels were higher during the warm season when average temperature was 28.98 °C. The minimal variation in physical parameters during the 24-hour period may not be enough to induce a *hsp70* response, as there were no differences in this gene's expression during the diel cycle. According to these results, no "trained" circadian pattern in *hsp70* expression was observed in *L. dalli*, as reported for other species. The limited dispersal capacity of this species and the effective molecular response to the marked seasonal variability in its habitat, suggest a possible phenotypic modulation that may allow it to cope with changing environmental conditions. More information about this species' physiological limits would be important for predicting its responses to future ocean changes.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank S. El Khatoggi, C. Mac Loughlin, R. Arroyo and L. Custodio for helping in the collection of samples and Laboratorio de Genética Molecular

(CIBNOR) for technical assistance in analyzing samples. This research was funded by CONACYT-Proyecto Ciencia Básica (CB-2015-257524) Genomic landscape in the marine environment: patterns of adaptive diversity. The collection permit was provided by the Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural PPF/DGOPA/-010/19. PCG is a recipient of a CONACYT scholarship (782604).

## LITERATURE CITED

- Bernal, G., Ripa, P., Herguera, J.C. 2001. Variabilidad Oceanográfica Y Climática En El Bajo Golfo De California: Influencias Del Trópico Y Pacífico Norte Oceanographic and Climatic Variability in the Lower Gulf of California: Links With the Tropics and North Pacific. *Ciencias Mar.* 27: 595-617.
- Brandl, S.J., Goatley, C.H.R., Bellwood, D.R., Tornabene, L. 2018. The hidden half: ecology and evolution of cryptobenthic fishes on coral reefs. *Biol. Rev.* 93: 1846-1873. doi:10.1111/brv.12423
- Buckley, B.A., Hofmann, G.E. 2002. Thermal acclimation changes DNA-binding activity of heat shock factor 1 (HSF1) in the goby *Gillichthys mirabilis*: implications for plasticity in the heat-shock response in natural populations. *J. Exp. Biol.* 205: 3231-40.
- Chomczynski, P., Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159. doi:10.1006/abio.1987.9999
- Culumber, Z.W., Shepard, D.B., Coleman, S.W., Rosenthal, G.G., Tobler, M. 2012. Physiological adaptation along environmental gradients and replicated hybrid zone structure in swordtails (Teleostei: Xiphophorus). *J. Evol. Biol.* 25: 1800-1814. doi:10.1111/j.1420-9101.2012.02562.x
- Dietz, T.J. 1994. Acclimation of the threshold induction temperatures for 70-kDa and 90-kDa heat shock proteins in the fish *Gillichthys mirabilis*. *J. Exp. Biol.* 188: 333-8.
- Evans, T.G., Hofmann, G.E. 2012. Defining the limits of physiological plasticity: how gene expression can assess and predict the consequences of ocean change. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 367: 1733-1745. doi:10.1098/rstb.2012.0019
- Feder, M.E., Hofmann, G.E. 1999. Heat shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu. Rev. Physiol.* 61: 243-282.
- Feidantsis, K., Antonopoulou, E., Lazou, A., Pörtner, H.O., Michaelidis, B. 2013. Seasonal variations of cellular stress response of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *J. Comp. Physiol. B* 183: 625-639. doi:10.1007/s00360-012-0735-y
- Guerrero, G., Bassem, S.M., Khalil, W.K.B., Temraz, T.A., Ciarcia, G., Gawad, F.K.A. 2018. Temperature changes and marine fish species (*Epinephelus coioides* and *Sparus aurata*): Role of oxidative stress biomarkers in toxicological food studies. *Emirates J. Food Agric.* 30: 205. doi:10.9755/ejfa.2018.v30.i3.1650
- Gunderson, A.R., Armstrong, E.J., Stillman, J.H. 2016. Multiple Stressors in a Changing World: The Need for an Improved Perspective on Physiological Responses to the Dynamic Marine Environment. *Ann. Rev. Mar. Sci.* 8: 357-378. doi:10.1146/annurev-marine-122414-033953

- Habary, A., Johansen, J.L., Nay, T.J., Steffensen, J.F., Rummer, J.L. 2016. Adapt, move or die - how will tropical coral reef fishes cope with ocean warming? *Glob. Chang. Biol.* 23: 566-577. doi:10.1111/gcb.13488
- Harborne, A.R. 2013. The ecology, behaviour and physiology of fishes on coral reef flats, and the potential impacts of climate change. *J. Fish Biol.* 83: 417-447. doi:10.1111/jfb.12203
- Hassan, A., El Nahas, A.F., Mahmoud, S., Barakat, M.E., Ammar, A.Y. 2017. Thermal stress of ambient temperature modulate expression of stress and immune-related genes and DNA fragmentation in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758)). *Appl. Ecol. Environ. Res.* 15: 1343-1354. doi:10.15666/aeer/1503\_13431354
- Heredia-Middleton, P., Brunelli, J., Drew, R.E., Thorgaard, G.H. 2008. Heat shock protein (HSP70) RNA expression differs among rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) clonal lines. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 149: 552-556. doi:10.1016/j.cbpb.2007.05.012
- Hoey, A., Howells, E., Johansen, J., Hobbs, J.-P., Messmer, V., McCowan, D., Wilson, S., Pratchett, M. 2016. Recent Advances in Understanding the Effects of Climate Change on Coral Reefs. *Diversity* 8: 12. doi:10.3390/d8020012
- Hofmann, G.E. 2005. Patterns of Hsp gene expression in ectothermic marine organisms on small to large biogeographic scales. *Integr. Comp. Biol.* 45: 247-255. doi:10.1093/icb/45.2.247
- Illing, B., Rummer, J.L. 2017. Physiology can contribute to better understanding, management, and conservation of coral reef fishes. *Conserv. Physiol.* 5: 1-11. doi:10.1093/conphys/cox005
- Jesus, T.F., Inácio, Â., Coelho, M.M. 2013. Different levels of *hsp70* and *hsc70* mRNA expression in Iberian fish exposed to distinct river conditions. *Genet. Mol. Biol.* 36: 061-069. doi:10.1590/S1415-4752013000100009
- Kwiatkowski, L., Gaylord, B., Hill, T., Hosfelt, J., Kroeker, K.J., Nebuchina, Y., Ninokawa, A., Russell, A.D., Rivest, E.B., Sesboué, M., Caldeira, K. 2016. Nighttime dissolution in a temperate coastal ocean ecosystem increases under acidification. *Nat. Publ. Gr.* 1-9. doi:10.1038/srep22984
- Levy, O., Kaniewska, P., Alon, S., Eisenberg, E., Karako-Lampert, S., Bay, L.K., Reef, R., Rodriguez-Lanetty, M., Miller, D.J., Hoegh-Guldberg, O. 2011. Complex Diel Cycles of Gene Expression in Coral-Algal Symbiosis. *Science* (80-). 331: 175-175. doi:10.1126/science.1196419
- Lewis, M., Götting, M., Anttila, K., Kanerva, M., Prokkola, J.M., Seppänen, E., Kolari, I., Nikinmaa, M. 2016. Different Relationship between *hsp70* mRNA and *hsp70* Levels in the Heat Shock Response of Two Salmonids with Dissimilar Temperature Preference. *Front. Physiol.* 7: 1-12. doi:10.3389/fphys.2016.00511
- Logan, C. A., Somero, G.N. 2011. Effects of thermal acclimation on transcriptional responses to acute heat stress in the eurythermal fish *Gillichthys mirabilis* (Cooper). *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 300: R1373-R1383. doi:10.1152/ajpregu.00689.2010
- Lund, S.G., Caissie, D., Cunjak, R.A., Vijayan, M.M., Tufts, B.L. 2002. The effects of environmental heat stress on heat-shock mRNA and protein expression in Miramichi Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 59: 1553-1562. doi:10.1139/f02-117
- Ma, F., Liu, Z., Huang, J. Q., Kang, Y. J., Wang, J. F. 2019. Evaluation of reference genes for quantitative real-time PCR analysis of messenger RNAs and microRNAs in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* under heat stress. *Journal of Fish Biology.* 95(2): 540-554 doi:10.1111/jfb.13986
- Madeira, D., Narciso, L., Cabral, H.N., Vinagre, C., Diniz, M.S. 2012. HSP70 production patterns in coastal and estuarine organisms facing increasing temperatures. *J. Sea Res.* 73: 137-147. doi:10.1016/j.seares.2012.07.003
- Martínez-Flores, G. 2007. Caracterización de la temperatura superficial del mar y climatología de la Bahía de La Paz, B.C.S., México 21: 81-91.
- Martínez-López, A., Cervantes-Duarte, R., Reyes-Salinas, A., Valdez-Holguín, J.E. 2001. Cambio estacional de clorofila a en la Bahía de La Paz, BCS, Mexico. *Hidrobiológica.* 11 (1): 45-52. ISSN 0188-8897
- Munday, P.L., Donelson, J.M., Domingos, J.A. 2017. Potential for adaptation to climate change in a coral reef fish. *Glob. Chang. Biol.* 23: 307-317. doi:10.1111/gcb.13419
- Nascimento, A.R., Silva, G.F., Gualberto, G.F., Almeida, F.L. 2016. Validation of reference genes for real-time quantitative PCR in tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Genetics and Molecular Research.* 15 (4): gmr15049228. doi: 10.4238/gmr15049228
- Obeso-Nieblas, M., Shirasago, B., Sánchez-Velasco, L., Gaviño-Rodríguez, J.H. 2004. Hydrographic variability in Bahía De La Paz, B. C. S, Mexico, during the 1997–1998 El Niño. *Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* 51: 689-710. doi:10.1016/j.dsr2.2004.05.005
- Oren, M., Tarrant, A.M., Alon, S., Simon-Blecher, N., Elbaz, I., Appelbaum, L., Levy, O. 2015. Profiling molecular and behavioral circadian rhythms in the non-symbiotic sea anemone *Nematostella vectensis*. *Sci. Rep.* 5: 11418. doi:10.1038/srep11418
- Pfaffl, M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in realtime RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29: e45. doi: 10.1093/nar/29.9.e45.
- Podrabsky, J.E. 2004. Changes in gene expression associated with acclimation to constant temperatures and fluctuating daily temperatures in an annual killifish *Austrofundulus limnaeus*. *J. Exp. Biol.* 207: 2237-2254. doi:10.1242/jeb.01016
- Pollock, M.S., Clarke, L.M.J., Dubé, M.G. 2007. The effects of hypoxia on fishes: from ecological relevance to physiological effects. *Environ. Rev.* 15: 1-14. doi:10.1139/a06-006
- Purohit, G. K., Mahanty, A., Mohanty, B. P., Mohanty, S. 2015. Evaluation of housekeeping genes as references for quantitative real-time PCR analysis of gene expression in the murrel *Channa striatus* under high-temperature stress. *Fish Physiology and Biochemistry*, 42(1): 125–135. doi:10.1007/s10695-015-0123-0
- Rummer, J.L., Couturier, C.S., Stecyk, J.A.W., Gardiner, N.M., Kinch, J.P., Nilsson, G.E., Munday, P.L. 2014. Life on the edge: thermal optima for aerobic scope of equatorial reef fishes are close to current day temperatures. *Glob. Chang. Biol.* 20: 1055-1066. doi:10.1111/gcb.12455
- Silver, J.T., Noble, E.G. 2012. Regulation of survival gene *hsp70*. *Cell Stress Chaperones* 17: 1-9. doi:10.1007/s12192-011-0290-6
- Tine, M. 2017. Evidence of the Complexity of Gene Expression Analysis in Fish Wild Populations. *Int. J. Genomics* 2017: 1-14. doi:10.1155/2017/1258396

- Tomanek, L. 2010. Variation in the heat shock response and its implication for predicting the effect of global climate change on species' biogeographical distribution ranges and metabolic costs. *J. Exp. Biol.* 213: 971-979. doi:10.1242/jeb.038034
- Tunnah, L., Currie, S., MacCormack, T.J. 2017. Do prior diel thermal cycles influence the physiological response of Atlantic salmon (*Salmo salar*) to subsequent heat stress? *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 74: 127-139. doi:10.1139/cjfas-2016-0157
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M., Rozen, S.G. 2012. Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 40, e115-e115. doi:10.1093/nar/gks596
- Vaquer-Sunyer, R., Duarte, C.M. 2008. Thresholds of hypoxia for marine biodiversity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105: 15452-15457. doi:10.1073/pnas.0803833105
- Veilleux, H.D., Ryu, T., Donelson, J.M., Ravasi, T., Munday, P.L. 2018. Molecular Response to Extreme Summer Temperatures Differs Between Two Genetically Differentiated Populations of a Coral Reef Fish. *Front. Mar. Sci.* 5: 1-12. doi:10.3389/fmars.2018.00349
- Vera, L.M., Negrini, P., Zagatti, C., Frigato, E., Sánchez-Vázquez, F.J., Bertolucci, C. 2013. Light and feeding entrainment of the molecular circadian clock in a marine teleost (*Sparus aurata*). *Chronobiol. Int.* 30: 649-61. doi:10.3109/07420528.2013.775143
- Yamashita, M., Yabu, T., Ojima, N. 2010. Stress Protein HSP70 in Fish. *Aqua-BioScience Monogr.* 3: 111-141. doi:10.5047/absm.2010.00304.0111





# Efecto del nopal (*Opuntia* spp) deshidratado en polvo sobre las propiedades fisicoquímicas y sensoriales de salchichas Viena

Effect of dehydrated nopal (*Opuntia* spp) powder on physicochemical and sensory properties of Vienna sausages

Lizbeth Malleli Diego-Zarate<sup>1</sup>, Gerardo Méndez-Zamora<sup>2</sup>, Jocelyn Abigail Rivera-De Alba<sup>3</sup>, Emmanuel Flores-Girón<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Ingeniería Agroindustrial, Carr. Federal México-Texcoco km 38.5, CP. 56230, Texcoco, Estado de México, México.

<sup>2</sup> Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Agronomía, Francisco Villa s/n, Ex-Hacienda El Canadá, 66050, General Escobedo, Nuevo León, México.

<sup>3</sup> Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, Instituto Politécnico Nacional, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, Instituto Politécnico Nacional, Av. Cuadrante s/n, Col. La Laguna Ticomán, 07340 G.A.M Ciudad de México, México.

## RESUMEN

Los cladodios de nopal (*Opuntia* spp) son estructuras vegetales con alto contenido de fibra dietaria, ingrediente clave para el actual desarrollo de alimentos cárnicos funcionales; sin embargo, su incorporación en productos emulsificados, como las salchichas, repercute en sus propiedades físicas, químicas y sensoriales. Por ello, en el presente trabajo se estudiaron los efectos de la adición de nopal deshidratado en polvo sobre la composición química, las pérdidas por cocción, la capacidad de retención de agua, el color, el perfil de textura y los atributos sensoriales de salchichas Viena en concentraciones de 0 % (TNOP0), 2 % (TNOP2), 4 % (TNOP4) y 6 % (TNOP6). La incorporación de este ingrediente redujo el contenido de grasa al aumentar el contenido de fibra cruda, a la vez que afectó su apariencia disminuyendo su luminosidad y color rojo e incrementado el amarillo. La pérdida por cocción y la capacidad de retención de agua no se vieron afectadas, pero sí el perfil de textura cuando el nivel de incorporación fue del 6 %; mientras que, más del 4 % disminuyó la aceptabilidad global y por atributo. Una adición del 2 % de harina de nopal puede emplearse en el desarrollo de productos cárnicos funcionales emulsificados.

**Palabras clave:** Pastas cárnicas, fibra dietética, textura, color.

## ABSTRACT

Nopal cladodes (*Opuntia* spp) are vegetal structures with high dietary fiber content, a key ingredient for the current development of functional meat foods; nevertheless, its addition in emulsified products, like sausages, affects its physical, chemical and sensory properties. Thus, in the present work the effects of the inclusion of dehydrated nopal powder in chemical composition, cooking losses, water holding capacity, texture profile and sensory attributes of Vienna sausages were analyzed at concentrations of 0 % (TNOP0), 2 % (TNOP2), 4 % (TNOP4) and 6 % (TNOP6). The incorporation of this ingredient reduced fat content by increasing crude fiber, at the same time that affected appearance by decreasing luminosity and red color and enhancing yellow. The cooking loss and water holding capacity were not affected, but yes texture profile when the addition level was 6 %; while more

than 4 % reduced global and by attribute acceptance. The addition of 2 % nopal flour is feasible in emulsified functional meat products development.

**Keywords:** Meat batters, dietary fiber, texture, color.

## INTRODUCCIÓN

Frecuentemente, los productos cárnicos son señalados por causar enfermedades cardiovasculares, algunos tipos de cáncer y obesidad, debido a su contenido de grasa saturada y colesterol (Ospina-Meneses *et al.*, 2011). En las últimas décadas la industria alimentaria se ha preocupado por la formulación y desarrollo de nuevos productos que están dirigidos a aportar alternativas más saludables a aquellas personas que los consumen.

La fibra dietética es uno de los componentes más estudiados desde el punto de vista nutrimental. De acuerdo con su naturaleza, presenta numerosas características funcionales que incluyen la capacidad de retención de agua (CRA), lubricación, estabilidad de congelación/descongelación y modificación de la textura, por lo cual, la fibra es un extendedor, aglutinante y un ingrediente de reemplazo de grasa valioso en la fabricación de diversos productos alimenticios (Talukder, 2015). En el desarrollo de productos cárnicos, se han probado varias fuentes de fibra como avena, remolacha azucarera, soja, guisantes, psyllium, cáscara de tuna etc. en la formulación de hamburguesas y salchichas para mejorar su calidad nutricional, así como sus propiedades fisicoquímicas y sensoriales (Díaz-Vela *et al.*, 2017; Mehta *et al.*, 2015).

El nopal es una planta de la familia Cactaceae de los géneros *Opuntia* y *Nopalea* que se produce principalmente en zonas templadas, semiáridas y tropicales secas de México; diferentes partes de la planta son de interés para su industrialización, por ejemplo, el fruto (conocido como tuna) como parte comestible, y los cladodios para la obtención de fibras y la producción de harinas (Saenz *et al.*, 2006; Sánchez-Bell, 2006).

El nopal es una fuente importante de fibra dietética. Según su solubilidad en agua, la fibra se clasifica en soluble e insoluble; la primera la conforman mucílagos, gomas, pectinas y hemicelulosas, mientras que la insoluble es princi-

\*Autor para correspondencia: Emmanuel Flores Girón  
 Correo electrónico: efloresg@chapingo.mx

Recibido: 22 de septiembre de 2020

Aceptado: 25 de enero de 2021

palmente celulosa, lignina y una gran fracción de hemicelulosa (Saenz, 1997; Saenz *et al.*, 2012). Estas fracciones de fibra tienen efectos fisiológicos distintos: la fibra soluble se asocia con la reducción de los niveles de glucosa y de colesterol y la estabilización del vaciamiento gástrico; la fibra insoluble, por su parte, se relaciona con la capacidad de retención de agua (aumento del peso de las heces), el intercambio iónico, la absorción de ácidos biliares, minerales, vitaminas y otros, así como su interacción con la flora microbiana (Saenz *et al.*, 2006).

De acuerdo con Saenz *et al.* (2006) y Bautista-Justo *et al.* (2010), los cladodios, tallos o pencas del nopal son una fuente importante de fibra, mucílagos y calcio, tres componentes que son necesarios para integrar una dieta saludable. Además, Rocchetti *et al.* (2018) mencionaron que los cladodios de nopal poseen actividades antidiabéticas y antioxidantes, las cuales se han atribuido a cantidades significativas de polisacáridos, lignanos, flavonoles y ácidos fenólicos. Los cladodios también contienen ácido palmitelaídico (C16:1 trans-9), un ácido graso monoinsaturado que regula el metabolismo de los ácidos grasos para su aplicación en el control del peso (Kadegowda *et al.*, 2013; Aruwa *et al.*, 2018). Debido al potencial nutricional y funcional que la composición del nopal ostenta, el presente trabajo tuvo como objetivo estudiar los cambios en las características fisicoquímicas y sensoriales de salchichas Viena causados por la incorporación de nopal deshidratado en polvo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Como fuente de fibra para los diferentes tratamientos se utilizó nopal deshidratado en polvo (NOP) de la marca comercial *Natura Bio Foods*<sup>®</sup>. Se determinaron su contenido de humedad, proteína, extracto etéreo y cenizas con base en los métodos de la AOAC (1998), y su contenido de fibra cruda por el método de Van de Kamer y Van Ginkel (1952).

### Tratamientos y elaboración de la pasta cárnica tipo salchicha Viena

Se formularon cuatro tratamientos; TNOP0: testigo (sin nopal deshidratado en polvo), TNOP2: 2 % de nopal deshidratado en polvo, TNOP4: 4 % de nopal deshidratado en polvo, y TNOP6: 6 % de nopal deshidratado en polvo. La formulación utilizada para la elaboración de las salchichas se muestra en la Tabla 1. La elaboración de las salchichas se realizó de acuerdo con el proceso propuesto por Méndez-Zamora *et al.* (2015). Se empleó carne de res y de cerdo parcialmente congelada, misma que fue picada con una cortadora-picadora de carne (HOBART<sup>®</sup> cutter, Hobart Corporation, Modelo 84145, USA) por 3 min, mientras se incorporaban las sales de cura, el eritorbato y un tercio del hielo, lentamente. Después, se agregaron los polifosfatos y un tercio del hielo, y se siguió moliendo por 2 min. Luego, se incorporaron el nopal deshidratado en polvo junto con los condimentos y el proceso de formación de la pasta cárnica continuó por 3 min, cuidando que la temperatura no superara los 11 °C; se añadió la grasa de cerdo parcialmente congelada y se molió 2 min. Finalmen-

**Tabla 1.** Formulación de pastas cárnicas preparadas con nopal deshidratado en polvo.

**Table 1.** Formulation of meat batters prepared with dehydrated nopal powder.

Ingredientes (%)	Tratamientos <sup>1</sup>			
	TNOP0	TNOP2	TNOP4	TNOP6
Carne de res	39	39	39	39
Carne de cerdo	17	17	17	17
Lardo de cerdo	14	14	14	14
Hielo	30	30	30	30
Total	100	100	100	100
Condimentos	2.4	2.4	2.4	2.4
Sal	2.0	2.0	2.0	2.0
Fosfatos	0.39	0.39	0.39	0.39
Eritorbato de sodio	0.05	0.05	0.05	0.05
Glutamato monosódico	0.05	0.05	0.05	0.05
Almidón	5.92	5.92	5.92	5.92
Nopal deshidratado en polvo	0.00	2	4	6

<sup>1</sup> TNOP0: testigo (sin nopal deshidratado en polvo), TNOP2: 2 % de nopal deshidratado en polvo, TNOP4: 4 % de nopal deshidratado en polvo, TNOP6: 6 % de nopal deshidratado en polvo.

te, se añadieron el almidón y el resto del hielo prolongando la molienda 3 min más. Una vez obtenida la pasta cárnica fue embutida en funda de celulosa de 2 cm de diámetro con una embutidora vertical manual (eemb3, Bonne Concasse, México). Las salchichas fueron atadas manualmente con hilo cada 12 cm. Previo a la cocción, las salchichas se envolvieron con una película de polietileno; el tratamiento térmico, en baño de agua, terminó al alcanzar 70 °C en el centro de las salchichas. Posteriormente, las salchichas se enfriaron en un baño de agua y hielo a 4 °C por 20 min, se escurrieron por 10 min y se refrigeraron a 4 °C en bolsas de polietileno hasta su análisis. Los tratamientos se realizaron por triplicado, cada réplica representó un bloque, que fue la elaboración de los cuatro tratamientos en tiempos diferentes.

### Pérdida por cocción y capacidad de retención de agua (CRA)

Las pérdidas por cocción se evaluaron a las 24 h (día 0) a partir del peso de las salchichas cocidas menos el peso de las salchichas crudas, según lo recomendado por Silva-Vazquez *et al.* (2018). La CRA se evaluó en el día 7 mediante el método sugerido por Dzudie *et al.* (2005) y modificado por Méndez-Zamora *et al.* (2015); para lo cual, aproximadamente 0.3 g de muestra de salchicha se colocaron entre dos papeles filtro y estos, a su vez, entre dos placas de acrílico de 12 x 12 cm a las cuales se les aplicó una fuerza de compresión de 4 kg durante 20 min. Se consideró que, debido a la compresión, el agua libre migró desde la muestra hacia el papel y se calculó el % de agua libre y CRA con base en las ecuaciones 1 y 2.

$$\% \text{ de agua libre} = [(M_i - M_f) / M_i] * 100 \quad (1)$$

$$\text{CRA} = 100 - \% \text{ de agua libre} \quad (2)$$

Donde  $M_i$  es el peso inicial de la muestra y  $M_f$  el peso final.

### Análisis proximal de las salchichas

Al día 7, después de la elaboración de cada unidad experimental, se determinó su composición química me-

dante los procedimientos 950.46, 985.15, 992.15 y 920.153 de la AOAC (1998) para humedad, grasa, proteína y cenizas, respectivamente; y el contenido de fibra cruda por el método Van de Kamer y Van Ginkel (1952). Todas las evaluaciones se realizaron por triplicado.

#### Análisis de color

El color se evaluó directamente en la parte interna de las salchichas al día 7 después de la elaboración. Se utilizó un colorímetro Hunter Lab (Xe Plus, HunterLab, USA), calibrado con una placa blanca. Las lecturas se realizaron por triplicado para registrar los parámetros del sistema CIE ( $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ ). Adicionalmente, se calcularon el índice de color (IC), el ángulo de matiz o tono, el croma y el cambio total de color ( $\Delta E$ ), con base en lo propuesto por Mathias y Ah (2014) y Silva-Vazquez *et al.* (2018).

#### Análisis de perfil de textura instrumental (APT)

El APT se realizó al día 7 después de la elaboración de las salchichas utilizando un texturómetro TAST2i (Stable Micro Systems, UK) con una celda de 5 kg, y una sonda cilíndrica de aluminio P50 (50 mm de diámetro). Las salchichas fueron cortadas en cilindros de 15 mm de altura, y se realizaron cinco lecturas por cada tratamiento/réplica. Se emplearon las velocidades recomendadas por Zhao *et al.* (2018): 2 mm/s para pre-ensayo y ensayo, y 5 mm/s post-ensayo; una deformación de 40 % y dos ciclos de compresiones se llevaron a cabo en cada prueba. Los parámetros evaluados fueron dureza (N), cohesividad (adimensional), elasticidad (mm), gomosis (N) y masticabilidad (N mm) de acuerdo con Bourne (1978), Abbasi *et al.* (2019) y Zhao *et al.* (2018).

#### Evaluación sensorial

Se realizó una prueba afectiva con 90 panelistas semi entrenados, consumidores habituales de salchichas, para los tratamientos que presentaron mejores resultados en el análisis de perfil de textura: TNOP0, TNOP2 y TNOP4. Se empleó una escala hedónica de nueve puntos donde: 9 = me gusta extremadamente, y 1 = me disgusta extremadamente (Meilgaard *et al.*, 2006); se evaluó el nivel de agrado por atributo (apariencia, color, firmeza, sabor y sabor residual) y la aceptabilidad global. Se asignó un código de tres dígitos, diferente para cada muestra; cada panelista evaluó las tres muestras en orden aleatorio. Los datos obtenidos se analizaron mediante un diseño de bloques completamente al azar.

#### Análisis estadístico

Se empleó un arreglo de datos mediante un diseño de bloques completamente al azar y se realizó un ANOVA considerando como fuentes de variación a los tratamientos (% de nopal deshidratado en polvo) y a los bloques (lotes de carnes empleados y fecha de elaboración) en el modelo estadístico. Cuando existieron diferencias significativas la hipótesis nula fue rechazada ( $p < 0.05$ ) y se realizó la prueba estadística Tukey ( $\alpha = 0.05$ ) para la comparación de medias. El análisis de datos se realizó con Minitab® 17.1.0 (Minitab Inc. 2003) mediante el modelo lineal general.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El nopal deshidratado en polvo presentó un 92.5 % de sólidos, siendo carbohidratos 48.69 %, cenizas 19.14 %, proteínas 17.83 %, fibra cruda 14.31 % y grasas 0.03 %. Esta composición es similar a la reportada por Pimienta (1990) para nopales jóvenes con edades entre uno y dos años.

#### Pérdida por cocción y CRA

La pérdida por cocción es un parámetro importante en los alimentos tratados térmicamente, ya que indica el rendimiento en el proceso. Las pérdidas por cocción de los tratamientos oscilaron entre 0.6 y 1.7 %, sin obtener diferencias significativas entre tratamientos ( $p > 0.05$ ). Sin embargo, otros autores han demostrado que la incorporación de ingredientes como inulina y pectina pueden mejorar el rendimiento (Méndez-Zamora *et al.*, 2015) y, de acuerdo con Díaz-Vela *et al.* (2015), la incorporación de harina de cáscara de tuna puede mejorar el rendimiento en la elaboración de salchichas cocidas inoculadas con bacterias ácido-lácticas.

En este trabajo, la CRA fue similar ( $p > 0.05$ ) entre los tratamientos, obteniendo valores de 70.8 a 73.6 %. En otros estudios, Silva-Vazquez *et al.* (2018) y Méndez-Zamora *et al.* (2015) encontraron un aumento en la CRA al incorporar inulina y pectina; mientras que, Díaz-Vela *et al.* (2015) reportaron que la harina de cáscara de tuna brinda una mayor CRA en productos cárnicos debido a su contenido de fibra dietaria. Por otro lado, Hleap-Zapata *et al.* (2017) concluyeron que al reemplazar la harina de trigo por harina de quinua disminuye la CRA, lo que sugiere que la incorporación de ingredientes puede modificar la CRA del producto, aunque el comportamiento dependerá de la naturaleza del ingrediente añadido.

#### Análisis proximal

La composición general de los productos cárnicos puede cambiar con la incorporación de fibra. En la Tabla 2 se muestran los resultados del análisis proximal de los diferentes tratamientos. En la humedad no se obtuvieron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre tratamientos. A mayor incorporación de nopal deshidratado en polvo (TNOP0, TNOP2, TNOP4 y TNOP6) disminuyó el contenido de humedad. Este comportamiento también fue observado por Yadav *et al.* (2018), quienes señalaron que la disminución en el contenido de humedad de salchichas de pollo adicionadas con salvado de trigo y orujo de zanahoria seco se debe al reemplazo cuantitativo de la carne con fuentes de fibra dietética que contienen muy poca humedad (5.09 % a 9.47 %) en comparación con la carne.

Para los sólidos, el contenido de cenizas incrementó ( $p < 0.05$ ) a mayor incorporación de nopal deshidratado; lo que podría deberse a que este ingrediente tiene un alto contenido de cenizas (19.14 %), conformadas principalmente por minerales como el calcio y el fósforo, según señalan Bautista-Justo *et al.* (2010). Este incremento coincide con los resultados obtenidos por otros autores. Hleap-Zapata *et al.* (2017) encontraron un incremento en el contenido de cenizas de las



**Tabla 2.** Composición química de salchichas Viena incorporadas con diferentes niveles de nopal deshidratado en polvo.**Table 2.** Chemical composition of Vienna sausages added with different levels of dehydrated nopal powder.

Tratamientos <sup>1</sup>	Características (%)					
	Humedad	Cenizas	Proteína	Grasa	Fibra	CHOS
TNOP0	68.91 <sup>a</sup>	8.25 <sup>b</sup>	33.46 <sup>a</sup>	35.64 <sup>a</sup>	0.84 <sup>d</sup>	21.81 <sup>a</sup>
TNOP2	68.75 <sup>a</sup>	8.76 <sup>ab</sup>	33.09 <sup>a</sup>	33.60 <sup>ab</sup>	1.25 <sup>c</sup>	23.31 <sup>a</sup>
TNOP4	67.41 <sup>b</sup>	9.16 <sup>ab</sup>	31.39 <sup>a</sup>	32.86 <sup>b</sup>	1.68 <sup>b</sup>	24.91 <sup>a</sup>
TNOP6	66.58 <sup>b</sup>	9.37 <sup>a</sup>	30.89 <sup>a</sup>	31.94 <sup>b</sup>	1.92 <sup>a</sup>	25.88 <sup>a</sup>
valor <i>p</i>	0.001	0.044	0.366	0.005	0.000	0.161

<sup>1</sup> TNOP0: testigo (sin nopal deshidratado en polvo), TNOP2: 2 % de nopal deshidratado en polvo, TNOP4: 4 % de nopal deshidratado en polvo, TNOP6: 6 % de nopal deshidratado en polvo. Medias en la misma columna con superíndices diferentes son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ). Unidades experimentales por tratamiento ( $n = 9$ ).

salchichas incorporadas con harina de quinua, mientras que Méndez-Zamora *et al.* (2015) encontraron un aumento en las cenizas al incorporar inulina y pectina.

En el contenido de grasa se observó un descenso ( $p < 0.05$ ) a mayor contenido de nopal deshidratado, siendo TNOP6 (6 % nopal deshidratado en polvo) el tratamiento con menor contenido de grasa. Powell *et al.* (2019) también encontraron un descenso en el contenido de grasa de las salchichas al incorporar 1.0 % de fibra de cítricos. Este patrón es esperado considerando que los ingredientes incorporados como fuente de fibra son carentes de grasas.

El contenido de carbohidratos y proteínas de los distintos tratamientos no mostró diferencias significativas ( $p > 0.05$ ); no así en el contenido de fibra cruda, donde hubo diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre todos los tratamientos. El contenido de fibra cruda en las salchichas aumentó conforme aumentó el nivel de incorporación de nopal deshidratado (TNOP0, TNOP2, TNOP4 y TNOP6). El tratamiento TNOP6 mostró un contenido de fibra cruda promedio de 1.92 % mientras que el TNOP4 (4 % nopal deshidratado en polvo) obtuvo un promedio de 1.68 %, lo que podría mejorar el perfil nutricional de estos alimentos como ha sido señalado por Mehta *et al.* (2018), pues la incorporación de fibra generalmente reduce el contenido de grasa, aumenta la fracción de carbohidratos y fibra dietética, generando una nueva clase de productos cárnicos funcionales con mayores beneficios para la salud.

### Análisis de color

La Tabla 3 muestra los resultados obtenidos para los parámetros de color. La luminosidad ( $L^*$ ) tuvo cambios significativos ( $p < 0.05$ ) entre los diferentes tratamientos. Se observó un descenso de  $L^*$  a medida que se incrementó el porcentaje de nopal deshidratado; la luminosidad pasó de 57.19 a 51.82, indicando así un oscurecimiento que afectó la apariencia de las salchichas. Las medias de  $a^*$  no mostraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre tratamientos, pero se observó un ligero descenso a medida que incrementó

**Tabla 3.** Efecto de la incorporación de nopal deshidratado en el color de salchichas Viena.**Table 3.** Influence of dehydrated nopal powder addition on Vienna sausages color.

Tratamientos <sup>1</sup>	Variables de color <sup>2</sup>						
	$L^*$	$a^*$	$b^*$	Ángulo de matiz	Croma	$\Delta E$	IC
TNOP0	57.19 <sup>a</sup>	11.09 <sup>a</sup>	10.32 <sup>c</sup>	42.31 <sup>c</sup>	15.19 <sup>a</sup>	29.86 <sup>b</sup>	33.27 <sup>b</sup>
TNOP2	53.55 <sup>ab</sup>	11.26 <sup>a</sup>	12.05 <sup>bc</sup>	47.27 <sup>bc</sup>	16.57 <sup>a</sup>	33.70 <sup>ab</sup>	39.58 <sup>ab</sup>
TNOP4	52.49 <sup>b</sup>	10.69 <sup>a</sup>	13.11 <sup>ba</sup>	51.59 <sup>ab</sup>	17.03 <sup>a</sup>	34.80 <sup>a</sup>	42.5 <sup>a</sup>
TNOP6	51.82 <sup>b</sup>	9.44 <sup>a</sup>	14.73 <sup>a</sup>	57.68 <sup>a</sup>	17.55 <sup>a</sup>	35.57 <sup>a</sup>	45.56 <sup>a</sup>
valor <i>p</i>	0.01	0.383	0.001	0.002	0.226	0.015	0.013

<sup>1</sup> TNOP0: testigo (sin nopal deshidratado en polvo), TNOP2: 2 % de nopal deshidratado en polvo, TNOP4: 4 % de nopal deshidratado en polvo, TNOP6: 6 % de nopal deshidratado en polvo.

<sup>2</sup>  $L^*$ : luminosidad,  $a^*$ : tendencia al color rojo,  $b^*$ : tendencia al color amarillo,  $\Delta E$ : cambio total de color, IC: índice de coloración. Medias en la misma columna con superíndices diferentes son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ). Unidades experimentales por tratamiento ( $n = 9$ ).

el porcentaje de nopal deshidratado, lo que señala que los tratamientos con mayor contenido de nopal muestran una leve reducción del rojo. Las medias de  $b^*$  entre los diferentes tratamientos muestran diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), se observó un aumento en los valores de  $b^*$ , de 10.32 en el tratamiento testigo (TNOP0) a 14.73 en el tratamiento TNOP6, lo cual mostró que, al aumentar el contenido de nopal deshidratado, el color de las muestras se inclina hacia el amarillo.

En este estudio, los valores  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ , ángulo de matiz y croma indicaron que la adición de nopal deshidratado en polvo modifica el color de las salchichas posiblemente debido a la clorofila presente en los nopales. La clorofila es el pigmento responsable del característico color verde de las frutas y verduras, es altamente susceptible a la degradación durante el procesamiento, lo que resulta en cambios de color en los alimentos (Bautista *et al.*, 2016). Durante el proceso térmico el átomo de magnesio central del anillo de porfirina de la clorofila es reemplazado por dos átomos de hidrógeno para formar feofitina, que se acompaña de un cambio de color indeseable de verde brillante a marrón oliva. Dado que el color es una característica sensorial importante para determinar la aceptabilidad del producto, es de vital importancia para la industria alimentaria prevenir o al menos minimizar la degradación de la clorofila durante el procesamiento (Weemaes *et al.*, 1999). Respecto al ángulo de matiz se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos; el tratamiento con el ángulo de matiz menor fue TNOP0 mientras que el mayor fue TNOP6, mostrando que la incorporación de nopal deshidratado en polvo genera salchichas con coloraciones más cercanas hacia el amarillo que hacia el rojo.

Las medias de croma no mostraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre tratamientos, pero se observó un ligero incremento a medida que aumentó el porcentaje de nopal deshidratado. El aumento en los valores de croma indicó mayor saturación en los tratamientos que contienen nopal causando su oscurecimiento.



El cambio de color total ( $\Delta E$ ) presentó diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos. La incorporación de nopal deshidratado incrementó el  $\Delta E$  de las salchichas, mostrando que las diferencias de color son más evidentes a mayor nivel de incorporación de nopal (TNOP0-TNOP6). En cuanto al índice de color (IC) se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos; la incorporación de nopal aumentó significativamente este parámetro debido al alto contenido de pigmentos. El aumento en los valores del croma,  $\Delta E$  e IC coinciden con los datos reportados por Silva-Vazquez *et al.* (2018), no obstante, el ángulo de matiz difiere debido a que la inulina y pectina utilizados para el estudio eran de color blanco, mientras que el nopal tiene una coloración amarilla-verdosa, promoviendo que la coloración de las salchichas tienda hacia el color amarillo, con una disminución en el rojo y la saturación que provocaron su oscurecimiento, resultando en un posible impacto negativo para la aceptación del producto.

### Análisis de perfil de textura instrumental

Se encontraron cambios ( $p < 0.05$ ) en las propiedades texturales de las salchichas incorporadas con nopal deshidratado (Tabla 4). La dureza de los tratamientos aumentó a medida que se incorporó hasta un 4 % de nopal deshidratado (TNOP4). En cambio, el tratamiento con 6 % de nopal (TNOP6) mostró un descenso del 43 % respecto al tratamiento testigo (TNOP0). Otros estudios indicaron que incorporar fibras a la formulación de salchichas modifica sus propiedades texturales en función del tipo de fibra y porcentaje de incorporación. Por ejemplo, Flores *et al.* (2005) reportaron un incremento de dureza en las salchichas cuando incorporaron fibra de avena, pero una disminución cuando se incorporó más de 1 % de fibra de trigo. Diferentes autores han realizado estudios para evaluar el uso de diferentes fibras como reemplazante de ingredientes como la grasa y los fosfatos. Powell *et al.* (2019) evaluaron la adición de fibra de cítricos en salchichas Bologna como sustituto natural de fosfato de sodio (0.50, 0.75 y 1.0 %), y también encontraron un aumento en la dureza a mayor concentración de fibra. Zhao *et al.* (2018) coinciden en que, a mayor concentración de fibra de celulosa, la dureza se incrementa (testigo = 34.35 N, tratamiento con 1.2 % de fibra = 37.84 N); igualmente observaron que la adición de agua como reemplazo de grasa podría dar lugar a una textura más suave, provocando un descenso en la dureza de las salchichas con reducción de grasa y sin adición de fibra. La naturaleza de la fibra incorporada influye en los cambios texturales observados. Zhao *et al.* (2018) encontraron un aumento en la dureza de salchichas incorporadas con fibra de celulosa regenerada; esta fibra tiene la capacidad de gelificar formando redes tridimensionales que modifican las propiedades reológicas de la fase continua de la emulsión, esto depende de la cantidad de grasa que contenga el producto.

En el presente estudio la incorporación de nopal deshidratado hasta en un 4 % incrementó la dureza de las salchichas, posiblemente por el contenido de polisacáridos que gelifican con calor, como la hemicelulosa, aunque incorporar

**Tabla 4.** Efecto de la incorporación de nopal deshidratado sobre el perfil de textura instrumental (APT) de salchichas Viena.

**Table 4.** Effect of dehydrated nopal powder addition on Vienna sausages instrumental texture profile analysis (TPA).

Tratamientos <sup>1</sup>	Dureza (N)	Cohesividad	Elasticidad (mm)	Gomosidad (N)	Masticabilidad (N mm)
TNOP0	29.73 <sup>b</sup>	0.83 <sup>a</sup>	0.74 <sup>a</sup>	24.76 <sup>b</sup>	17.69 <sup>a</sup>
TNOP2	32.34 <sup>a</sup>	0.84 <sup>a</sup>	0.73 <sup>a</sup>	26.86 <sup>ab</sup>	18.83 <sup>a</sup>
TNOP4	34.13 <sup>a</sup>	0.80 <sup>a</sup>	0.71 <sup>a</sup>	27.63 <sup>a</sup>	18.36 <sup>a</sup>
TNOP6	16.84 <sup>c</sup>	0.65 <sup>b</sup>	0.70 <sup>a</sup>	12.18 <sup>c</sup>	7.73 <sup>b</sup>
valor <i>p</i>	0.000	0.000	0.146	0.000	0.000

<sup>1</sup> TNOP0: testigo (sin nopal deshidratado en polvo), TNOP2: 2 % de nopal deshidratado en polvo, TNOP4: 4 % de nopal deshidratado en polvo, TNOP6: 6 % de nopal deshidratado en polvo. Medias en la misma columna con superíndices diferentes son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ). Unidades experimentales por tratamiento (n) = 15.

un 6 % de nopal trajo consecuencias negativas para este parámetro. Esta observación coincide con el planteamiento de Flores *et al.* (2005) quienes sugieren que existe un punto de equilibrio entre los ingredientes en la pasta cárnica que permiten la incorporación de cierta cantidad de otro ingrediente.

La cohesividad de las salchichas disminuyó con la incorporación de nopal deshidratado, pero no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos TNOP0, TNOP2 y TNOP4. El tratamiento TNOP6 mostró el valor más bajo de cohesividad con diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) respecto a los demás tratamientos. Este patrón de pérdida de cohesividad ha sido reportado por Powell *et al.* (2019) al incorporar fibra de cítricos en salchicha Bologna de cerdo, y por Zhao *et al.* (2018) al adicionar fibra de celulosa regenerada en salchichas bajas en grasa. La elasticidad, definida como la capacidad que tiene una muestra deformada para recuperar su forma o longitud inicial después de que una fuerza ha impactado en ella (Torres *et al.*, 2015), no se vio afectada significativamente ( $p > 0.05$ ) por la incorporación de nopal deshidratado.

En el parámetro de gomosidad se observó un incremento para los tratamientos TNOP2, TNOP4 con respecto al testigo (TNOP0), aunque el tratamiento con mayor cantidad de nopal incorporado (TNOP6) mostró un descenso significativo ( $p < 0.05$ ). Para la masticabilidad no se encontraron diferencias significativas entre TNOP0, TNOP2 y TNOP4, pero sí con respecto de TNOP6 ( $p < 0.05$ ), que mostró una pérdida significativa en este parámetro.

Méndez-Zamora *et al.* (2015) encontraron, en salchichas Frankfurt, que la gomosidad y la masticabilidad fueron menores en los tratamientos con fibras dietéticas, lo cual podría atribuirse al contenido de grasa y a la alta capacidad de unión y retención de agua de las fibras dietéticas. Adicionalmente, Powell *et al.* (2019) y Zhao *et al.* (2018) reportaron un aumento en la gomosidad y la masticabilidad de las salchichas al incorporar 1.0 % de fibra de cítricos y 1.2 % de fibra de celulosa regenerada, posiblemente debido a que la fibra de celulosa es altamente viscosa y tiene la capacidad de formar geles, confiriendo una apariencia y textura muy similares

a la grasa. En el presente estudio, la pérdida de gomosis y masticabilidad en el tratamiento TNOP6 puede asociarse a la concentración y naturaleza de los polisacáridos presentes en el nopal deshidratado. La incorporación de 6 % de nopal deshidratado (TNOP6) afectó negativamente las propiedades texturales estudiadas, por lo que no fue considerado para la evaluación sensorial.

### Evaluación sensorial

En la Tabla 5 se puede observar que las medias de aceptabilidad para los atributos de apariencia, color, sabor residual y aceptabilidad global de TNOP0 y TNOP2 contra TNOP4 presentaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), mientras que entre TNOP0 y TNOP2 no existió diferencia significativa ( $p > 0.05$ ).

Se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre la aceptación del atributo de firmeza del tratamiento testigo (TNOP0) con respecto a los tratamientos incorporados con nopal deshidratado (TNOP2 y TNOP4), siendo el TNOP0 el más aceptado. Respecto al atributo sabor, se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los tres tratamientos; a medida que se incorporó mayor cantidad de nopal deshidratado, se observó un descenso en su aceptabilidad. Díaz-Vela *et al.* (2017) reportaron que la incorporación de harina de cáscara de tuna en salchichas modificó su color y, de acuerdo con la evaluación del panel, se percibieron más oscuras que el testigo; así mismo reportaron diferencias en la dureza y plasticidad.

**Tabla 5.** Evaluación sensorial de salchichas Viena incorporadas con nopal deshidratado en polvo.

**Table 5.** Sensory evaluation of Vienna sausages incorporated with dehydrated nopal powder.

Tratamiento <sup>1</sup>	Aceptabilidad por atributo					
	Apariencia	Color	Firmeza	Sabor	Sabor residual	Aceptabilidad global
TNOP0	6.31 <sup>a</sup>	6.41 <sup>a</sup>	6.70 <sup>a</sup>	6.63 <sup>a</sup>	6.17 <sup>a</sup>	6.29 <sup>a</sup>
TNOP2	6.16 <sup>a</sup>	6.11 <sup>a</sup>	6.13 <sup>b</sup>	5.86 <sup>b</sup>	5.76 <sup>a</sup>	6.01 <sup>a</sup>
TNOP4	5.48 <sup>b</sup>	5.27 <sup>b</sup>	5.98 <sup>b</sup>	4.83 <sup>c</sup>	4.96 <sup>b</sup>	5.04 <sup>b</sup>
valor <i>p</i>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

<sup>1</sup> TNOP0: testigo (sin nopal deshidratado en polvo), TNOP2: 2 % de nopal deshidratado en polvo, TNOP4: 4 % de nopal deshidratado en polvo. Medias en la misma columna con superíndices diferentes son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ). Unidades experimentales por tratamiento (n) = 90.

De forma general, la incorporación de nopal deshidratado provocó efectos negativos en la aceptabilidad por atributo y global de las salchichas. Sin embargo, los tratamientos TNOP0 y TNOP2 mostraron una aceptación similar, por parte de los panelistas, para los atributos de apariencia, color, sabor residual y aceptabilidad global.

### CONCLUSIONES

La incorporación de nopal deshidratado en la formulación de salchichas Viena disminuyó el contenido de grasa al aumentar el contenido de fibra cruda y generó una pérdida

de luminosidad e incremento del color amarillo, sin alterar los parámetros de pérdida por cocción y capacidad de retención de agua.

La adición de 6% de nopal deshidratado redujo la dureza, cohesividad y gomosis de las salchichas, mientras que más del 4% disminuyó la aceptabilidad global y por atributo. Es así que una adición del 2% de harina de nopal puede emplearse en el desarrollo de productos cárnicos emulsificados.

### REFERENCIAS

- Abbasi, E., Amiri Sarteshnizi, R., Ahmadi Gavlighi, H., Nikoo, M., Azizi, M. H. y Sadeghinejad, N. 2019. Effect of partial replacement of fat with added water and tragacanth gum (*Astragalus gossypinus* and *Astragalus compactus*) on the physicochemical, texture, oxidative stability, and sensory property of reduced fat emulsion type sausage. *Meat Science*. 147: 135-143.
- AOAC. 1998. Official methods of analysis of the AOAC International. 16th ed. Association of Official Analytical Chemistry International. Maryland, USA.
- Aruwa, C. E., Amoo, S. O. y Kudanga, T. 2018. *Opuntia* (Cactaceae) plant compounds, biological activities and prospects – A comprehensive review. *Food Research International*. 112: 328-344.
- Bautista, V., Núñez, A., Amaya, C., Báez, J., Espinoza, A., Rodríguez, A., Miranda, L., Castañeda, E. y Cárdena, M. 2016. Influencia del tipo y tiempo de cocción en la degradación de clorofila en hortalizas. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 1(1): 411-416.
- Bautista-Justo, M., Pineda-Torres, R.I., Camarena-Aguilar, E., Alanís-Guzmán, G., Da-Mota, V.M. y Barboza-Corona, J. E. 2010. El Nopal fresco como fuente de fibra y calcio en panqués. *Acta Universitaria*. 20: 11-17.
- Bourne, M. C. 1978. Texture profile analysis. *Food Technology*: 32: 62-67.
- Díaz-Vela, J., Totosaus, A. y Pérez-Chabela, M. L. 2015. Integration of Agroindustrial Co-Products as Functional Food Ingredients: Cactus Pear (*Opuntia ficus indica*) Flour and Pineapple (*Ananas comosus*) Peel Flour as Fiber Source in Cooked Sausages Inoculated with Lactic Acid Bacteria. *Journal of Food Processing and Preservation*. 39: 2630-2638.
- Díaz-Vela, J., Totosaus, A., Escalona-Buendía, H. B. y Pérez-Chabela, M. L. 2017. Influence of the fiber from agro-industrial co-products as functional food ingredient on the acceptance, neophobia and sensory characteristics of cooked sausages. *Journal of Food Science and Technology*. 54: 379-385.
- Dzudie, T., Scher, J. y Hardy, J. 2005. Effect of Fat Sources on the Physico-Chemical Nutritional and Textural Properties of Beef Sausages. *Journal of Food Technology*. 3: 220-225.
- Flores, A., Burciaga, A., Soriano, C., Alonso M. y Ramírez, P. Uso de fibra de avena y trigo en salchicha Viena evaluando nivel de agrado y perfil de textura. [Consultado 7 de noviembre 2019] 2005. Disponible en: <http://www.respyn.uanl.mx/especiales/2005/ee132005/documentos/CNA23.pdf>
- Hleap-Zapata, J., Portillo, M. y Vera, J. 2017. Evaluación fisicoquímica y sensorial de salchichas con inclusión de harina de quinua (*Chenopodium quinoa W.*). *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. 15, 61.

- Kadegowda, A. K. G., Burns, T. A., Miller, M. C. y Duckett, S. K. 2013. Cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid is endogenously synthesized from palmitelaidic (C16:1 trans-9) acid in bovine adipocytes1. *Journal of Animal Science*, 91: 1614-1623.
- Mathias, K. y Ah, K. 2014. El color en los alimentos un criterio de calidad medible. *Agro Sur*. 42: 40-46.
- Mehta, N., Ahlawat, S., Sharma, D. y Dabur, R. 2015. Novel trends in development of dietary fiber rich meat products-a critical review. *Journal of Food Science and Technology*. 52(2): 633-647.
- Mehta, N., Kumar, M., Kumar, P., Prakash-Malav, O., Kumar, A. y Kumar, D. 2018. Development of Dietary Fiber-Rich Meat Products: Technological Advancements and Functional Significance. En: *Bioactive Molecules in Food*. J.M. Mérillon y K. Ramawat (ed.), pp 763-795. Springer Cham, Suiza.
- Meilgaard, M., Civille, G. V. y Carr, T. B. 2006. Affective tests consumer tests and in-house panel acceptance tests. En: *Sensory evaluation techniques*. M. Meilgaard, G.V. Civille, y T.B. Carr (ed.), pp 307-360. CRC Press, USA.
- Méndez-Zamora, G., García-Macías, J. A., Santellano-Estrada, E., Chávez-Martínez, A., Durán-Meléndez, L. A., Silva-Vázquez, R. y Quintero-Ramos, A. 2015. Fat reduction in the formulation of frankfurter sausages using inulin and pectin. *Food Science and Technology (Campinas)*. 35: 25-31.
- Ospina-Meneses, S. M., Restrepo-Molina, D. A. y López-Vargas, J. H. 2011. Derivados cárnicos como alimentos funcionales. *Revista Lasallista de Investigación*. 8:163-172.
- Pimienta, E. 1990. El nopal tunero. Universidad de Guadalajara. Jalisco, México.
- Powell, M. J., Sebranek, J. G., Prusa, K. J. y Tarté, R. 2019. Evaluation of citrus fiber as a natural replacer of sodium phosphate in alternatively-cured all-pork Bologna sausage. *Meat Science*. 157, 107883.
- Rocchetti, G., Pellizzoni, M., Montesano, D. y Lucini, L. 2018. Italian *Opuntia ficus-indica* Cladodes as Rich Source of Bioactive Compounds with Health-Promoting Properties. *Foods*. 7(2), 24.
- Saenz, C. 1997. Cladodes: a Source of Dietary Fiber. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*. 2: 117-123.
- Saenz, C., Berger, H., Corrales, J., Galletti, L., García, V., Higuera, I., Mondragón, C., Rodríguez, A., Sepúlveda, E. y Varnero, M. 2006. Utilización Agroindustrial del nopal. *Boletín de Servicios Agrícolas de la FAO* 162. FAO-AGST y FAO-CACTUSNET, Roma.
- Saenz, C., Yoong, M., Figuerola, F., Chiffelle, I. y María Estevez, A. 2012. Cactus pear cladodes powders as a source of dietary fibre: purification and properties. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 63: 283-289.
- Sánchez-Bell, G. D. 2006. Al nopal no sólo hay que verlo cuando tiene tunas. *Cuadernos de nutrición*. 29: 62-65.
- Silva-Vazquez, R., Flores-Girón, E., Quintero-Ramos, A., Hume, M. E. y Mendez-Zamora, G. 2018. Effect of inulin and pectin on physicochemical characteristics and emulsion stability of meat batters. *CyTA - Journal of Food*. 16(1): 306-310.
- Talukder, S. 2015 Effect of Dietary Fiber on Properties and Acceptance of Meat Products: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 55(7): 1005-1011.
- Torres, J., Gonzalez-Morelo, K. y Acevedo-Correa, D. 2015. Análisis del Perfil de Textura en Frutas, Productos Cárnicos y Quesos. *Revista ReCiTelA*. 14: 63-75.
- Van De Kamer, J. H. y Van Ginkel, L. 1952. Rapid determination of crude fiber in cereals. *Cereal Chemistry*. 29: 23-25.
- Weemaes, C. A., Ooms, V., Van Loey, A. M. y Hendrickx, M. E. 1999. Kinetics of Chlorophyll Degradation and Color Loss in Heated Broccoli Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47(6): 2404-2409.
- Yadav, S., Pathera, A., Islam, R., Malik, A. y Sharma, D. 2018. Effect of wheat bran and dried carrot pomace addition on quality characteristics of chicken sausage. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 31(5): 729-737.
- Zhao, Y., Hou, Q., Zhuang, X., Wang, y Zhou, G. y Zhang, W. 2018. Effect of regenerated cellulose fiber on the physicochemical properties and sensory characteristics of fat-reduced emulsified sausage. *LWT-Food Science and Technology*. 97: 157-163.



## Mixing effect on prolamins solubility and rheological properties of corn dough during processing for tortilla production

Efecto del mezclado en la solubilidad de las prolaminas de maíz y en las propiedades reológicas de sus masas durante el procesamiento para la producción de tortilla

Leslie Denise Chaidez-Laguna<sup>a</sup>, Patricia Torres-Chávez<sup>a\*</sup>, Benjamín Ramírez-Wong<sup>a</sup>, Enrique Márquez-Ríos<sup>a</sup>, Alma Rosa Islas-Rubio<sup>b</sup>, Elizabeth Carvajal-Millán<sup>b</sup>, Jesús Enrique Gerardo-Rodríguez<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, Universidad de Sonora, Rosales y Blvd. Luis Encinas S/N. Centro, C.P. 83000, Hermosillo, Sonora, México.

<sup>b</sup> Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Carretera a La Victoria km 0.6, Hermosillo, Sonora, México, C.P. 83304.

### ABSTRACT

The study aims to investigate the effects of mixing on the protein solubility and secondary structure in corn dough during processing for tortilla production. To evaluate how mixing affects dough rheology, the storage moduli ( $G'$ ), loss moduli ( $G''$ ) and tangent of the phase angle ( $\tan \delta$ ) dependent on frequency and texture profile analysis (TPA) were determined. HPLC-SEC showed an increased proportion of soluble polymeric proteins (soluble high molecular weight species). FT-IR results revealed that mixing promotes an increase of the  $\beta$ -sheet structure and a reduction of  $\alpha$ -helix proportion, which suggests protein aggregation. Rheological data showed that the elastic prevailed over the viscous behavior ( $G' > G''$ ) in the corn dough, with a soft solid material and an ordered and stable structure. Mixing, an intermediate step for dough production had important effects in protein structure and dough rheological properties. The increased  $\tan \delta$  ( $G''/G'$ ) is consistent with an increased viscous character and polymers aggregation that was demonstrated in this case for proteins.

**Keywords:** Mixing, dough, corn protein, rheological properties

### RESUMEN

El estudio tiene como objetivo investigar los efectos del mezclado sobre la solubilidad de las proteínas del maíz y su estructura secundaria, en masas de maíz durante el procesamiento para la producción de tortillas. Para evaluar cómo el mezclado afecta la reología de la masa, se determinaron los módulos de almacenamiento ( $G'$ ), los módulos de pérdida ( $G''$ ) y el ángulo de fase ( $\tan \delta$ ) dependientes de la frecuencia y el perfil de textura (TPA). Los análisis cromatográficos (HPLC-SEC) mostraron una mayor proporción de proteínas poliméricas solubles (especies solubles de peso molecular alto). Los resultados de FT-IR revelaron que la mezcla promueve el aumento de la estructura de la hoja  $\beta$  y la reducción de la proporción de la hélice  $\alpha$ , lo que sugiere la agregación de las proteínas. Los datos reológicos mostraron que en las masas de maíz prevaleció el comportamiento elástico sobre el viscoso ( $G' > G''$ ), un material sólido, blando con una estructura ordenada y estable. El mezclado, un paso intermedio

para la producción de masa, tuvo efectos importantes en la estructura de la proteína y las propiedades reológicas de la masa, el aumento de  $\tan \delta$  es consistente con un mayor carácter viscoso y agregación de polímeros que se demostró en este caso para las proteínas.

**Palabras clave:** Mezclado, masa, proteínas, propiedades reológicas.

### INTRODUCTION

Nixtamalization consists of cooking whole corn in water and lime, followed by soaking, removal of the cooking liquor, washing the kernel, grinding the nixtamal, mixing the dough, and tortilla baking. The nixtamalized corn is milled with water to produce the dough. The corn dough moisture is an essential factor in tortillas production and must be approximately 50 – 58 g/100 g (Arámbula-Villa *et al.*, 2001). Each step is important, however mixing has relevant functions: blends the nixtamal and water, forming the dough with desirable textural characteristics, mainly cohesiveness and adhesiveness (Quintanar-Guzmán *et al.*, 2011) and also promotes the interaction and addition of components, including proteins (Chaidez-Laguna *et al.*, 2016). According to Zheng *et al.* (2000), mixing helps change conformational arrangements of the polymers in the system.

Dough is a complex system composed of starch polymers, endosperm parts, lipids, and proteins (Gomez *et al.*, 1987). Complex reactions and chemical interactions happen during dough preparation. The dough behavior relates on microstructure, spatial arrangements of the components, and types of bonds, which directly affects the rheological properties (Létang *et al.*, 1999).

Several studies on the nixtamalization process are available, some confirming that starch affects the rheological properties of products made from dough (Pflugfelder *et al.*, 1988; Campas-Baypoli *et al.*, 1999).

Zeins, prolamins of corn, compactly packed in the protein bodies, help form weak fibrous network during mixing in a gluten free dough. Nevertheless, it has been proposed that zeins, above its glass transition temperature ( $T_g$ ) are capable of forming a viscoelastic dough, in a model system (Lawton, 1992; Schober *et al.*, 2008).

\*Autor para correspondencia: Patricia Torres Chávez  
Correo electrónico: patricia.torres@unison.mx



In this context, an accurate understanding of corn prolamins behaviour during mixing is considered of great importance. The available scientific data is limited to the effects of corn prolamin during dough mixing in the nixtamalization process, and the contribution to the rheological properties and texture.

Dynamic rheology is a widely used tool to characterize the structure and polymer rheology (Ferry, 1980), including that of food properties, such as dough. It is used to measure food viscoelasticity, where basic descriptive components of the sample are the storage modulus ( $G'$ ), an indicator of materials elastic component; the loss modulus ( $G''$ ), an indicator of materials viscous component; and the  $\tan \delta$  ( $G''/G'$ ), the ratio of the viscous and elastic moduli of a material.

The rheological properties of corn dough was previously examined by Quintanar-Guzmán *et al.* (2011). They claim that the corn dough had a weak gel like viscoelastic behavior and that the storage modulus ( $G'$ ) was higher than the loss modulus ( $G''$ ). On the other hand, FT-IR spectroscopy is a suitable tool that can be used to make the structural analysis of liquid, semisolid, and solid proteins (Allain *et al.*, 1999).

The objective of this work was to investigate the effect of mixing in the corn protein solubility and its secondary structure, and to determine its contribution to dough rheology and textural properties.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

Commercial white corn and commercial lime (calcium hydroxide; purity ~ 91 % (cal pirámide) were acquired from local store. Acetonitrile, 1-propanol, trifluoroacetic acid (HPLC-grade) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

### Nixtamalization

Corn (4 kg) was cooked in 12 L of lime solution at 1 % (grain weight basis). Corn was cooked for 20 min at boiling temperature and steeped in the same cooking vessel for 14 h. The cooking solution or “nejayote” was discarded and the resulting nixtamal was washed two times with water, to remove brain and excess lime. Nixtamal was ground into dough with a final moisture content of 56.0 %, using a commercial stone grinder.

### Dough preparation

Fresh dough was made according to Ramírez-Wong *et al.* (1994), with slight modifications. The fresh dough was homogenized for 30 s, deionized water (125 mL/kg) was then incorporated and mixed (3 or 6 min) in a Hobart mixer, at room temperature. The samples were stored in plastic bags at  $40 \pm 1^\circ\text{C}$  for 30 min, in order to reduce starch retrogradation.

### Sample preparation before protein analysis

All samples were defatted according to Lending *et al.* (1988).

### Protein extraction and size exclusion high-resolution liquid chromatography (SE-HPLC)

The defatted samples were analyzed according to Bean *et al.* (1998), with several modifications. Flours (250 mg) were mixed with 1 mL of 50 % propanol. Samples were placed in a stirrer (Vortex Genie2, Scientific Industries, Bohemia, N. Y.) and vortexed continuously for 15 min. Samples were then centrifuged (Eppendorf AG, 5415 Hamburg) at  $8000 \times g$  for 5 min, and the supernatant was recovered. The supernatant was centrifuged at  $14000 \times g$  for 15 min and analyzed by size exclusion high-performance liquid chromatography (SEC-HPLC). The HPLC system consisted of an Agilent quaternary pump and a diode array detector (Model 1260, Agilent Technologies, Pittsburgh, PA, USA) with a Biosep-SEC-S 4000 column (Phenomenex, Torrance, CA). The mobile phase was acetonitrile-water (50:50 v/v) containing 0.1 % trifluoroacetic acid at a constant flow rate of  $0.8 \text{ mL min}^{-1}$ . The chromatographic profile was analyzed using Open Lab Software (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). SE-HPLC measurements were performed in triplicate.

### Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) analysis

Spectra of fresh, 3 and 6 mixing time were recorded on a Nicolet FT-IR spectrometer (Thermo Scientific Nicolet iS50-FTIR) equipped with a diamond attenuated total reflectance (ATR) cell with a  $45^\circ$  aperture angle, a liquid nitrogen-cooled MCTA detector, and OMNIC software. Samples signals were obtained at  $25^\circ\text{C}$  in transmission mode from 600 to  $4000 \text{ cm}^{-1}$  at  $4 \text{ cm}^{-1}$  resolution. Curve deconvolution, fitting, and peak assignment were done with PeakFit software (v4.11 Systat Software Inc., Point Richmond, CA) to quantify protein secondary structure ( $\alpha$ -helix at  $1652\text{--}1660 \text{ cm}^{-1}$  and  $\beta$ -sheet at  $1630\text{--}1679 \text{ cm}^{-1}$ ) (Barth and Zscherp, 2002) from the resolved spectra.

### Dough rheological properties

After mixing, samples were rested in plastic bags at  $40 \pm 1^\circ\text{C}$  for 30 min. The rheological properties of dough were studied with a dynamic mechanical spectrometer (Rheometrics Scientific, model RSF III. Piscataway, NJ, USA) equipped with parallel plates of 25 mm diameter and a chamber for temperature control (Platt-Lucero *et al.*, 2010). Approximately 2.5 g of dough was compressed between two plates separated by a gap of 2.5 mm. The parallel plates were covered with petroleum jelly to avoid moisture loss during the test.

The frequency sweep test was carried out using a software (RSI Orchestrator, Rheometrics Scientific). Storage modulus ( $G'$ ), the amount of energy that is stored, the loss modulus ( $G''$ ), the amount of energy dissipated in the material after deformation and tangent of the phase angle  $\tan \delta$  ( $G''/G'$ ) were quantified over the frequency range from 1.1 to  $100 \text{ rad/s}$ . The tests were carried out in triplicate.

### Dough texture profile analysis (TPA)

Texture profile analysis (TPA) was performed using a texturometer (Model TA-XT2, Surrey, UK) equipped with a 36

mm diameter cylinder probe according to AACC standard method 74-9 (AACC, 2000). A 3 g load cell was used at the speed of 1 mm s<sup>-1</sup>. The dough samples were cut in cylinder. The probe was moved down to 50 % of samples height, and then moved back up at the same speed, and this movement was repeated in a 10 s time interval. Parameters determined by this test include hardness, cohesiveness, adhesiveness, springiness, and chewiness were obtained using the texturometer software. The test was done with five replicates.

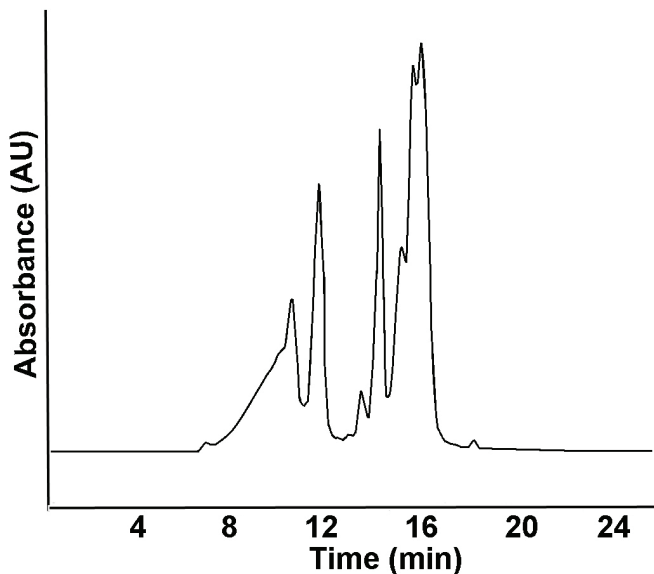
**Statistical analysis**

A completely randomized design was used. Data were statistically analyzed by a one-way ANOVA test with a significance level of 5 % (p<0.05). Significant differences among specific treatment means were defined using Tukey’s test. All statistical analyses were performed using XLSTAT (Addinsoft, 2015).

**RESULTS**

**Solubility studies**

Representative size exclusion chromatogram (SEC) of corn dough after the three mixing times is shown in Figure 1, with profiles similar to those reported by Chaidez-Laguna *et al.* (2016) for nixtamalized samples, and the area under the curve assessed the corn proteins relative solubility in 50 % propanol. Table 1 shows percentages of first peak (SPP) and soluble polymeric protein, and the area under the chromatographic curve (total area, all picks) of samples. The different soluble protein proportion of samples indicated solubility changes during the nixtamalization process. Statistical analyses showed significant differences (p < 0.05) in soluble



**Figure 1.** Representative size exclusion HPLC chromatogram of 50% 1-propanol soluble corn dough after 3 min of mixing time. The first peak, with a retention time of 11.6 min, corresponds to soluble polymeric proteins.

**Figura 1.** Cromatograma representativo de exclusión molecular (HPLC-SEC) de proteínas de maíz solubles en 50% propanol, después de tres minutos de mezclado. El primer pico, con un tiempo de retención de 11.6 min, corresponde a la proteína polimérica soluble (PPS).

**Table 1.** Soluble polymeric protein (SPP) and total soluble protein (TSP), assessed by the area under the HPLC-SEC chromatogram curve, of nixtamalized samples with different mixing times.

**Tabla 1.** Proteína polimérica soluble (SPP) y proteína soluble total (TSP), estimados por el área bajo la curva de los cromatogramas de muestras nixtamalizadas.

Samples	SPP (%)	TSP2 (AU x 109)
Maize	42.92 c	29.94 a
Nixtamal for 3 min	43.40 c	23.96 c
Nixtamal for 6 min	43.76 c	23.92 c
Fresh dough for 3 min	44.72 bc	24.96 c
Fresh dough for 6 min	44.47 bc	24.93 c
Dough 3 min mixing	48.97 a	26.40 b
Dough 6 min mixing	45.92 a	27.17 b
Tortilla for 3 min	32.03 d	12.30 e
Tortilla for 6 min	32.12 d	17.37 d

1 Means in the same columns with the same letter did not present significant differences (P<0.05). SPP, soluble polymeric protein, percent of soluble protein, area of the first peak.

2 TSP, Total soluble protein, sum of areas of all peaks of the chromatogram.

protein with the exception of corn and nixtamal. Results indicated that the higher percentage of soluble polymeric protein was in dough with 3 min of mixing time, but it was not significantly different to that in dough with 6 min of mixing.

In general, the mixing increased the soluble protein proportion, and the proportion of soluble polymeric fractions. On the other hand, tortilla baking reduced the solubility of corn proteins. These results indicate that dough mixing induced the break of noncovalent and covalent bonds, due the physical strain (MacRitchie, 1975).

**FT-IR spectras**

The deconvoluted FTIR spectras of the corn dough with 3 and 6 min of mixing time are shown in Figure 2. In order to establish a comparison between the structures, the selected spectra region was from 1700- 1600 cm<sup>-1</sup>, since this range relates to C- O interactions that constitutes amide I mode (Englander and Wand, 1987), while the amide I region is between 1600 – 1500 cm<sup>-1</sup>, associated with the N-H bending and C-N stretching modes (Curley *et al.*, 1998). For the purpose of the present study, only the region of the amide I was considered for the secondary structure analysis, since changes in amide II are less reliable due to overlapped region with amino acid side chain vibrations (Chirgadze and Nevskaya, 1976); in addition, it is considered more sensitive to dough hydration (Wellner *et al.*, 1996).

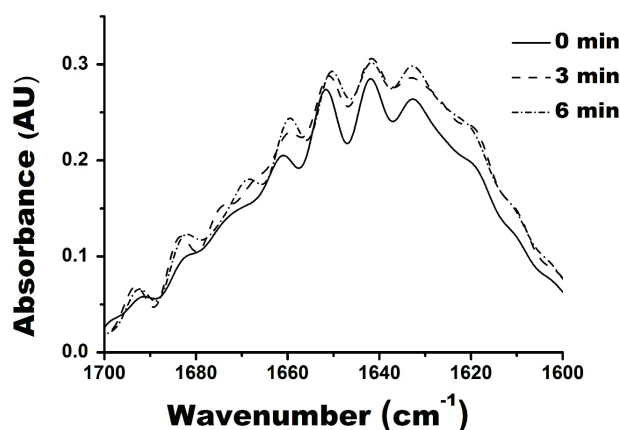
Structural analyzes show that the initial presence of α-helix in fresh dough was 34 %, observing a decrease after the mixing, to 28 % for 3 and 6 minutes. The content of the α-helix thus obtained is lower than those reported by Argos *et al.* (1982) and Forato *et al.* (2004), who propose that zeins

**Table 2.** Evaluation of texture properties (TPA), of corn dough after of 3 and 6 min mixing time.

**Table 2.** Evaluación de las propiedades de textura (TPA) de masas de maíz después de 3 y 6 min de mezclado.

Texture properties	Dough 3 min	Dough 6 min
Hardness (N)	1749.02 a	1410.34 b
Springiness	0.25 a	0.49 b
Adhesiveness	-28.89 a	-86.44 b
Cohesiveness	0.15 b	0.24 a
Chewiness	73.82 a	188.07 a

Each value indicates the average of five repetitions. Mean values followed by different letters for each attribute are significantly different ( $P < 0.05$ ).



**Figure 2.** Deconvoluted spectra of fresh dough, and doughs with 3 min and 6 min of mixing time.

**Figura 2.** Espectro deconvolucionado de masa fresca, masas con 3 min y 6 min de mezclado.

contain ~ 40 – 60 %  $\alpha$ -helix.

On the other hand, with respect to the fresh dough, it presented ~ 40.9 % of beta sheet structure, measured at 1633 y 16854  $\text{cm}^{-1}$  (Barth and Zscherp, 2002). It was evident that the mixing step increased the  $\beta$ -sheet structure content by 4.0 %, which suggests that the mixing favors its formation. The number of amide groups in the strands of the sheet affects the position of these bands, but it also depends on the number of strands (Barth and Zscherp, 2002). This is desirable because several authors propose that gluten-free dough functionality is largely dependent on the formation of  $\beta$ -sheet type secondary structure (Mejía *et al.*, 2007). However, it is necessary to control other factors such as the glass transition temperature ( $T_g$ ) of zeins, because these structural changes are unstable (Mejía *et al.*, 2007).

Structures found in the region of 1672  $\text{cm}^{-1}$ , denominated like turns structures (Barth and Zscherp, 2002), showed an increase of about 4.0 % after mixing, compared to fresh dough. Finally, the unordered structure measured at the band around 1654  $\text{cm}^{-1}$  (Barth and Zscherp, 2002) was stable after the mixing stage. A content of 17.15 % was found in fresh dough; and after 3 and 6 min of mixing, these proportions

changed to 17.33 and 15.83 %, respectively, suggesting that mixing did not greatly affect these structures.

Overall, the mixing of the dough promotes structural transition decreasing  $\alpha$ -helix and in turn, increasing the  $\beta$ -sheet structure. This has been previously reported by Mejía *et al.* (2007) who proposed that the mixture of zeins with water at a  $T_g$  of approximately 35 °C and at adequate levels of moisture, increases the  $\beta$ -sheet structure and the decrease of  $\alpha$ -helix. Now, it is necessary to consider that these  $\beta$ -sheet structure changes are reflected in the dough viscoelastic properties, existing several proposed theories to explain the behavior of zein dough. One of them, establishes that the viscoelastic properties of the dough of zeins are related to the formation of a  $\beta$ -sheet rich secondary structure, which has also been related to the elasticity characteristic of the gluten dough (Belton, 2005).

### Dough rheological properties

The rheological properties of corn dough with 3 or 6 min mixing time are presented in Figure 3 (A – C). Figures 3A and 3B show that storage ( $G'$ ) and loss moduli ( $G''$ ) in dough with 3 or 6 min of mixing increased with frequency, respectively. In addition, at high frequencies in both doughs, the distribution of the data was homogeneous. This effect on dough behavior might be attributed to the temperature control (41 °C) during analyses, which reduced starch retrogradation of corn dough samples. It is widely recognized that  $G'$  and  $G''$  are the most important determinations in rheological analysis, which are associated with the solid and liquid behavior in semi-solid dough (Ferry, 1980).

Both,  $G'$  and  $G''$  decreased in dough when the mixing time increased from 3 to 6 min (Figure 3, A and B). Furthermore,  $G'$  values were higher than  $G''$  values, indicating that, in all formed dough, predominating the elastic behavior. Platt-Lucero *et al.* (2010), Quintanar-Guzmán *et al.* (2011), and Santos *et al.* (2014) also reported similar results. These researchers proposed that corn dough with different treatments had a weak gel, and the viscoelastic behavior was that storage modulus ( $G'$ ) had higher values than those of the loss modulus ( $G''$ ). Nixtamalization produces a stabilization of the structure (Quintanar-Guzmán *et al.*, 2009), and it occurs because of the interaction of starch and proteins during the nixtamalization process. Results of rheological measurements of the present work suggest also an ordered and stable structure.

On the other hand, tangent of the phase angle ( $\text{Tan } \delta$ ) values of corn dough, were also higher at long than at short mixing time (Figure 3 C).  $\text{Tan } \delta$  increased steadily, as the frequency increased, which indicates that the dough structure became stronger, besides of presenting a solid type behavior (Ferry, 1980).

The rheological properties of corn dough show that mixing has important effect on elastic and viscous behavior. Additionally, this study showed the interaction of corn protein on viscoelastic properties of dough. The corn proteins

were polymerized through lime with protein-starch network, thus proving that the mixing plays a primordial role in the proteins characteristics and their relationship to viscoelastic properties (Santos *et al.*, 2015). Nevertheless, it has been reported that the rheological changes in corn dough are due to gelatinization reactions during traditional and extrusion nixtamalization (Enríquez-Castro *et al.*, 2020; Topete-Betan-court *et al.*, 2020.).

Figure 3 C shows the phase angle ( $\text{Tan } \delta$ ) values of corn dough at 3 and 6 min of mixing. It is observed that  $\text{Tan } \delta$  values were higher with 6 min than 3 min of mixing. At both mixing times,  $\text{Tan } \delta$  increased steadily with frequency, which indicates that the dough structure became stronger and presented a solid type behavior (Ferry, 1980). Values of  $\text{Tan } \delta$  were in the range of 0.1 to 0.3, which indicate that the elastic behaviour predominate over the viscous one.

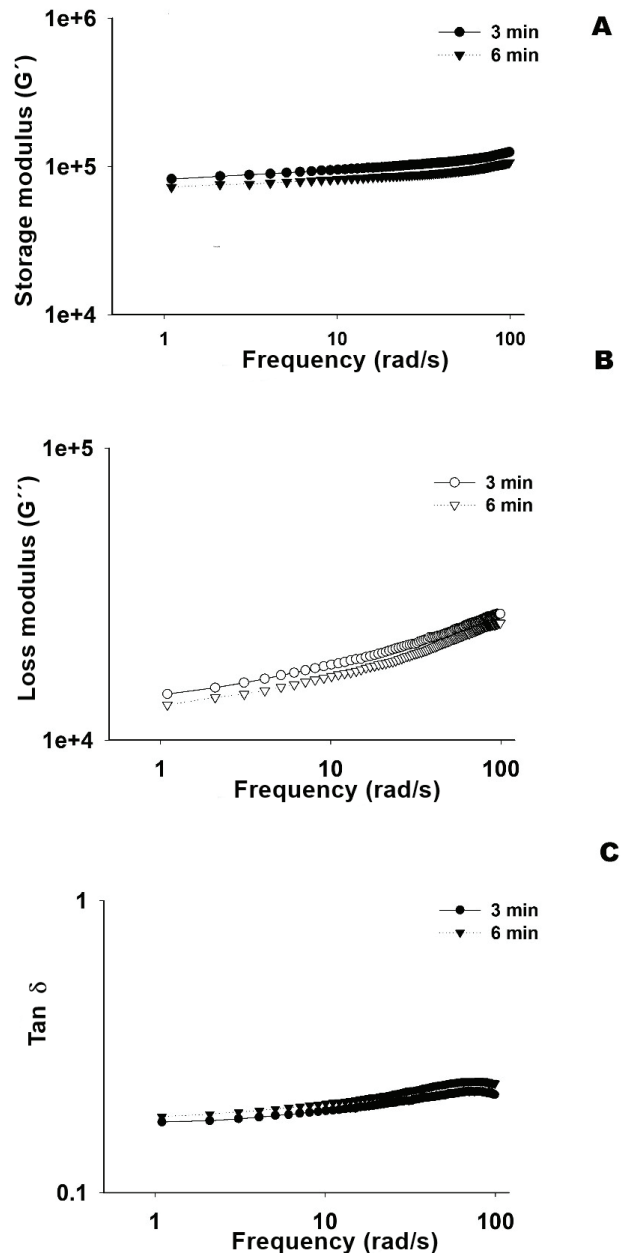
The rheological properties of corn dough show that mixing time has an important effect on elastic and viscous behavior. In addition, our study suggested the effect of the interaction of corn proteins on viscoelastic properties of the dough.

#### Dough texture profile analysis (TPA)

Table 3 summarizes the textural properties of the corn dough. The hardness is determined by the amount of force required by the teeth to compress the dough and, in a force-time curve, is designated as the maximum force necessary to achieve a deformation during the first compression cycle (Bourne *et al.*, 1978). On the other hand, adhesiveness is the force necessary to overcome the forces of attraction between the product surface and the material surface with which the product comes into contact. Both properties are among the main textural properties considered of the dough. The dough with different mixing time had significant statistical differences ( $p < 0.05$ ) for the different textural properties. The three-minute mixed dough, had higher hardness and elasticity values than those of the dough with six min, while this last showing higher adhesiveness values.

With respect to cohesiveness, defined as the strength of the internal bonds that make up the body of the product, we found that the dough with 6 min of mixing, obtained the highest cohesiveness values. In general, the dough with 3 minutes of mixing presented greater hardness and elasticity, but less cohesiveness. On the other hand, both doughs had no significant differences in the chewability characteristic. Research on corn dough with different cooking time and lime concentration, suggests that both variables have an effect on the adhesiveness of the dough, which increases directly proportional to the calcium content (Gracia-Amaya and Silva-Espinoza, 1992).

These differences in texture properties depend on the macrostructural behavior of the dough (Letang *et al.*, 1999); but they can also be attributed to the processing conditions. It is for this reason that the measurement of texture of the dough is an important analysis.



**Figure 3.** Effect of mixing time on viscoelasticity of the corn dough. A, storage moduli,  $G'$ ; B, loss moduli  $G''$ ; C, phase angle  $\text{Tan } \delta$  as a function of frequency.

**Figura 3.** Efecto del tiempo de mezclado en la viscoelasticidad de las masas. A., módulo de almacenamiento  $G'$ ; B, módulo de pérdida,  $G''$ ; C, ángulo de fase,  $\text{Tan } \delta$ , como una función de la frecuencia.

The tortilla texture depends on a number of factors, including the characteristics of the raw material as well as the baking conditions; besides, texture of the dough is critical during the process of making corn tortillas. When the dough has the proper texture, its adhesiveness and cohesiveness made dough to behave properly in the roll of the forming tortilla machine (Ramírez-Wong *et al.*, 1993).



## CONCLUSIONS

Mixing is a critical intermediate step during the nixtamalization process, in which, besides incorporating the nixtamal with water to obtain a homogeneous and maquinable dough to produce tortillas, also promotes significant changes. Among these, an increase in the proportion of the soluble polymer protein, as well as an increase in the secondary structure  $\beta$ -sheet. On the other hand, the mixing time affected the rheological and textural properties of the dough. The viscoelastic properties of corn dough showed that mixing has an important effect on elastic and viscous behavior. The dough were viscoelastic weak gel-like systems, with the elastic behavior prevailing over the viscous one.

## REFERENCES

- AACC. 2000. Approved Methods of Analysis, 11<sup>th</sup> ed. *American Association of Cereal Chemists*, St. Paul, MN, USA.
- Allain, A., Paquin, P. and Subirade, M. 1999. Relationships between conformation of  $\beta$ -lactoglobulin in solution and gel states as revealed by attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy. *International Journal of Biological Macromolecules*. 26: 337-344.
- Arámbula-Villa, G., Barrón-Ávila, L., González-Hernández, J., Moreno-Martínez, E. and Luna-Bárceñas, G. 2001. Efecto del tiempo de cocimiento y reposo del grano de maíz (*Zea mays* L.) nixtamalizado, sobre las características fisicoquímicas, reológicas, estructurales y texturales del grano, masa y tortillas de maíz. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 51: 187-194.
- Argos, P., Pedersen, K., Marks, M.D. and Larkins, B.A. 1982. A structural model for zein proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 257: 9984-9990.
- Barth, A. and Zscherp, C. 2002. What vibrations tell us about proteins. *Quarterly Reviews of Biophysics*. 35: 369-430.
- Bean, S.R., Lyne, R.K., Tilley, K.A., Chung, O.K. and Lookhart, G.L. 1998. A rapid method for quantitation of insoluble polymeric proteins in flour. *Cereal Chemistry*. 75: 374-379.
- Belton, P.S. 2005. New approaches to study the molecular basis of the mechanical properties of gluten. *Journal of Cereal Science*. 41: 203-211.
- Bourne, M.C., Kenny, J.F. and Barnard, J. 1978. Computer-assisted readout of data from texture profile curves. *Journal of Texture Studies*. 9: 481-494.
- Campus-Baypoli, O.N., Rosas-Burgos, E.C., Torres-Chávez, P.I., Ramírez-Wong, B. y Serna-Saldívar, S.O. 1999. Physicochemical Changes of Starch during Maize Tortilla Production. *Starch-Stärke*. 51: 173-177.
- Chaidez-Laguna, L.D., Torres-Chavez, P., Ramírez-Wong, B., Marquez-Ríos, E., Islas-Rubio, A.R. and Carvajal-Millan, E. 2016. Corn proteins solubility changes during extrusion and traditional nixtamalization for tortilla processing: A study using size exclusion chromatography. *Journal of Cereal Science*. 69: 351-357.
- Chirgadze, Y.N., Nevskaya, N.A. 1976. Infrared spectra and resonance interaction of amide I vibration of the antiparallel chain pleated sheet. *Biopolymers*. 15: 607-625.
- Curley, D.M., Kumosinski, T.F., Unruh, J.J. and Farrell, Jr. H.M. 1998. Changes in the secondary structure of bovine casein by Fourier transform infrared spectroscopy: Effects of calcium and temperature. *Journal of Dairy Science*. 81: 3154-3162.
- Englander, S.W. and Wand, A.J. 1987. Main-chain-directed strategy for the assignment of <sup>1</sup>H NMR spectra of proteins. *Biochemistry*. 26: 5953-5938.
- Enríquez-Castro, C. M., Torres-Chávez, P. I., Ramírez-Wong, B., Quintero-Ramos, A., Ledesma-Osuna, A. I., López-Cervantes, J. and Gerardo-Rodríguez, J. E. 2020. Physicochemical, rheological, and morphological characteristics of products from traditional and extrusion nixtamalization processes and their relation to starch. *International Journal of Food Science*. Article ID 5927670, DOI: 10.1155/2020/5927670.
- Ferry, J.D. 1980. *Viscoelastic Properties of Polymers*, John Wiley, New York.
- Forato, L.A., Doriguetto, A.C., Fischer, H., Mascarenhas, Y.P., Craievich, A.F. and Colnago, L.A. 2004. Conformation of the Z19 Prolamin by FTIR, NMR, and SAXS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52: 2382-2385.
- Gomez, M.H., Rooney, L.W., Waniska, R.D. and Pflugfelder, R. L. 1987. Dry corn masa flours for tortilla and snack processing. *Cereal Foods World*. 32: 372-377.
- Gracia-Amaya, R. and Silva-Espinoza, B.A. 1992. Estudio de Algunas Variables de Proceso de Producción de Tortilla de Maíz a Nivel Planta Piloto y de sus Efectos en la Textura de la Masa y la Tortilla. Tesis de Ingeniería Química. Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora, México.
- Quintanar-Guzmán, A., Jaramillo-Flores, M.E., Mora-Escobedo, R., Chel-Guerrero, L., Solorza-Feria, J. 2009. Changes on the structure, consistency, physicochemical and viscoelastic properties of corn (*Zea mays* sp.) under different nixtamalization conditions. *Carbohydrate Polymers*. 78: 908-916.
- Quintanar-Guzmán, A., Jaramillo-Flores, M.E., Solorza-Feria, J., Méndez-Montealvo, M.G., Wang, Y. J. 2011. Rheological and thermal properties of masa as related to changes in corn protein during nixtamalization. *Journal of Cereal Science*. 53: 139-147.
- Lawton, J.W. 2002. Zein: A history of processing and use. *Cereal Chemistry*. 79: 1-18.
- Lending, C.R., Kriz, A.L., Larkins, B.A. and Bracker, C.E. 1988. Structure of maize protein bodies and immunocytochemical localization of zeins. *Protoplasm*. 143: 51-62.
- Létang, C., Piau, M. and Verdier, C. 1999. Characterization of wheat flour-water doughs. Part I: Rheometry and microstructure. *Journal of Food Engineering*. 41: 121-132.
- MacRitchie, F. 1975. Mechanical degradation of gluten proteins during high-speed mixing of doughs. *Journal of Polymer Science Part C-Polymer Symposium*. 49: 85-90.
- Mejía, C.D., Mauer, L.J. and Hamaker, B.R. 2007. Similarities and differences in secondary structure of viscoelastic polymers of maize  $\alpha$ -zein and wheat gluten proteins. *Journal of Cereal Science*. 45: 353-359.
- Platt-Lucero, L.C., Ramírez-Wong B., Torres-Chávez, P.I., López-Cervantes, J. Sánchez-Machado, D.I., Reyes-Moreno, C., Milán-Carrillo, J. and Morales-Rosas. 2010. Improving textural characteristics of tortillas by adding gums during extrusion to obtain nixtamalized corn flour. *Journal of Texture Studies*. 41: 736-755.
- Pflugfelder, R. L., Rooney, L.W. and Waniska, R.D. 1988. Fractionation and Composition of commercial corn masa. *Cereal Chemistry*. 65: 262-266.

- Ramirez-Wong, B., Sweat, V., Torres, P. and Rooney, L.W. 1993. Development of two instrumental methods for corn masa texture evaluation. *Cereal Chemistry*. 70: 286-290.
- Ramírez-Wong, B., Sweat, V., Torres, P. and Rooney, L.W. 1994. Cooking time, grinding and moisture content effect on fresh corn masa texture. *Cereal Chemistry*. 71: 337-343.
- Santos, E.M., Quintanar-Guzman, A., Solorza-Feria, J., Sanchez-Ortega, I., Rodriguez, J.A. and Wang, Y. 2014. Thermal and rheological properties of masa from nixtamalized corn subjected to a sequential protein extraction. *Journal of Cereal Science*. 60: 490-496.
- Schober, T.J., Bean, S.R., Boyle, D.L. and Park, S. 2008. Improved viscoelastic zein–starch doughs for leavened gluten-free breads: Their rheology and microstructure. *Journal of Cereal Science*. 48: 755-767.
- Topete-Betancourt, A., Santiago-Ramos, D. and Figueroa-Cárdenas, J.D. 2020. Relaxation tests and textural properties of nixtamalized corn masa and their relationships with tortilla texture. *Food Bioscience* 33, 100500, DOI:10.1016/j.fbio.2019.100500.
- Wellner, N., Belton, P. Tatham, A. 1996. Fourier transform IR spectroscopic study of hydration-induced structure changes in the solid state of omega-gliadins. *Biochemical Journal*. 319: 741-747.
- Zheng, H., Morgenstern, M.P., Campanella, O.H. and Larsen, N.G. 2000. Rheological properties of dough during mechanical dough development. *Journal of Cereal Science*. 32: 293-306.



# Effect of the extruded amaranth flour addition on the nutritional, nutraceutical and sensory quality of tortillas produced from extruded creole blue maize flour

Efecto de la adición de harina de amaranto extruido sobre la calidad nutricional, nutraceutica y sensorial de tortillas producidas a partir de harina de maíz azul criollo extrudido

Laura Celeste Gámez-Valdez<sup>1</sup>, Roberto Gutiérrez-Dorado<sup>1</sup>, Carlos Alberto Gómez-Aldapa<sup>2</sup>, Janitzio Xiomara Korina Perales-Sánchez<sup>1</sup>, Jorge Milán-Carrillo<sup>1</sup>, Edith Oliva Cuevas-Rodríguez<sup>1</sup>, Saraid Mora-Rochín<sup>1</sup>, Cuauhtémoc Reyes-Moreno<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa, Cd Universitaria, AP 1354, CP 80,000 Culiacán, Sinaloa, México.

<sup>2</sup> Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Pachuca, Hidalgo, México.

## ABSTRACT

Mexico suffers from serious malnutrition, overweight and obesity problems, affecting a large part of the population, as well as, chronic degenerative diseases (CDD), among which cardiovascular diseases (CVD) and diabetes, are the main causes of mortality in the country. The tortilla represents a viable vehicle to improve the Mexicans nutritional status. In the present work, the effect of the addition of 30 % extruded amaranth flour (EAF) on the nutritional [essential amino acid profile (EAA), *in vitro* protein digestibility (IVPD), calculated protein efficiency ratio (C-PER)], nutraceutical [antioxidant activity (AoxA), and antihypertensive and hypoglycemic potentials] and sensory properties of extruded creole blue maize flour (ECBMF) tortillas were evaluated. The functional tortillas (ECBMF tortillas added with 30 % of EAF) presented more protein, dietary fiber, IVPD and C-PER than tortillas from ECBMF alone; however, they showed lower AoxA (13,187 vs. 15,298  $\mu\text{mol TE} / 100 \text{ g, DW}$ ) and better antihypertensive and hypoglycemic potentials than 100 % ECBMF tortillas. The addition of EAF, resulted in sensorially acceptable functional tortillas with better nutritional and nutraceutical properties. Functional tortillas could reduce malnutrition and chronic degenerative diseases in Mexico.

**Keywords:** Creole blue maize, amaranth, extrusion, functional tortillas, sensory properties

## RESUMEN

México sufre graves problemas de desnutrición, sobrepeso y obesidad, afectando gran parte de la población. Asimismo, las enfermedades crónicas degenerativas (ECD), como enfermedades cardiovasculares (ECV) y diabetes son la principal causa de mortalidad en el país. La tortilla representa un vehículo viable para mejorar el estado nutricional de los mexicanos. En el presente trabajo se evaluó el efecto de la adición de 30 % de harina de amaranto extrudido (HAE) sobre las propiedades nutricionales [perfil de aminoácidos esenciales (AAE), digestibilidad de proteínas *in vitro* (DPIV), relación de eficiencia proteica calculada (C-PER)], nutraceuticas [actividad antioxidante (AAox) y potenciales

antihipertensivo e hipoglucémico] y sensoriales de tortillas de harina de maíz azul criollo extrudido (HMACE). Las tortillas funcionales (tortillas de HMACE adicionadas con 30 % de HAE) presentaron más proteínas, fibra dietética, DPIV y C-PER que las tortillas de solo HMACE; sin embargo, presentaron AAox **más baja** (13,187 vs. 15,298  $\mu\text{mol ET} / 100 \text{ g, BS}$ ) y mejores potenciales antihipertensivo e hipoglucémico que las tortillas 100 % HMACE. La adición de HAE, permitió obtener tortillas funcionales sensorialmente aceptables con mejores propiedades nutricionales y nutraceuticas. Las tortillas funcionales podrían reducir la desnutrición y las enfermedades crónicas degenerativas en México.

**Palabras clave:** Maíz criollo azul, amaranto, extrusión, tortillas funcionales, propiedades sensoriales.

## INTRODUCTION

Mexico suffers from issues with malnutrition, anemia, overweight, and obesity. Malnutrition is a problem that affects development, human growth, and general health, particularly in children under five years of age and pregnant women. The prevalence of low height is a severe public health problem (13.6 % on average), especially in rural and marginal urban areas (Ramírez-Jaspeado *et al.*, 2018).

Chronic degenerative diseases (CDD) affect all age groups and progress over a long time. CDD were the leading cause of mortality in 2018; with cardiovascular diseases (CVD) and diabetes being the top two causes of death in Mexico with 149,368 and 101,257, respectively (INEGI, 2019). It is necessary to prevent CDD and combat modifiable risk factors: Eliminate tobacco consumption, limit excessive intake of alcohol and salt/sodium, perform regular physical activity, and follow a healthy diet (WHO, 2019).

In Mexico, maize's main food product is the tortilla, with an average daily consumption of 1,400 million tortillas. Mexico's annual consumption amounts to more than 120 kg per capita; in adulthood, 8 to 10 tortillas are consumed daily. One of its main tortillas limitations is the lack of lysine. The nixtamalization process to prepare tortillas presents problems of high liquid waste discharges. Extrusion, an

\*Autor para correspondencia: Cuauhtémoc Reyes-Moreno  
 Correo electrónico: creyes@uas.edu.mx

Recibido: 2 de octubre de 2020  
 Aceptado: 19 de abril de 2021

alternative to nixtamalization, does not generate polluting effluents, and all the components of the grain, including the pericarp, are retained, producing a tortilla with higher fiber content (Milán-Carrillo *et al.*, 2006; Escalante-Aburto *et al.*, 2013; León-López *et al.*, 2019).

Tortillas represent an excellent vehicle to enhance the nutritional status of tortillas consumers (Mexicans). Several researchers have reported improvements in maize tortilla quality with regard to nutritional and nutraceutical properties throughout the addition of several types of flours: **Common bean** (Treviño-Mejía *et al.*, 2016), **soybean** (Chuck-Hernández and Serna-Saldívar, 2019), and **sprouted soybean** (Inyang *et al.*, 2019). The fortification of creole blue maize tortillas with pseudocereals flours represents an alternative to improve their nutritional and nutraceutical properties.

Mexico has the most considerable genetic diversity of maize (*Zea mays* L.) in the world. Approximately 59 different maize races or landraces have been classified based on morphological characters and isozyme frequencies. In these Mexican maize landraces, pigmented genotypes such as blue, red, and yellow are the most common (Sánchez *et al.*, 2000). Creole genotypes of pigmented maize **are** cultivated in different regions of Mexico. Chalqueño, Bolita, and Elotes Conico landraces predominate in the central mesa (Pineda Hidalgo *et al.*, 2013). Currently, interest in pigmented maize has received increased attention owing to consumer awareness of their potential health benefits and color properties. Blue genotypes have multiple functional properties (protection against oxidative stress, hypoglycemic activity, lowers blood pressure, serum cholesterol, and triglyceride levels). These nutraceutical properties are associated with phytochemicals' presence (phenolic acids, anthocyanins) (Urias-Lugo *et al.*, 2015; Gaxiola-Cuevas *et al.*, 2017; Guzmán Gerónimo *et al.*, 2017).

Amaranth seeds possess a protein content near to 15 % (w/w); the essential amino acid composition is close to the optimum amino acid balance required in the human diet (Ogrodowska *et al.*, 2014; Orona-Tamayo and Paredes-López, 2016). They are an excellent source of healthy lipids, like such as unsaturated fatty acids and bioactive compounds like polyphenols, flavonoids, tannins, tocopherols, squalene, and biopeptides, among others (Tovar-Perez *et al.*, 2019; Velarde-Salcedo *et al.*, 2019). Several researchers have observed that amaranth biopeptides not only present cholesterol-lowering activity, but also present antioxidant, antihypertensive, and antithrombotic activities, which is why they have a potential application in foods as a functional ingredient (Orsini-Delgado *et al.*, 2016; Sabbione *et al.*, 2016; Quiroga *et al.*, 2017).

Extrusion cooking uses a combination of high-temperature, pressure, and shear conditions in a short period. This results in molecular transformation and chemical reactions within the extruded products. Furthermore, it improves the starch and protein digestibility and increases bioactive compounds' retention and soluble dietary fiber. Extrusion causes lipid modifications, enzymes and microorganisms in-

activation, and the formation of volatile flavor components. It is also a highly efficient alternative technology, which minimizes energy consumption and water pollution (Ramos-Enríquez *et al.*, 2018; Ortiz-Cruz *et al.*, 2020).

The work's objective was to evaluate the effect of extruded amaranth flour addition on the quality (nutritional, nutraceutical, sensory) of creole blue maize tortillas.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

Whole creole blue maize (*Zea mays* L) and amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L) seeds **were** obtained in markets of the localities of Tepeaca, Puebla, México, and Te-moac, Morelos, Mexico, respectively. The grains were cleaned and packed in 1 kg lots, and stored in refrigeration (5-10 °C) until their use.

### Production of extruded creole blue maize (ECBMF) and amaranth flours (EAF)

Production of ECBMF and EAF was according to the methodology proposed by Milán-Carrillo *et al.* (2006) and Milán-Carrillo *et al.* (2012), respectively. Five hundred gram lots of seeds (creole blue maize, amaranth) were placed in a domestic blender to obtain grits that passed through a 40-US mesh (0.425 mm) screen but were retained over a 200-US mesh (0.074 mm) screen, and fine powder. The seeds grits were mixed with lime (0.21 g/100 g fragmented grain) and water to achieve a water level of 28 g/100 g and 20 g/100 g, respectively. All lots were packed in polyethylene bags and stored (4 °C/12 h). Before extrusion, the grits were tempered (25 °C). The extrusion treatments were carried out in a single screw laboratory extruder Model 20 DN (CW Brabender Instruments, Inc, NJ, USA). A screw-operated hopper-fed the feedstock into the extruder at 30 rpm. The feed rate was set at 70 g/min. The extrusion temperature is defined as the temperature at the die end barrel. The extruder operation conditions were as follows [Extrusion temperature (ET), and screw speed (SS)]: Creole blue maize: ET=85 °C/SS=240 rpm; amaranth: ET=130 °C/SS=124 rpm. Extrudates cooled and equilibrated at environmental conditions (25 °C, 65 % RH), were milled to pass through an 80-US mesh (0.180 mm) screen, and packed in plastic bags. Extruded creole blue maize and amaranth flours (ECBMF, EAF) were then stored at 4 °C until use.

### Quality evaluation of functional tortillas elaborated from ECBMF and EAF

Functional tortillas elaboration consisted in the flour mixture of 70 % ECBMF+30 % EAF, to compare to tortillas made with 100 % ECBMF, and as control, blue MASECA™. The tortillas were prepared with water at 30 °C until obtaining an adequate consistency. Tortillas' puffing was evaluated throughout their cooking using a 1 to 3 scale, where: 1= No puffing, 2= Intermediate puffing, and 3= Complete puffing (Milán-Carrillo *et al.*, 2006). The tortilla rollability was evaluated 30 min after elaboration. They were rolled using a glass



stick, 2.54 cm in diameter, and the degree of breakage of the tortilla surface (0-100 %) indicated the rollability (1-5) as follows: 100 %=5, 75 %=4, 50 %=3, 25 %=2, and 0 %=1 (Bedolla and Rooney, 1984). For sensory evaluation, squared tortilla pieces pre-heated at 45°C were presented to one hundred twenty consumers (ages 18-35), who were habitual tortilla consumers. The panelists used plain water as a palate cleanser between samples. Consumers assessed flavor, odor, color, texture, and general acceptance. Each consumer was asked to indicate his/her degree of liking/disliking using a 9-category hedonic scale (1=dislike extremely to 9=like extremely). Samples were dried and milled to evaluate the chemical composition and the nutritional and nutraceutical properties of tortillas.

### Chemical composition of the flours and tortillas

The official AOAC (2012) methods 960.52, 920.39C, and 925.09B were used to determine protein (Nx6.25), lipids, and moisture contents. Soluble dietary fiber (SDF) and insoluble dietary fiber (IDF) evaluation, was according to the enzymatic-gravimetric method for total dietary fiber (TDF) (method 985.29), using the TDF assay kit from Sigma-Aldrich (TDF 100 A) (AOAC, 2012).

EAA (Essential amino acid), IVPD (*in vitro* protein digestibility), CS (Chemical score), and C-PER (Calculated protein efficiency ratio) of the flours and tortillas.

Nutritional properties of flours and their tortillas (from blue MASECA™, 100 % ECBMF, and 70 % ECBMF+30 % EAF) were determined according to Salas-López *et al.* (2018). EAA composition was evaluated using an analytical scale (4.6mm×250mm) hypersil ODS C18 column kept at 38 °C, which was connected to an HPLC system (GBC, Dandenong, Australia) equipped with a fluorescence detector >LC 5100 set at 270 nm (excitation) and 316 nm (emission). The tryptophan was determined using an ultraviolet detector at 280 nm. IVPD evaluation was as reported by Rathod *et al.* (2016) with slight modifications. One gram of defatted sample dissolved in a pepsin solution (20 mL 0.1N HCl + 15 mg pepsin) in a 250 mL Erlenmeyer flask, was incubated in a water bath for 3 hours at 37 °C. After incubation, it was neutralized with 10 mL of 0.2N NaOH, and a pancreatin solution (7.5 mL of phosphate buffer +40 mg pancreatin) was added, adjusting to pH 8, and incubated in a water bath (37 °C x 24h). At the end of the incubation, 700 µL of trichloroacetic acid were added, centrifuged at 5,000 rpm for 10 minutes; the pellet recovered and dissolved in 30 mL of distilled water to later be dried at 40 °C for 12 hours. The protein content of the dry sample was determined using the micro-Kjeldahl method and the percentage of *in vitro* protein digestibility was determined using the following equation:

$$IVPD (\%) = \frac{\text{Initial protein content} - \text{Residual protein content}}{\text{Initial protein content}} \times 100$$

The CS calculation was as follows:

$$CS = \left( \frac{\text{Content of the most limiting EAA}}{REEAR} \right) \times 100$$

where EAA=Essential amino acid and REEAR=Recommended EAA requirements for children (three years and older), adolescents, and adults (FAO, 2013). The IVPD and EAA composition of the sample were used for C-PER calculation. All evaluations were made in triplicate.

### Extraction of free and bound phenolic

The extraction of free phenolic was according to the method described by Adom and Liu (2002). For free phenolic extraction, 0.5 g of sample, mixed with 10 mL of ethanol at 80 % (v/v), was stirred in a rotator (OVAN Noria R, USA 2010) at a speed of 25 rpm for 10 min. Then, centrifuged at 3,000xg, 10 °C, 10 min. This extraction step was performed two more times. The recovered supernatant was placed in a conical tube, and then concentrated to dryness at 45 °C under low pressure (Apud Vac Concentrator, Thermo Elector Corporation). The precipitate was stored to obtain the bound phenolic extracts. The extraction of bound phenolic was according to the procedure of Adom and Liu (2002), with slight modifications (Mora-Rochín *et al.*, 2010). The precipitate was digested with 10 mL of 2 M NaOH, the oxygen eliminated with the presence of N<sub>2</sub> gas and the sample was subjected to heat treatment, in a water bath at 95 °C / 30 min, and stirred for 1 h at room temperature (25 °C). The mixture was neutralized with 2 mL of concentrated HCl, vortexed for 2 min and centrifuged at 3,000xg, 10 °C, 10 min. Subsequently, an extraction with hexane was carried out to remove lipids and extractions of the bound phenolic with ethyl acetate was carried out, which was collected and stored in conical tubes; this extraction procedure was done 4 more times. The ethyl acetate fraction was evaporated to dryness (Apud Vac Concentrator, Thermo Elector Corporation). The concentrate of extracted free and bound phenolic compounds were stored at -20 °C until its later use in the determination of nutraceutical properties and total phenolic compounds. The concentrates were reconstituted with methanol until reaching a final volume of 2 mL prior to use.

### Antioxidant activity (AoxA)

#### ABTS assay

The ABTS assay for AoxA was performed diluting free and bound extracts with ethanol. Twenty microliters' aliquots of each dilution were taken and mixed with 2.0 mL of diluted radical cation ABTS<sup>•+</sup>, and six min later, the absorbance read at 734 nm in a UV-visible spectrophotometer (GENESYS 10UV, Thermo electron, Inc, Madison, WI, USA) (Re *et al.*, 1999). The results of assays are expressed as µmol of Trolox equivalents (TE)/100 g of dry weight (DW). This assay was realized by triplicate.

#### ORAC assay

The ORAC assay was carried out by diluting free and bound phenolic extracts in 75 mM phosphate buffer (pH 7.4). Aliquots (25 µL) of diluted extracts were mixed with 0.1 mM fluorescein (150 mL) and peroxy radical AAPH (200 mM) (25 µL). After 30 min, fluorescence [485 nm (excitation), 538 nm

(emission)] was measured (37 °C) over a 60 min period, at 2 min intervals, using a Synergy Microplate Reader (Synergy™ HT Multi-Detection, BioTek, Inc., Winooski, VT) (Mora-Rochín *et al.*, 2010). The results of ORAC assays are expressed as micromole of Trolox equivalent (TE)/100 g of dry weight (DW). The ORAC evaluation was performed in triplicate.

### Total phenolic compounds (TPC)

The TPC of free and bound extracts were determined using 20 µL of appropriate extracts dilutions, oxidized with 180 µL of Folin-Ciocalteu reagent (Singleton *et al.*, 1999). After 20 min, the resulting blue color's absorbance was measured at 750 nm using the Synergy Microplate Reader. TPC is reported as mg Gallic acid equivalent (GAE)/100 g of dry weight (DW). The TPC measurements were carried out in triplicate.

### Antihypertensive potential (IC<sub>50</sub>) of the flours and their tortillas

The ACE (angiotensin-converting enzyme) inhibitory activity in free and bound phenolic extracts was determined using the Dojindo ACE Kit-WST test kit (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan). This method relies on an indicator's colorimetric detection after a redox reaction, at an absorbance (Abs) of 450 nm measured using a Microplate Reader (Synergy™ HT Multi-Detection, BioTek, Inc., Winooski, VT, USA). The ACE inhibitory activity (inhibition of the color formation) of the phenolic extracts was calculated using the following equation:

$$\text{ACE inhibitory activity (\%)} = \left[ \frac{(\text{Abs}_{450} \text{ control} - \text{Abs}_{450} \text{ extract})}{\text{Abs}_{450} \text{ control} - \text{Abs}_{450} \text{ blank}} \right] \times 100$$

Where: Abs<sub>450</sub> extract= Absorbance at 450 nm of the reaction solution containing phenolic extract; Abs<sub>450</sub> control = Absorbance at 450 nm of the reaction solution without phenolic extract; Abs<sub>450</sub> blank = Absorbance at 450 nm of the reaction solution with enzyme and without both substrate and phenolic extract. The IC<sub>50</sub> (concentration of phenolic extract that caused an inhibition of 50 % in the ACE activity) values were calculated from different concentrations of the phenolic extracts and ACE inhibitory activity values using the Prism v5 software (GraphPad Prism) (Argüelles-López *et al.*, 2018).

### Hypoglycemic potential (IC<sub>50</sub>) [α-amylase and α-glucosidase inhibition activities] of the flours and their tortillas

The inhibitory activity of bound and free phenolic extracts against α-amylase was determined by measuring the color (absorbance at 540 nm) inhibition of the maltose released after stopping the reaction between starch and α-amylase with 3,5-dinitrosalicylic acid (Astawan *et al.*, 2020). The inhibitory activity of these extracts against α-glucosidase was determined by measuring the color (absorbance at 405 nm) inhibition of the p-nitrophenol formed by α-glucosidase after reacting with p-nitrophenyl-α-D-glucopyranoside

(PNP) (Astawan *et al.*, 2020). α-amylase and α-glucosidase inhibition activities of the phenolic extracts were reported as % inhibition of enzyme activity and calculated using the following equation:

$$\% \text{ inhibition} = \left[ \frac{(\text{Abs control} - \text{Abs extract})}{\text{Abs control}} \right] \times 100$$

Where: Abs extract= Absorbance of the reaction solution containing phenolic extract; Abs control = Absorbance of the reaction solution without phenolic extract. The IC<sub>50</sub> (concentration of phenolic extract that caused an inhibition of 50 % in the α-amylase and α-glucosidase activities) values were calculated from the plots of % inhibition vs log of the phenolic extract concentration using the Prism v5 software (GraphPad Prism).

### Statistical analyses

The experimental results of chemical composition, nutritional and nutraceutical properties of flours and tortillas, were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey test (5 % of the significance level).

## RESULTS AND DISCUSSION

### Nutritional and nutraceutical properties of extruded grain flours

Table 1 shows the proteins, lipids, and dietary fiber content of extruded creole blue maize and amaranth flours (ECBMF, EAF). The protein content of ECBMF and EAF was 10.08 and 15.52 % (DW), respectively. Extruded grain flours' lipid content ranged from 6.11 to 6.98 % (DW); the ECBMF had the lowest value. The dietary fiber contained in the extruded grain flours varied from 12.43 % (DW) (ECBMF) to 13.68 % (DW) (EAF); in both flours, the highest dietary fiber content corresponded to the insoluble dietary fiber fraction whose content ranged from 9.37 % (DW) (EAF) to 10.61 % (DW) (ECBMF).

The essential amino acid (EAA) content of ECBMF and EAF is also shown in Table 1. In general, the EAA content of extruded grain flours was higher than those suggested by FAO (2013) for the requirement of EAA for children (3 years and older), adolescents, and adults; however in ECBMF and EAF Lys and Leu, respectively, resulted limiting amino acids. The *in vitro* protein digestibility (IVPD) of extruded grain flours ranged from 78.26 % (ECBMF) to 81.05 % (EAF). The highest C-PER (1.72-2.22) value corresponded to extruded amaranth flour (EAF) (Table 1). The IVPD of seeds increased due to the destruction of antinutritional factors (trypsin, and chymotrypsin inhibitors) and protein denaturation, because of the applied conditions (cutting forces, temperature, and humidity) during the extrusion – cooking process (Gamel *et al.*, 2006; Montoya-Rodriguez *et al.*, 2015).

### Antioxidant activity (AoxA) and total phenolic content (TPC) of extruded grain flours

Table 2 shows the antioxidant activity, total phenolic content, and antihypertensive and hypoglycemic potential

**Tabla 1.** Composición química y contenido de aminoácidos esenciales en harina comercial de maíz azul nixtamalizado (MASECA™ azul) y harinas de maíz azul criollo y amaranto extrudidos (HMACE, HAE).

**Table 1.** Chemical composition and essential amino acid content in commercial nixtamalized blue maize flour (blue MASECA™), and extruded creole blue maize and amaranth flours (ECBMF, EAF).

Property	Blue MASECA™	ECBMF	EAF	FAO <sup>1</sup>
<b>Chemical composition</b> (%, DW)				
Proteins	7.83±0.08 <sup>C</sup>	10.08±0.11 <sup>B</sup>	15.52±0.07 <sup>A</sup>	
Lipids	2.40±0.10 <sup>C</sup>	6.11±0.08 <sup>B</sup>	6.98±0.06 <sup>A</sup>	
Minerals	1.52±0.06 <sup>B</sup>	1.56±0.05 <sup>B</sup>	3.47±0.06 <sup>A</sup>	
Dietary fibre				
Soluble	0.72±0.04 <sup>C</sup>	1.82±0.10 <sup>B</sup>	4.31±0.07 <sup>A</sup>	
Insoluble	8.75±0.12 <sup>C</sup>	10.61±0.08 <sup>A</sup>	9.37±0.07 <sup>B</sup>	
Total	9.47±0.10 <sup>C</sup>	12.43±0.12 <sup>B</sup>	13.68±0.09 <sup>A</sup>	
Carbohydrates	78.80±0.15 <sup>A</sup>	69.82±0.17 <sup>B</sup>	60.35±0.14 <sup>C</sup>	
<b>Nutritional</b>				
EAA <sup>2</sup> (g/100 g protein)				
His	2.57±0.04 <sup>B</sup>	3.18±0.02 <sup>A</sup>	2.46±0.03 <sup>C</sup>	1.60
Ile	2.88±0.02 <sup>B</sup>	2.62±0.05 <sup>C</sup>	4.02±0.02 <sup>A</sup>	3.00
Leu	13.88±0.08 <sup>A</sup>	7.90±0.04 <sup>B</sup>	5.88±0.04 <sup>C</sup>	6.10
Lys	2.48±0.03 <sup>C</sup>	3.85±0.05 <sup>B</sup>	5.94±0.03 <sup>A</sup>	4.80
Met+Cys	3.73±0.06 <sup>C</sup>	5.49±0.04 <sup>A</sup>	3.88±0.03 <sup>B</sup>	2.30
Phe+Tyr	7.82±0.04 <sup>A</sup>	6.65±0.06 <sup>C</sup>	7.77±0.05 <sup>B</sup>	4.10
Thr	2.98±0.05 <sup>C</sup>	3.18±0.03 <sup>B</sup>	4.18±0.04 <sup>A</sup>	2.50
Trp	0.56±0.03 <sup>C</sup>	0.77±0.02 <sup>B</sup>	1.29±0.02 <sup>A</sup>	0.66
Val	4.48±0.04 <sup>B</sup>	5.88±0.05 <sup>A</sup>	4.17±0.03 <sup>C</sup>	4.00
Total	41.38	39.52	39.59	29.06
EAA Chemical score	0.52	0.80	0.96	
Limitant AAE	Lys	Lys	Leu	
IVPD <sup>3</sup> (%)	74.05±0.10 <sup>C</sup>	78.26±0.12 <sup>B</sup>	81.05±0.14 <sup>A</sup>	
C-PER <sup>4</sup>	1.00±0.02 <sup>C</sup>	1.72±0.04 <sup>B</sup>	2.22±0.09 <sup>A</sup>	

<sup>A-C</sup> Means with different superscripts in the same row are significantly different (Tukey,  $p \leq 0.05$ ); <sup>1</sup> EAA requirements for children (3 years and older), adolescents, and adults according to FAO (2013); <sup>2</sup> EAA = Essential amino acid(s); <sup>3</sup> IVPD = *In vitro* protein digestibility (%); <sup>4</sup> C-PER = Calculated protein efficiency ratio.

of extruded creole maize and amaranth flours (ECBMF, EAF). The AoxA, evaluated by ORAC methodology, of ECBMF and EAF, was 15,587 and 5,387  $\mu\text{mol}$  Trolox equivalents (TE)/100 g sample DW, respectively. The commercial nixtamalized blue maize flour (blue MASECA™) showed an AoxA=12,403  $\mu\text{mol}$  TE/100 g sample DW. The AoxA of the extruded grains, evaluated by ABTS methodology, showed a similar tendency. Extruded grain flours' total phenolic content ranged from 64.65 to 282.61 mg Gallic acid equivalents (GAE)/100 g sample DW, showing the extruded amaranth flour (EAF) the lowest value.

**Tabla 2.** Actividad antioxidante, contenido total de fenólicos y potencial antihipertensivo e hipoglucémico de harina comercial de maíz azul nixtamalizado (MASECA™ azul) y harinas de maíz azul criollo y amaranto extrudidos (HMACE, HAE).

**Table 2.** Antioxidant activity, total phenolic content, and antihypertensive and hypoglycemic potentials of commercial nixtamalized blue maize flour (blue MASECA™), and extruded creole blue maize and amaranth flours (ECBMF, EAF).

Property	Blue MASECA™	ECBMF	EAF
<b>Antioxidant activity<sup>1</sup></b>			
ORAC			
Free phenolics	2,295±79 <sup>C</sup>	3,021±98 <sup>A</sup>	2,510±130 <sup>B</sup>
Bound phenolics	10,108±42 <sup>B</sup>	12,566±597 <sup>A</sup>	2,977±141 <sup>C</sup>
Total	12,403±581 <sup>B</sup>	15,587±605 <sup>A</sup>	5,387±136 <sup>C</sup>
ABTS			
Free phenolics	847±58 <sup>B</sup>	1,218±85 <sup>A</sup>	1,267±72 <sup>A</sup>
Bound phenolics	2,708±167 <sup>B</sup>	3,879±156 <sup>A</sup>	2,389±59 <sup>C</sup>
Total	3,555±120 <sup>B</sup>	5,097±160 <sup>A</sup>	3,656±87 <sup>B</sup>
<b>Phenolic compounds<sup>2</sup></b>			
Free phenolics	61.85±0.58 <sup>B</sup>	64.18±0.37 <sup>A</sup>	20.14±0.23 <sup>C</sup>
Bound phenolics	134.59±0.83 <sup>B</sup>	218.43±2.83 <sup>A</sup>	44.51±0.19 <sup>C</sup>
Total	196.44±0.92 <sup>B</sup>	282.61±3.70 <sup>A</sup>	64.65±0.37 <sup>C</sup>
<b>Antihypertensive potential (IC<sub>50</sub>)<sup>3</sup></b>			
ACE inhibition	2.51±0.07 <sup>A</sup>	0.49±0.03 <sup>B</sup>	0.40±0.03 <sup>C</sup>
<b>Hypoglycemic potential (IC<sub>50</sub>)<sup>3</sup></b>			
$\alpha$ -amylase inhibition	27.22±1.37 <sup>A</sup>	28.67±1.11 <sup>A</sup>	10.85±0.76 <sup>B</sup>
$\alpha$ -glucosidase inhibition	18.22±1.01 <sup>B</sup>	20.98±0.89 <sup>A</sup>	14.35±0.83 <sup>C</sup>

<sup>A-C</sup> Means with different superscripts in the same row are significantly different (Tukey,  $p \leq 0.05$ ); <sup>1</sup>  $\mu\text{mol}$  Trolox equivalents (TE) / 100 g sample, DW; <sup>2</sup> mg Gallic acid equivalents (GAE) / 100 g sample, DW; <sup>3</sup> mg extract/ mL

Extrusion-cooking technology has the potential for the development of functional foods since it allows the retention or even increase, phenolic compounds contents, related to antioxidant activity, in a higher proportion than traditional nixtamalization (Mora-Rochín *et al.*, 2010; Escalante-Aburto *et al.*, 2013). Applying the extrusion process at optimal conditions, when the process is optimized to obtain maximum TPC values, specific bioactive compounds, and AoxA, allows us to produce extruded grain flours with high AoxA and TPC. The highest proportion of AoxA (either by retention or increase) could result from the release of phenolic compounds during the extrusion process, preventing oxidation of phenolic compounds in the extruded product by enzymatic inactivation during the processing, and the presence of Maillard reaction products (MRP). The generation of MRP occur during the extrusion of raw materials that contain amino acids and reducing sugars (Escalante-Aburto *et al.*, 2013; Espinoza-Moreno *et al.*, 2016). During the preparation of extruded grain flours, both in creole blue maize and amaranth, bound phenolic compounds were the main contributors (up to 80 %) to the



values of total phenolic compounds antioxidant activity (Table 2). The content of total phenolic compounds in extruded grain flours relates to the destruction of the cell walls, the release of phenolic compounds, and the formation of MRP quantified as phenolic compounds (Espinoza-Moreno *et al.*, 2016).

### Antihypertensive and hypoglycemic potentials of phenolic compounds extracted from extruded grain flours

The antihypertensive potential is defined as  $IC_{50}$  [concentration (mg of extract/mL) required to produce inhibition of 50 % of the activity of ACE]. The phenolic compounds extracted from ECBMF and EAF had potential antihypertensive activity with  $IC_{50}$  of 0.49 and 0.40 mg extract/mL, respectively, while the phenolic extracts from blue MASECA™ flour had an  $IC_{50}$ =2.51 mg extract/mL (Table 2). The benefits of the  $IC_{50}$  obtained in this research are in concordance with reported results for phenolic extracts from soybean (0.143-0.160 mg/mL), and unprocessed and extruded defatted chia seeds (0.35-0.51 mg/mL) (Ademiluyi and Oboh, 2013; León-López *et al.*, 2019). The improvement of  $IC_{50}$  values during the extrusion process of creole blue maize and amaranth seeds could have occurred by the release and formation of bioactive compounds (phenolic compounds and MRP) with antihypertensive potential. Phenolic compounds (phenolic acids, flavonoids, tannins, stilbenes) inhibit the *in vitro* ACE activity. The degree of inhibition of the ACE activity depends on the absorption and metabolism of these compounds, and its mode of action related to the class (subclass) and the structure of the phenolic compound that is employed (Massaretto *et al.*, 2011; Al-Shukor *et al.*, 2013). According to this research, the phenolic compounds present in extruded grains flours are suitable for use as functional food supplements or natural medicines to treat hypertension.

The hypoglycemic potential is defined as  $IC_{50}$  [concentration (mg of extract/mL) required to produce inhibition of 50 % of the activity of  $\alpha$ -amylase or  $\alpha$ -glucosidase enzymes]. Extruded amaranth flour (EAF) showed better hypoglycemic potential [EAF:  $\alpha$ -amylase,  $IC_{50}$ =10.85 mg/mL),  $\alpha$ -glucosidase,  $IC_{50}$ =14.35 mg/mL / ECBMF:  $\alpha$ -amylase,  $IC_{50}$  = 28.67 mg/mL,  $\alpha$ -glucosidase,  $IC_{50}$ =20.98 mg / mL /) than ECBMF (Table 2). The commercial nixtamalized maize flour had potential hypoglycemic values (blue MASECA™:  $\alpha$ -amylase,  $IC_{50}$ =27.22,  $\alpha$ -glucosidase,  $IC_{50}$ =18.22 mg/mL) very similar to ECBMF. These results suggest that extruded amaranth flour is a potential source of antioxidant phenolics and great sources of strong natural inhibitors for ACE,  $\alpha$ -amylase, and  $\alpha$ -glucosidase activities (Ademiluyi and Oboh, 2012; 2013). This information may help with the effective utilization of EAF as a functional food ingredient for promoting health.

### Effect of EAF addition on the quality of maize tortillas

The chemical composition, nutritional, nutraceutical, and sensory properties of tortillas are shown in Table 3. Functional tortillas had higher protein and lipid values, as well as IVPD, C-PER, dietary fiber, and antihypertensive and hypoglycemic potentials than tortillas from 100 % ECBMF.

**Table 3.** Composición química, propiedades nutricionales y nutraceuticas, y características sensoriales/tecnológicas de tortillas de harina comercial de maíz azul nixtamalizado (MASECA™ azul), harina de maíz azul criollo extrudido (HMACE) y la mezcla de 70 % HMACE + 30 % HAE (tortillas funcionales).

**Table 3.** Chemical composition, nutritional and nutraceutical properties, and sensory/technological characteristics of tortillas from commercial nixtamalized blue maize flour (blue MASECA™), extruded creole blue maize flour (ECBMF), and the 70% ECBMF+30% EAF mixture (functional tortillas).

Property	Blue MASECA™ tortillas	ECBMF tortillas	Functional tortillas	FAO <sup>1</sup>
<b>Chemical composition</b> (% DW)				
Proteins	8.07±0.05 <sup>c</sup>	10.05±0.08 <sup>b</sup>	11.69±0.07 <sup>a</sup>	
Lipids	2.41±0.02 <sup>c</sup>	5.92±0.05 <sup>b</sup>	6.21±0.04 <sup>a</sup>	
Minerals	1.57±0.04 <sup>b</sup>	1.63±0.06 <sup>b</sup>	2.15±0.5 <sup>a</sup>	
Dietary fiber				
Soluble	0.76±0.03 <sup>c</sup>	1.81±0.03 <sup>b</sup>	2.43±0.04 <sup>a</sup>	
Insoluble	8.66±0.07 <sup>b</sup>	9.38±0.08 <sup>a</sup>	9.49±0.07 <sup>a</sup>	
Total	9.43±0.06 <sup>c</sup>	11.19±0.06 <sup>b</sup>	11.92±0.05 <sup>a</sup>	
Carbohydrates	78.52±1.08 <sup>a</sup>	71.21±1.03 <sup>b</sup>	69.03±1.11 <sup>c</sup>	
<b>Nutritional</b>				
EAA <sup>2</sup> (g/100g protein)				
His	2.49±0.02 <sup>c</sup>	3.13±0.04 <sup>a</sup>	2.88±0.02 <sup>b</sup>	1.60
Ile	2.83±0.03 <sup>b</sup>	2.50±0.03 <sup>c</sup>	3.03±0.03 <sup>a</sup>	3.00
Leu	12.94±0.06 <sup>a</sup>	7.39±0.03 <sup>b</sup>	7.19±0.05 <sup>c</sup>	6.10
Lys	2.44±0.04 <sup>c</sup>	3.01±0.02 <sup>b</sup>	4.51±0.04 <sup>a</sup>	4.80
Met+Cys	3.39±0.03 <sup>b</sup>	3.42±0.03 <sup>b</sup>	5.00±0.02 <sup>a</sup>	2.30
Phe+Tyr	7.58±0.05 <sup>b</sup>	9.8±0.02 <sup>a</sup>	6.92±0.05 <sup>c</sup>	4.10
Thr	2.70±0.02 <sup>b</sup>	2.56±0.04 <sup>c</sup>	3.41±0.03 <sup>a</sup>	2.50
Trp	0.56±0.04 <sup>c</sup>	0.64±0.02 <sup>b</sup>	0.91±0.02 <sup>a</sup>	0.66
Val	4.23±0.05 <sup>c</sup>	5.50±0.03 <sup>a</sup>	5.35±0.03 <sup>b</sup>	4.00
Total	39.16	37.95	39.20	29.06
Chemical score	0.51	0.62	0.94	
Limitant EAA	Lys	Lys	Lys	
IVPD (%) <sup>3</sup>	76.86±0.21 <sup>c</sup>	77.21±0.20 <sup>b</sup>	79.39±0.19 <sup>a</sup>	
C-PER <sup>4</sup>	1.52±0.06 <sup>b</sup>	1.54±0.05 <sup>b</sup>	1.95±0.07 <sup>a</sup>	
<b>Nutraceutical</b>				
AoxA <sup>5</sup>				
	12,031±561 <sup>c</sup>	15,298±505 <sup>a</sup>	13,187±545 <sup>b</sup>	
Antihypertensive potential ( $IC_{50}$ ) <sup>6</sup>				
ACE inhibition	2.43±0.11 <sup>a</sup>	0.45±0.04 <sup>b</sup>	0.37±0.05 <sup>c</sup>	
Hypoglycemic potential ( $IC_{50}$ ) <sup>6</sup>				
$\alpha$ -amylase inhibition	24.63±0.86 <sup>a</sup>	25.17±1.05 <sup>a</sup>	18.33±0.59 <sup>b</sup>	
$\alpha$ -glucosidase inhibition	17.55±0.61 <sup>b</sup>	18.37±0.55 <sup>a</sup>	15.04±0.46 <sup>c</sup>	
<b>Sensory/Technological</b>				
General acceptability <sup>7</sup>				
	8.40 ± 0.21 <sup>a</sup>	8.10 ± 0.35 <sup>b</sup>	8.01 ± 0.21 <sup>b</sup>	
Color <sup>7</sup>	8.40 ± 0.30 <sup>a</sup>	8.15 ± 0.25 <sup>b</sup>	8.00 ± 0.29 <sup>b</sup>	
Flavor <sup>7</sup>	8.50 ± 0.25 <sup>a</sup>	8.22 ± 0.44 <sup>b</sup>	7.88 ± 0.34 <sup>c</sup>	
Texture <sup>7</sup>	8.41 ± 0.35 <sup>a</sup>	8.21 ± 0.22 <sup>b</sup>	7.97 ± 0.25 <sup>c</sup>	
Puffing <sup>8</sup>	2.92 ± 0.28 <sup>a</sup>	2.92 ± 0.28 <sup>a</sup>	2.13 ± 0.34 <sup>b</sup>	
Rollability <sup>9</sup>	2.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	2.08 ± 0.28 <sup>a</sup>	1.96 ± 0.20 <sup>a</sup>	

<sup>a-c</sup> Means with different superscript letters in the same row are significantly different (Tukey,  $p \leq 0.05$ ); <sup>1</sup> Essential amino acids requirements for children (3 years and older), adolescents and adults according to FAO (2013); <sup>2</sup> EAA = Essential amino acid; <sup>3</sup> IVPD = *In vitro* protein digestibility (%); <sup>4</sup> C-PER = Calculated protein efficiency ratio; <sup>5</sup>  $\mu$ mol Trolox equivalents (TE) / 100 g, DW; <sup>6</sup> mg extract/ mL; <sup>7</sup> Degree of liking/disliking using a 9-category hedonic scale (1 = dislike extremely to 9 = like extremely); <sup>8</sup> 1 = No puffing, 2 = Intermediate puffing, and 3 = Complete puffing; <sup>9</sup> degree of breakage of the tortilla surface (0-100 %) indicated the rollability (1-5) as follows: 100%=5, 75%=4, 50%=3, 25%=2, and 0%=1.



The addition of EAF to ECBMF increased the nutritional and nutraceutical properties of tortillas.

Pacheco de Delahaye and Portillo (1990) studied the effect of the enrichment of white maize flour (*Zea mays*) with amaranth seed flour (*Amaranthus* sp). They prepared three mixes of precooked white maize flour with processed graniferous amaranth flour at the 10, 20, and 30 % substitution levels. All three mixtures showed gradual increases in fiber, fat, and ash content relative to precooked white maize flour. Arepas were elaborated from these mixtures and acceptability tests were carried out, finding that the mixtures with the levels of 10 % and 20 % of substitution were acceptable from the sensory point of view. Protein quality of arepas produced from the 80 % mixture precooked white maize flour + 20 % amaranth flour, was analyzed in terms of protein efficiency (PER) and was superior to the arepas of the precooked white corn flour; the arepas added with amaranth flour also presented high apparent digestibility (92 %). The lysine content in the arepas elaborated from the mixtures with substitution of 10 % (1.6 g lysine / 100 g of protein) and 20 % (2.0 g lysine / 100 g of protein) was also higher than those prepared with white maize flour (0.7 g lysine / 100 g protein).

Vázquez-Rodríguez *et al.* (2013) evaluated the bean and amaranth flours' effects on nixtamalized maize tortillas nutritional characteristics. They fortified nixtamalized maize flour with common bean (*Phaseolus vulgaris*) and amaranth (*Amaranthus* spp.) flours in three different bean:amaranth proportions (3:7, 5:5, 7:3) concerning commercial maize flour. They recommended this fortified product as an alternative to resolving low protein quantity/quality of maize-based food products with amaranth and common bean, particularly with 3 % bean and 7 % amaranth. In agreement with the present research, they reported that nutritionally these tortillas had significantly higher levels of protein, lysine, and tryptophan than the control.

Functional tortillas had lower antioxidant activity as evaluated by ORAC (Functional tortillas: AoxA=13,187  $\mu\text{mol TE}/100\text{ g, DW}$ , 100 % ECBMF tortillas: AoxA=15,298  $\mu\text{mol TE}/100\text{ g, DW}$ ). This is due to a dilution effect by the addition of EAF (flour with lower content of phenolic compounds) to the ECBM for the elaboration of the functional tortilla, as well as, an antagonistic effect by the interaction of phenolic compounds of both grains. Hajimehdipoor *et al.* (2014), found an antagonistic effect and antioxidant activity decrease by a ternary combination of rutin and the caffeic, rosmarinic, chlorogenic, and gallic acids. They concluded that the possibility of interact could neutralized the effects of antioxidant activity.

On the other hand, functional tortillas showed better antihypertensive (0.37 vs 0.45 mg/mL) and hypoglycemic [100 % ECBMF tortillas:  $\alpha$ -amylase ( $\text{IC}_{50}$ =25.17 mg/mL),  $\alpha$ -glucosidase ( $\text{IC}_{50}$ =18.37 mg/mL) / Functional tortillas:  $\alpha$ -amylase ( $\text{IC}_{50}$ =18.33 mg/mL),  $\alpha$ -glucosidase ( $\text{IC}_{50}$ =15.04 mg/mL)] potentials than tortillas elaborated with 100 % ECBMF (Table 3), since lower  $\text{IC}_{50}$  values represent higher antihypertensive and hypoglycemic potentials. The improvement in the func-

tional tortilla antihypertensive potential could relate to the presence of bioactive compounds [mainly phenolic acids (gallic, rosmarinic, caffeic, chlorogenic, and vanillic acids) and flavonoids (quercetin, rutin, isoquercitrin, nicotiflorin)] with high ACE-inhibitory potential in the EAF added to ECBMF (Peyrat-Maillard *et al.*, 2003; Barba de la Rosa *et al.*, 2009; López-Mejía *et al.*, 2014). Different hypotheses exist regarding the inhibition mechanisms of phenolic compounds on ACE: i) competitive inhibition, by the structure of phenols that altering their function by agglutination; ii) non-competitive inhibition, both substrate and inhibitor bind to the enzyme simultaneously and reversibly; iii) metal sequestration, ACE is a  $\text{Zn}^{2+}$ -dependent metalloproteinase, and phenolic compounds can chelate non-specific metals exhibiting an ACE inhibitory effect; iv) the interactions between phenols and the disulfide bridges (oxidized cysteines) that reside on the surface of the ACE, causing slight modifications in the structure of the ACE (Arenas-Carvajal *et al.*, 2009; Ademiluyi and Oboh, 2013; Al-Shukor *et al.*, 2013).

Regarding the hypoglycemic potential, this may relate to the type of phenolic compounds and the non-covalent interactions between polyphenols and enzymes. This is due to hydroxyl and galloyl groups present in the molecular structure of polyphenols. Phenolics can form hydrogen bonds with the enzyme's polar groups. In contrast, there are many hydrophobic amino acids found in enzymes (proteins). Galloyl groups in polyphenols show hydrophobicity and therefore polyphenols can bind to enzymes through hydrophobic association. The galloyl group can play an important role in interacting with  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase and their positions mainly affect the efficiency of these enzymes (Ali-Asgar, 2012).

Alu'datt *et al.* (2017) found that the inhibition of ACE,  $\alpha$ -amylase, and  $\alpha$ -glucosidase activity depended on the method of extraction, and the concentration of phenolic compounds. They reported that the most predominant soluble phenolic acids in *Rosmarinus officinalis* were rosmarinic, vanillic, chlorogenic and caffeic acids. Khan *et al.* (2017) found high concentration of gallic acid and rutin in moringa extract, which showed  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase  $\text{IC}_{50}$  inhibition values of 52.5 and 33.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively. Therefore, the presence of these phenolic compounds improves both potentials by the inhibition of the activity of ACE,  $\alpha$ -amylase, and  $\alpha$ -glucosidase enzymes (Ademiluyi and Oboh, 2012; 2013).

The sensory evaluation of the tortillas was carried out by means of a test of general acceptability and attributes, using a hedonic scale of 9 points, where 1 corresponds to "Dislike extremely", 5 to "Neither like or dislike", and 9 to "Like extremely". The functional tortillas showed a general acceptability value of 8.01, which corresponded to the descriptor "Like very much". This value was similar ( $p > 0.05$ ) to that of the tortillas made from ECBMF (general acceptability = 8.10). The general acceptability is correlated with the color, flavor, and texture attributes of the tortillas, which indicates that these characteristics are decisive in the sensory quality of

this product. As was the case for the general acceptability attribute, there was no significant difference ( $p > 0.05$ ) for the property of color (8.00 vs 8.10) between the functional tortilla and the ECBMF tortillas. Although the functional tortillas presented slightly lower values of flavor (7.88 vs 8.15) and texture (7.97 vs 8.20) than the ECBMF tortillas, the general acceptability was no different between these two types of tortillas, which indicates that the incorporation of 30 % EAF in the functional tortillas did not affect in an important way the sensory characteristics evaluated by the panelists in this product. Likewise, the texture sensory property as a quality parameter associated with the degree of puffing and rollability of the tortillas, showed no significant differences in rollability between the functional tortillas and the ECBMF tortillas, while the functional tortillas presented a lower puffing than the ECBMF tortillas.

Since the newly functional tortillas elaborated with a mixture of ECBMF and EAF could represent a valuable staple to improve the original food product's nutritional and nutraceutical values, the results of sensory properties of the functional tortillas are promising, since the tortilla is an ideal vehicle to improve the general health status of consumers, especially in countries where this product is massively consumed by the population, such as the case of México.

## CONCLUSIONS

Functional tortillas had higher proteins, dietary fiber, *in vitro* protein digestibility, calculated protein efficiency ratio, and better nutraceutical properties than tortillas elaborated with 100 % creole blue maize flour. The addition of extruded amaranth flour to extruded creole blue maize flour allows us to obtain functional tortillas with enhanced nutritional, antihypertensive, and hypoglycemic properties, and sensorially acceptable. As part of public policy, functional tortillas could reduce malnutrition and chronic degenerative diseases in Mexico. The results suggest that the addition of amaranth flour increased the nutritional and nutraceutical value in tortillas. The nutraceutical properties found *in vitro* should be confirmed further in animal or human models.

## ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by CONACyT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología), Ciencia de Frontera (Grupal), Convocatoria 2019 (ID Number: 263,352) and Programa de Fomento y Apoyo a Proyectos de Investigación (PROFAPI) of Universidad Autónoma de Sinaloa.

## REFERENCES

- Ademiluyi, A.O., and Oboh, G. 2012. Phenolic-rich extracts from selected tropical underutilized legumes inhibit  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase, and angiotensin I converting enzyme *in vitro*. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology* 23(1):17-25.
- Ademiluyi, A.O., and Oboh, G. 2013. Soybean phenolic-rich extracts inhibit key enzymes linked to type 2 diabetes ( $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase) and hypertension (angiotensin I converting enzyme) *in vitro*. *Experimental and Toxicologic Pathology* 65:305-309.
- Adom, K.K., and Liu, R.H. 2002. Antioxidant activity of grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 6182-6187.
- Al-Shukor, N., Van-Camp, J., Gonzales, G.B., Staljanssens, D., Struijs, K., Zotti, M.J., Raes, K., and Smagghe, G. 2013. Angiotensin-converting enzyme inhibitory effects by plant phenolic compounds: a study of structure-activity relationships. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61:11832-11839.
- Ali-Asgar, Md. 2012. Anti-diabetic potential of phenolic compounds: A review. *International Journal of Food Properties* 16(1):91-103.
- AOAC. 2012. *Association of Official Analytical Chemists*. Official Methods of Analysis. Methods: 925.09B, 920.39 C, 960.52, and 985.29. Washington, USA: AOAC.
- Arenas-Carvajal, R., Pachón-Gómez, E., Méndez-Callejas, G., and Guzmán-Avenidaño, A. 2009. Estudio del efecto inhibitorio de extractos de *Salvia scutellarioides* sobre la actividad de la enzima convertidora de Angiotensina. *Revista Javeriana* 14(2-3):141-150.
- Argüelles-López, O.D., Reyes-Moreno, C, Gutiérrez-Dorado R, Sánchez-Osuna M.F., López-Cervantes J, Cuevas- Rodríguez E.O., Milán-Carrillo, J., and Perales-Sánchez, J.X.K. 2018. Functional beverages elaborated from amaranth and chia flours processed by germination and extrusion. *Biotecnia* XX: 135-145.
- Astawan, M., Rahmawati, I.S., Cahyani, A.P., Wresdiyati, T., Putri, S.P., and Fukusaki, E. 2020. Comparison between the potential of tempe flour made from germinated and nongerminated soybeans in preventing *Diabetes mellitus*. *HAYATI Journal of Biosciences* 27(1):16-23.
- Barba de la Rosa, A.P., Fomsgaard, I.S., Laursen, B., Mortensen, A.G., Olvera-Martínez, L., Silva-Sánchez, C., Mendoza-Herrera, A., González-Castañeda, J., and De León-Rodríguez, A. 2009. Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) as an alternative crop for sustainable food production: Phenolic acids and flavonoids with potential impact on its nutraceutical quality. *Journal of Cereal Science* 49: 117-121.
- Bedolla, S., and Rooney, L.W. 1984. Characteristics of US and Mexican instant maize flour for tortilla and snack preparation. *Cereal Foods World* 29:732-735.
- Chuck-Hernández, C.E., and Serna-Saldívar, S.O. 2019. Flours and Bread and their Fortification in Health and Disease Prevention. 2<sup>nd</sup> edition. In: "Soybean-Fortified Nixtamalized Corn Tortillas and Related Products." Chap 25, Preedy VR, Watson RR (ed), Academic Press, pp 319-333, ISBN: 978-0-12-814639-2.
- Escalante-Aburto, A., Ramírez-Wong, B., Torres-Chávez, P.I., Figueroa-Cárdenas, J.D., López-Cervantes, J., Barrón-Hoyos, J.M., and Morales-Rosas, I. 2013. Effect of extrusion processing parameters on anthocyanin content and physicochemical properties of nixtamalized blue corn expanded extrudates. *CyTA - Journal of Food* 11(sup1): 29-37.
- Espinoza-Moreno, R.J., Reyes-Moreno, C., Milán-Carrillo, J., López-Valenzuela, J.A., Paredes-López, O., and Gutiérrez-Dorado, R. 2016. Healthy ready-to-eat expanded snack with high nutritional and antioxidant value produced from whole amarantin transgenic maize and common black bean. *Plant Foods for Human Nutrition* 71:218-224.
- FAO. 2013. Findings and Recommendations of the 2011 FAO

- Expert Consultation on Protein Quality Evaluation in Human Nutrition. In: "Dietary Protein Quality Evaluation in Human Nutrition: Report of an FAO Expert Consultation." FAO Food and Nutrition Paper 92. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy, Chapter 4, pp. 29.
- Gamel, T.H., Linssen, J.P., Mesallam, A.S., Damu, A.A., and Shekib, L.A. 2006. Effect of seed treatments on the chemical composition of two amaranth species. Oil, sugars, minerals, and vitamins. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80:82-89.
- Gaxiola-Cuevas, N., Mora-Rochín, S., Cuevas-Rodríguez, E.O., León-López, L., Reyes-Moreno, C., Montoya-Rodríguez, A., and Milán-Carrillo A. 2017. Phenolic acids profiles and cellular antioxidant activity in tortillas produced from Mexican maize landrace processed by nixtamalization and lime extrusion cooking. *Plant Foods for Human Nutrition* 72(3):314-320.
- Guzmán-Gerónimo, R.I., Alarcón-Zavaleta, T.M., Oliart-Ros, R.M., Meza-Alvarado, J.E., Herrera-Meza, S., and Chávez-Servia, J.L. 2017. Blue maize extract improves blood pressure, lipid profiles, and adipose tissue in high-sucrose diet-induced metabolic syndrome in rats. *Journal of Medicinal Food* 20(2):110-115.
- Hajimehdipoor, H., Shahrestani, R., and Shekarchi, M. 2014. Investigating the synergistic antioxidant effects of some flavonoid and phenolic compounds. *Research Journal of Pharmacognosy* 1(3):35-40.
- INEGI. 2019. Características de las Defunciones Registradas en México durante 2018. Comunicado de Prensa No 538/19, 31 de octubre de 2019. Dirección de Atención a Medios/Dirección Gral Adjunta de Comunicación: comunicacionsocial@inegi.org.mx
- Inyang, U.E., Akindolu, B.E., and Elijah, A.I. 2019. Nutrient composition, amino acid profile, and antinutritional factors of nixtamalized maize flour supplemented with sprouted soybean flour. *European Journal of Nutrition and Food Safety* 9: 41-51.
- Khan, W., Parveen, R., Chester, K., Parveen, S., and Ahmad, S. 2017. Hypoglycemic potential of aqueous extract of *Moringa oleifera* leaf and *in vivo* GC-MS metabolomics. *Frontiers in Pharmacology* 8: Article 577.
- León-López, L., Reyes-Moreno, C., Ley-Osuna, A.H., Perales-Sánchez, J.X.K., Milán-Carrillo, J., Cuevas-Rodríguez, E.O., and Gutiérrez-Dorado, R. 2019. Improvement of nutritional and nutraceutical value of nixtamalized maize tortillas by addition of extruded chia flour. *Biocencia XXI* (3): 56-66.
- López-Mejía, O.A., López-Malo, A., and Palou, E. 2014. Antioxidant capacity of extracts from amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) seeds or leaves. *Industrial Crops and Products* 53:55-59.
- Massaretto, I.L., Madureira-Alves, M.F., Mussi de Mira, N.V., Carmona, A.K., and Lanfer-Marquez, U.M. 2011. Phenolic compounds in raw and cooked rice (*Oryza sativa* L.) and their inhibitory effect on angiotensin I-converting enzyme activity. *Journal of Cereal Science* 54:263-240.
- Milán-Carrillo, J., Gutiérrez-Dorado, R., Perales-Sánchez, J.X.K., Cuevas-Rodríguez, E.O., Ramírez-Wong, B., and Reyes-Moreno, C. 2006. The optimization of the extrusion process when using maize flour with a modified amino acid profile for making tortillas. *International Journal of Food Science and Technology* 41:727-736.
- Milán-Carrillo, J., Montoya-Rodríguez, A., Gutiérrez-Dorado, R., Perales-Sánchez, J.X.K., and Reyes-Moreno, C. 2012. Optimization of extrusion process for producing high antioxidant instant amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) flour using response surface methodology. *Applied Mathematics* 3:1516-1525.
- Montoya-Rodríguez, A., Milán-Carrillo, J., Reyes-Moreno, C., and González de Mejía, E. 2015. Characterization of peptides found in unprocessed and extruded amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) pepsin/pancreatin hydrolysates. *International Journal of Molecular Sciences* 16:8536-8554.
- Mora-Rochín, S., Gutiérrez-Urbe, J.A., Serna-Saldívar, S.O., Sánchez-Peña, P., Reyes-Moreno, C., and Milán-Carrillo, J. 2010. Phenolic content and antioxidant activity of tortillas produced from pigmented maize processed by conventional nixtamalization or extrusion cooking. *Journal of Cereal Science* 52:502-508.
- Alu'datt, M.H., Rababah, T., Alhamad, M.N., Al-Ghzawi, A.L.A., Ereifej, K., Gammoh, S., Almajwal, A., Hussein, N.M., and Rawshadeh, M. 2017. Optimization, characterization and biological properties of phenolic compounds extracted from *Rosmarinus officinalis*. *Journal of Essential Oil Research*, 29(5):375-384.
- Ogrodowska, D., Zadernowski, R., Czaplicki, S., Derewiaka, D., and Wronowska, B. 2014. Amaranth seeds and products: The source of bioactive compounds. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* 64(3):165-170.
- Orona-Tamayo, D., and Paredes-López, O. 2016. Amaranth - Sustainable Crop for the 21st Century: Food Properties and Nutraceuticals for Improving Human Health. In: "Sustainable Protein Sources," 1<sup>st</sup> edition, Nadathyr S (ed), Elsevier Publishers, Chapter 19, pp 239-256.
- Orsini-Delgado, M.C., Nardo, A., Pavlovic, M., Rogniaux, H., Añon, M.C., and Tironi, V.A. 2016. Identification and characterization of antioxidant peptides obtained by gastrointestinal digestion of amaranth proteins. *Food Chemistry* 197:1160-1167.
- Ortiz-Cruz, R.A., Ramírez-Wong, B., Ledesma-Osuna, A.I., Torres-Chávez, P.I., Sánchez-Machado, D.I., Montaña-Leyva, B., López-Cervantes, J., and Gutiérrez-Dorado, R. 2020. Effect of extrusion processing conditions on the phenolic compound content and antioxidant capacity of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) Bran. *Plant Foods for Human Nutrition* 75(2):252-257.
- Pacheco de Delahaye, E., and Portillo, M. 1990. Enrichment of precooked white corn flour (*Zea mays*) with amaranth seed flour (*Amaranthus* sp). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 40(3):360-368.
- Peyrat-Maillard, M.N., Cuvelier, M.E., and Berset, C. 2003. Antioxidant Activity of Phenolic Compounds in 2,2'-Azobis (2-amidinopropane) Dihydrochloride (AAPH)-Induced Oxidation: Synergistic and Antagonistic Effects. *Journal of American Oil Chemist's Society* 80(10):1007-1012.
- Pineda-Hidalgo, K.V., Mendez-Marroquin, K.P., Vega-Alvarez, M., Chávez-Ontiveros, J., Sanchez-Peña, P., Garzon-Tiznado, J.A., Vega-García, M.O., and López-Valenzuela, J.A. 2013. Microsatellite-based genetic diversity among accessions of native landraces from Sinaloa in Mexico. *Hereditas* 150:53-59.
- Quiroga, A.V., Aphalo, P., Nardo, A.E., and Añon, M.C. 2017. *In vitro* modulation of the renin-angiotensin system enzymes

- by amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) protein-derived peptides: Alternative mechanisms different from ACE inhibition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65(34):7415-742.
- Ramírez-Jaspeado, R., Palacios-Rojas, N., Funes, J., Pérez, S., and Donnet, M.L. 2018. Identification of potential areas in Mexico for intervention with biofortified high-zinc maize. *Revista Fitotecnia Mexicana* 41(3): 327-337.
- Ramos-Enríquez, J.R., Ramírez-Wong, B., Robles-Sánchez, R.M., Robles-Zepeda, R.E., González-Aguilar, G.A., and Gutiérrez-Dorado R. 2018. Effect of extrusion conditions and the optimization of phenolic compound content and antioxidant activity of wheat bran using response surface methodology. *Plant Foods for Human Nutrition* 73:228-234.
- Rathod, R.P., and Annature, U.S. 2016. Effect of extrusion process on antinutritional factors and protein and starch digestibility of lentil splits. *LWT - Food Science and Technology* 66: 114-123.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., and Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26:1231-1237.
- Sabbione, A.C., Rinaldi, G., Añon, M.C., and Scilingo, A.A. 2016. Antithrombotic effects of 'Amaranthus hypochondriacus' proteins in rats. *Plant Foods for Human Nutrition* 71(1):19-27.
- Salas-López, F., Gutiérrez-Dorado, R., Milán-Carrillo, J., Cuevas-Rodríguez, E.O., Canizalez-Román, V.A., León-Sicairos, C.R., and Reyes-Moreno, C. 2018. Nutritional and antioxidant potential of a desert underutilized legume tepary bean (*Phaseolus acutifolius*). Optimization of germination bioprocess. *Food Science and Technology (Campinas)* 38(Suppl. 1):254-262.
- Sánchez, G.J.J., Goodman, M.M., and Stuber, C.W. 2000. Isozymatic and morphological diversity in the races of maize of México. *Economic Botany* 54:43-59.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., and Lamuela-Raventos, R.M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* 299:152-178.
- Tovar-Perez, E.G., Lugo-Radillo, A., and Aguilera-Aguirre, S. 2019. Amaranth grain as a potential source of biologically active peptides: A review of their identification, production, bioactivity, and characterization. *Food Reviews International* 35(3):221-245.
- Treviño-Mejía, D., Luna-Vital, D.A., Gaytán-Martínez, M., Mendoza, S., and Loarca-Piña, G. 2016. Fortification of commercial nixtamalized maize (*Zea mays* L) with common bean (*Phaseolus vulgaris* L) increased the nutritional and nutraceutical content of tortillas without modifying sensory properties. *Journal of Food Quality* 39:569-579.
- Urias-Lugo, D.A., Heredia, J.B., Muy-Rangel, M.D., Valdez-Torres, J.B., Serna-Saldívar, S.O., and Gutiérrez-Urbe, J.A. 2015. Anthocyanins and phenolic acids of hybrid and native blue maize (*Zea mays* L.) extracts and their antiproliferative activity in mammary (MCF7), liver (HepG2), colon (Caco2 and HT29) and prostate (PC3) cancer cells. *Plant Foods for Human Nutrition* 70(2):193-199.
- Vázquez-Rodríguez, J.A., Amaya-Guerra, C.A., Báez-González, J.G., Nuñez-González, M.A., and Figueroa-Cárdenas, J.D. 2013. Study of the fortification with bean and amaranth flours in nixtamalized maize tortilla. *CyTA - Journal of Food* 11(supl 1):62-66.
- Velarde-Salcedo, A.J., Bojorquez-Velázquez, E., and Barba de la Rosa, A.P. 2019. Pseudo Cereal Grains, Whole Food Nutrition Amaranth. In: "Whole Grains and their Bioactives: Composition and Health", Johnson J, Wallace T (eds), West Sussex, UK, pp 211-250.
- WHO. 2019. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases>



## Análisis de crecimiento de epazote (*Chenopodium ambrosioides* L.) cultivado en invernadero

Mexican tea (*Chenopodium ambrosioides* L.) growth analysis under greenhouse conditions

Cid Aguilar-Carpio<sup>1</sup>, Sergio V. González-Maza<sup>2</sup>, Porfirio Juárez-López<sup>2\*</sup>, Irán Alia-Tejaca<sup>3</sup>, Francisco Palemón-Alberto<sup>3</sup>, Yasmani R. Arenas-Julio<sup>4</sup>, Alberto S. Escalante-Estrada<sup>5</sup>

<sup>1</sup> IDAGRO S de RL de CV, Carretera Yauteppec-Tlayacapan, SN. Tlayacapan, Morelos, México.

<sup>2</sup> Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos, México.

<sup>3</sup> Facultad de Ciencias Agropecuarias y Ambientales, Universidad Autónoma de Guerrero. Periférico poniente s/n, Colonia Villa de Guadalupe, Guerrero. CP. 40020, Iguala, Guerrero.

<sup>4</sup> Instituto de Ciencias Agropecuarias y Rurales. Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca, Estado de México.

<sup>5</sup> Programa de Botánica. Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados. Km 36.5 Carretera México-Texcoco. Montecillo, Estado de México.

### ABSTRACT

The Mexican tea (*Chenopodium ambrosioides* L.) is an aromatic and medicinal plant. Information on its growth dynamics and mineral nutrition for its production is insufficient, therefore, the objective of the study was to evaluate the effect of three concentrations of the Steiner nutrient solution on the growth and production of Mexican tea grown under greenhouse conditions. The study was conducted in Cuernavaca, Morelos, Mexico; with the genotype H-1000 (Hortaflo<sup>®</sup>) grown in tezontle as substrate. Three concentrations (50, 75 and 100 %) of the Steiner nutrient solution were applied to evaluate the growth of the crop by means of destructive samplings at 39, 46, 53, 60, 67 and 74 days after sowing; in each sampling, the following were determined: plant height, leaf area, leaf area index (LAI), weight of fresh matter, weight of dry matter, crop growth rate (CGR), absolute growth rate (AGR), and production per plant. A regression analysis was performed on the variables with the Excel<sup>®</sup> program, and for the case of production per plant, an analysis of variance and Tukey's mean test ( $P \leq 0.05$ ) were performed. The highest height and production in the Mexican tea crop grown in a greenhouse and with inorganic substrate was obtained with Steiner's nutrient solution at 100 %, which coincided with the highest CGR, AGR and LAI values, and whose equations were adjusted to a quadratic model. The results obtained suggest the use of Steiner's 100 % nutrient solution to obtain the best productivity in this aromatic and medicinal plant.

**Keywords:** crop nutrition, dry matter, yield, medicinal plant.

### RESUMEN

El epazote (*Chenopodium ambrosioides* L.) es una planta aromática y medicinal. La información sobre su dinámica de crecimiento y nutrición mineral para su producción es insuficiente, por lo que, el objetivo del estudio fue evaluar el efecto de tres concentraciones de la solución nutritiva Steiner sobre el crecimiento y producción de epazote cultivado en invernadero. El estudio se realizó en Cuernavaca, Morelos, México; con el genotipo H-1000 (Hortaflo<sup>®</sup>) cultivado en tezontle como sustrato. Se aplicaron tres concentraciones (50, 75 y 100 %) de la solución nutritiva Steiner para evaluar

el crecimiento del cultivo mediante muestreos destructivos a los 39, 46, 53, 60, 67 y 74 días después de la siembra; en cada muestreo se determinó: altura de planta, área foliar, índice de área foliar (IAF), peso de materia fresca, peso de materia seca, tasa de crecimiento del cultivo (TCC), tasa absoluta de crecimiento (TAC) y producción por planta. A las variables se les realizó un análisis de regresión con el programa Excel<sup>®</sup>, y para el caso de producción de epazote por planta se realizó análisis de varianza y prueba de medias de Tukey ( $P \leq 0.05$ ). La mayor altura y producción en el cultivo de epazote cultivada en invernadero y con sustrato inorgánico se obtuvo con la solución nutritiva de Steiner a 100 %, lo cual coincidió con los valores más altos de la TCC, la TAC y el IAF, y cuyas ecuaciones se ajustaron a un modelo cuadrático. Con los resultados obtenidos, se sugiere emplear la solución nutritiva de Steiner a 100 % para obtener la mejor productividad en esta planta aromática y medicinal.

**Palabras clave:** nutrición de cultivos, materia seca, rendimiento, planta medicinal.

### INTRODUCCIÓN

El crecimiento es un incremento irreversible en el tamaño de las plantas el cual a menudo es acompañado por cambios en la forma, es decir, es un aumento constante en el tamaño acompañado de procesos como la morfogénesis y la diferenciación celular. El crecimiento es un proceso fisiológico complejo, que depende de la fotosíntesis, la respiración, la división celular, la elongación, la diferenciación, entre otros, y que además está influenciada por factores como temperatura, intensidad de luz, densidad de población, y disponibilidad de agua y de nutrimentos (Taiz *et al.*, 2014).

El análisis de crecimiento usa medidas directas tales como material seca de la planta, área foliar total y tiempo; y medidas derivadas que pueden ser obtenidas a partir de las medidas directas, como la tasa de crecimiento del cultivo (TCC), que es un índice de la productividad agrícola el cual mide la ganancia en peso de un cultivo por unidad de área de suelo y por unidad de tiempo; el índice del área foliar (IAF), que representa la relación entre el área foliar y el área de suelo ocupada por el cultivo; así como la tasa absoluta

\*Autor para correspondencia: Porfirio Juárez-López  
Correo electrónico: porfirio.juarez@uaem.mx

Recibido: 15 de noviembre de 2020

Aceptado: 7 de marzo de 2021

de crecimiento (TAC) que se refiere al incremento en peso seco de la planta por unidad de tiempo (Escalante-Estrada y Kohashi-Shibata, 2015; Santos-Castellanos *et al.*, 2010).

Por otro lado, el epazote (*Chenopodium ambrosioides* L.) es una planta aromática y medicinal nativa de Mesoamérica y Sudamérica que se utiliza como alimento y condimento. La palabra "epazote" proviene del Nahuatl *epatl*, hierba fétida y *tzotl* dulce, debido al olor que emana esta planta y que son originados por monoterpenoides, sesquiterpenoides y flavonoides (Blanckaert *et al.*, 2012; Jaramillo *et al.*, 2012). La importancia de estudiar plantas medicinales es que tienen propiedades antioxidantes que pueden favorecer la salud humana (Graciano-Cristóbal *et al.*, 2020; Vidal-Gutiérrez *et al.*, 2020). En México, en el año 2019 se cosecharon 166.1 ha de epazote fresco con una producción anual de 1,833.7 t y un rendimiento promedio de 11.04 t ha<sup>-1</sup>; los principales estados productores fueron Puebla, Tlaxcala y Estado de México (SIAP, 2020).

Existen estudios en epazote que se enfocan en la morfología, histología, actividad toxicológica y farmacológica de la planta (Blanckaert *et al.*, 2011; Gómez-Castellanos, 2008; Nascimento *et al.*, 2006), así como en la bioactividad del aceite esencial del epazote en hongos fitopatógenos (Jaramillo *et al.*, 2012), sin embargo, no se encontraron reportes en la literatura acerca de estudios de análisis de crecimiento en este cultivo.

En adición a lo anterior, la mayoría de los estudios de análisis de crecimiento se han enfocado principalmente en cereales como maíz (Aguilar-Carpio *et al.*, 2015; Sánchez-Torres *et al.*, 2012) y trigo (Hernández-Córdova *et al.*, 2015); también en hortalizas como tomate rojo (Barraza *et al.*, 2015), uchuva (Aguilar-Carpio *et al.*, 2018), chile jalapeño (Azofeifa y Moreira, 2004), papa (Santos-Castellanos *et al.*, 2010), acelga, betabel, cebolla, espinaca, lechuga, pepino y zanahoria (Barrientos-Llanos *et al.*, 2012), pero hacen falta estudios que consideren plantas aromáticas y medicinales, como es el caso del epazote y que además asocien la nutrición mineral con el análisis de crecimiento del cultivo, por lo que el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de tres concentraciones de la solución nutritiva Steiner sobre el crecimiento y producción en el cultivo de epazote en condiciones de invernadero.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en Cuernavaca, Morelos, México (18° 58' 51" latitud norte y 99° 13' 55" longitud oeste a 1866 msnm), de abril a julio de 2018. El 28 de abril se sembraron semillas de epazote del genotipo H-1000 de la empresa Hortaflo<sup>®</sup> las cuales se colocaron cinco semillas por cada maceta. La emergencia ocurrió a los 5 días después de la siembra (dds), y a los 14 días se realizó un raleo para finalmente dejar una planta por maceta.

Los tratamientos fueron concentraciones: 50, 75 y 100 % de la solución nutritiva de Steiner (1984) (Tabla 1). El diseño experimental fue completamente al azar con nueve repeticiones. La unidad experimental estuvo conformada por

**Tabla 1.** Composición química de las tres concentraciones (tratamientos) de la solución nutritiva Steiner.

**Table 1.** Chemical composition of the three Steiner nutrient solution concentrations (treatments).

Concentración de la solución nutritiva (%)	Ca <sup>2+</sup>	K <sup>+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
	mEq L <sup>-1</sup>					
50	4.5	3.50	2.0	6.0	0.50	3.50
75	6.25	5.25	3.0	9.0	0.75	5.25
100	9.00	7.00	4.0	12.0	1.00	7.00

seis macetas de polietileno color negro de 5 L de capacidad, llenadas con tezontle como sustrato, con granulometría de 1 a 8 mm.

Los fertilizantes que se usaron para preparar la solución nutritiva fueron nitrato de calcio, nitrato de potasio, sulfato de magnesio, sulfato de potasio y fosfato monopotásico. Los microelementos se aplicaron mediante mezcla comercial de quelatos (Ultrasol Micro Mix, SQM<sup>®</sup>), en dosis de 20 g por cada 500 L de solución nutritiva. Para calcular esta dosis se consideró el suministro de 3 ppm de hierro (Fe), ya que la mezcla comercial de micronutrientes contiene las siguientes concentraciones en porcentaje: Fe (7.5), Mn (3.7), B (0.4), Zn (0.6), Cu (0.3), y Mo (0.2). El pH se ajustó entre 5.5 y 6.0 con ácido sulfúrico. La conductividad eléctrica fue de 1.0, 1.5 y 2.0 dS m<sup>-1</sup>, para las concentraciones 50, 75 y 100 %, respectivamente. El riego se realizó diariamente y el aplicado varió 0.25 a 1.5 L por macera en función del crecimiento del cultivo.

Durante el desarrollo del estudio se registró semanalmente la temperatura media (°C) y humedad relativa (%) dentro del invernadero con un registrador de datos ambientales Hobo Modelo U12 (Onset<sup>®</sup>).

El crecimiento del cultivo se evaluó en función de las tres concentraciones de la solución nutritiva de Steiner: 50, 75 y 100%, mediante muestreos destructivos de nueve plantas por tratamiento a los 39, 46, 53, 60, 67 y 74 días después de la siembra (dds); en cada muestreo se midió, la altura de la planta desde la base del tallo hasta el meristemo apical y el área foliar, el cual se determinó con un medidor de área foliar (LI-COR<sup>®</sup> 3100). Con estos datos se calculó el índice de área foliar (IAF), con base en la siguiente ecuación:

$$\overline{\text{IAF}} = \frac{(\text{AF}_2 - \text{AF}_1)}{A}$$

Dónde: AF = área foliar (cm<sup>2</sup>) y A representa el área ocupada por la planta (Rakesh *et al.*, 2017).

También se evaluó el peso de materia fresca (g por planta), la cual estuvo constituida por la biomasa fresca aérea y se cuantificó con una báscula digital (OHAUS<sup>®</sup>), con aproximación de 0.0001 g; asimismo, para el peso de materia seca por planta (MS, g por planta), las muestras que se usaron para peso de materia fresca se secaron a 70 °C en una estufa de circulación de aire forzado hasta peso constante. Con

estos datos se calcularon las tasas medias de: crecimiento del cultivo (TCC) y absoluta de crecimiento (TAC) mediante las ecuaciones:

$$\overline{TCC} = \frac{1}{A} * \left( \frac{PS_2 - PS_1}{T_2 - T_1} \right)$$

Dónde:  $PS_2$  y  $PS_1$  indican el peso de la materia seca de la planta en los tiempos  $T_2$  y  $T_1$ , respectivamente y  $A$  ( $227 \text{ cm}^2$ ) representa el área ocupada por la planta (Aguilar-Carpio *et al.*, 2018).

$$\overline{TAC} = \frac{PS_2 - PS_1}{T_2 - T_1}$$

Dónde:  $PS_2$  y  $PS_1$  indican el peso de la materia seca de la planta en los tiempos  $T_2$  y  $T_1$ , respectivamente (Escalante-Estrada y Kohashi-Shibata, 2015).

Adicionalmente, para determinar la producción de epazote en g por planta, se consideró el peso de materia fresca en el último muestreo, el cual fue a los 74 días después de la siembra (dds).

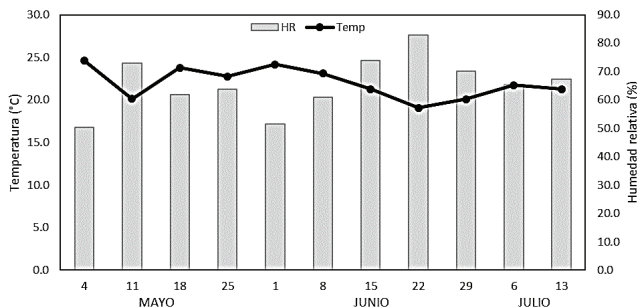
### Análisis estadístico

A las variables en estudio se les realizó un análisis de regresión y se obtuvo la ecuación correspondiente, con el programa Excel®, Microsoft Office de Windows. Para la variable producción de epazote por planta se realizó un análisis de varianza y prueba de medias de Tukey ( $P \leq 0.05$ ) con el programa estadístico de SAS (*Statistical Analysis System*) versión 9.1 (SAS Institute, 2004).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Temperatura y humedad relativa

La media semanal de la temperatura y humedad relativa durante el desarrollo del cultivo que fluctuó entre 19.1 a 24.6 °C y 50.3 a 82.7 %, respectivamente (Figura 1). Estas condiciones ambientales son aproximadas a las de Huidobro-Medina (2013), quien al cultivar epazote en un sistema hidropónico en condiciones de invernadero, reportaron que la temperatura media osciló entre 18 y 26 °C y la humedad relativa entre 60 y 75 %, en el Estado de México. Se ha re-



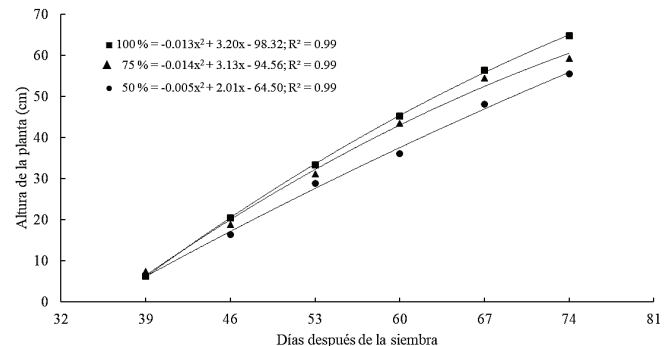
**Figura 1.** Promedios semanales (7 días) de temperaturas (Temp) y humedad relativa (HR) durante el desarrollo del cultivo de epazote.

**Figure 1.** Weekly (7 days) averages of temperature and relative humidity during Mexican tea crop development.

portado que el epazote se adapta a distintos hábitats sobre todo a regiones templadas, semicálidas y cálidas (Huidobro-Medina, 2013; Méndez-Isidro, 2014), lo que permite que las especies de este género se propague y crezca con facilidad en diversos ambientes.

### Altura de la planta

A los 74 dds, la concentración de la solución nutritiva de Steiner al 100 % generó la mayor altura de planta (64.7 cm) con un incremento por día de 3.20 cm en comparación con la concentración de 75 % (59.2 cm) y un incremento por día de 3.13 cm (Figura 2). Es importante señalar, que la solución nutritiva de Steiner al 100 % desde los 46 dds fue superior a la concentración del 50 %, la cual generó una altura de 55.5 cm a los 74 dds. Esto nos indica que la altura de la planta está relacionada con la aportación de los nutrientes esenciales aplicados en el sustrato, lo que posiblemente promovió un aumento en el alargamiento y división celular (Azcón-Bieto y Talón, 2008). Huidobro-Medina (2013) reportó altura promedio de 62 cm en plantas de epazote a los 75 dds en condiciones de invernadero. Por otro lado, Blanckaert *et al.* (2011) encontraron que la altura de epazote osciló de 59 a 109 cm, en etapa vegetativa antes de la floración. En otros cultivos herbáceos, se ha reportado la misma tendencia que la observada en el presente estudio; al respecto, Cruz-Crespo *et al.* (2017) al evaluar concentraciones de la solución nutritiva de Steiner de 25 a 100 % en cilantro a los 50 ddt, reportaron un incremento en altura de 38.9 a 56.8 cm.

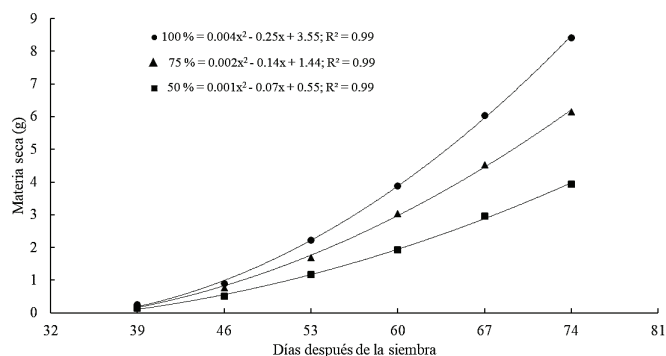


**Figura 2.** Efecto de la solución nutritiva Steiner en la altura de la planta de epazote.

**Figure 2.** Effect of Steiner nutrient solution on the Mexican tea plant height.

### Materia seca, tasa de crecimiento del cultivo (TCC) y tasa absoluta de crecimiento (TAC)

En cuanto a la materia seca, la concentración al 100 % presentó el valor más alto (8.42 g por planta) a los 74 dds, en comparación a la solución a 75 y 50 % (Figura 3). Durante el desarrollo del cultivo, la materia seca por planta presentó un crecimiento progresivo en función del incremento de la solución nutritiva. Las tendencias de la materia seca en las tres concentraciones se ajustaron a un modelo cuadrático. Así, la producción de materia seca por planta por día fue de 0.25 g para la concentración de 100 %, el cual superó a las concentraciones de 75 y 50 % en 0.14 y 0.07 g, respectivamente. Lo anterior, indica que la generación de materia seca

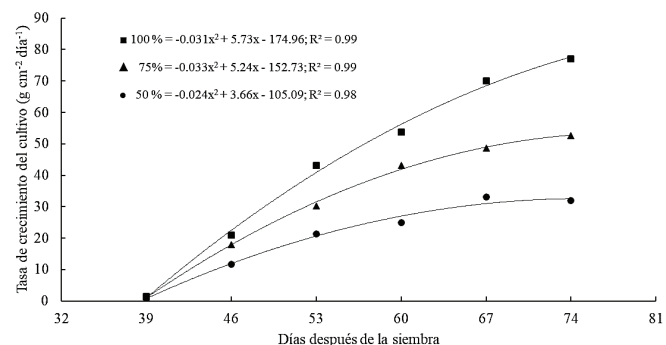


**Figura 3.** Producción de materia seca del cultivo de epazote en función de la concentración de la solución nutritiva Steiner.

**Figure 3.** Dry matter production of Mexican tea crop as a function of the Steiner nutrient solution concentration.

está directamente relacionada con la disponibilidad y aprovechamiento de los nutrientes en el suelo o en el medio de cultivo, con lo cual, resulta una mejor actividad fotosintética (Azcón-Bieto y Talón, 2008). Al respecto, Huidobro-Medina (2013) reportaron materia seca de 9.7 g de epazote a los 75 dds, esos resultados son aproximados a los obtenidos con la concentración de 100 % del presente estudio. Blanckaert *et al.* (2011) reportaron valores mayores de materia seca de epazote (18.18 g), esto posiblemente a las condiciones en que se desarrolló el cultivo, así como del genotipo utilizado. Los resultados obtenidos son similares a los reportados por Cruz-Crespo *et al.* (2017), quienes encontraron que la solución nutritiva Steiner a 100 % de concentración generó el mayor peso seco en plantas de cilantro, durante su crecimiento.

En la tasa de crecimiento del cultivo (TCC) se observó un aumento diferencial por efecto de las tres concentraciones aplicadas (Figura 4). Al igual que las variables mencionadas previamente, estos incrementos se ajustaron a un modelo cuadrático. La concentración a 100 % causó una mayor producción de materia seca por área sembrada por día ( $5.73 \text{ g cm}^{-2} \text{ día}^{-1}$ ), respecto a la concentración al 75 % ( $5.24 \text{ g cm}^{-2} \text{ día}^{-1}$ ) y 50 % ( $3.66 \text{ g cm}^{-2} \text{ día}^{-1}$ ), lo que puede atribuirse a una mejor eficiencia de la planta para producir materia seca con la solución nutritiva de Steiner a 100 %. En la concentración a 100 %, la TCC fue superior desde los 46 dds, respecto a la

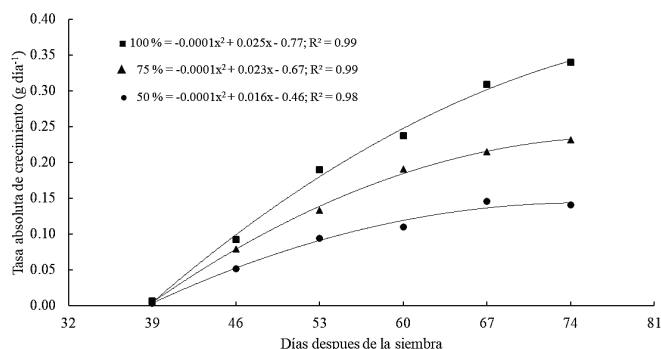


**Figura 4.** Dinámica de la tasa de crecimiento del cultivo de epazote en función de la concentración de la solución nutritiva Steiner.

**Figure 4.** Crop growth rate dynamics of Mexican tea crop as a function of the Steiner nutrient solution concentration.

de 50 %. La máxima formación de materia seca se observó a los 74 dds con  $77.14 \text{ g cm}^{-2} \text{ día}^{-1}$  con la concentración al 100 %. En la literatura no se encontraron reportes de tasas de crecimiento del cultivo en epazote, sin embargo, Del Pozo *et al.* (2001) obtuvieron mayor TCC con la aplicación nitrógeno en pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*); esta tendencia es similar en los resultados en el presente estudio, ya que al incrementar el suministro de nutrientes se estimuló de forma positiva la velocidad de crecimiento del cultivo.

En la tasa absoluta de crecimiento se observó que la más alta acumulación de materia seca por día se presentó a los 74 dds (Figura 5), con la solución nutritiva de Steiner al 100 % ( $0.340 \text{ g día}^{-1}$ ), en comparación con la concentración al 75 % ( $0.232 \text{ g día}^{-1}$ ) y al 50 % ( $0.140 \text{ g día}^{-1}$ ). La TAC se ajustó a un modelo polinómico de segundo grado, donde con la concentración al 100 % se incrementó el peso de la materia seca en  $0.025 \text{ g día}^{-1}$ , lo que indica una mayor acumulación de materia seca, debido a un mejor aprovechamiento de los recursos nutrimentales, y esto a su vez, se relaciona con un incremento en el dosel vegetal.



**Figura 5.** Dinámica de la tasa absoluta de crecimiento del cultivo de epazote en función de la concentración de la solución nutritiva Steiner.

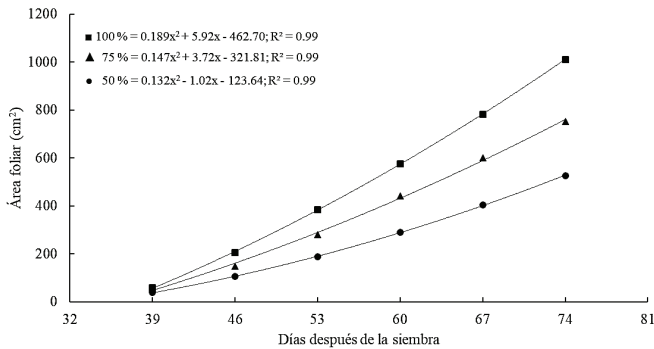
**Figure 5.** Absolute growth rate dynamics of the Mexican tea crop as a function of the Steiner nutrient solution concentration.

### Área foliar e índice de área foliar

El área foliar se afectó positivamente a medida que se aumentaron las concentraciones de la solución nutritiva (Figura 6). Esta respuesta en las tres soluciones se ajustó a un modelo cuadrático. Puede apreciarse que, en la concentración a 100 %, se produjo la mayor área foliar por día ( $5.92 \text{ cm}^2 \text{ día}^{-1}$ ), respecto a la concentración a 75 % ( $3.72 \text{ cm}^2 \text{ día}^{-1}$ ) y a 50 % ( $1.02 \text{ cm}^2 \text{ día}^{-1}$ ). Esta respuesta está asociada al estado nutrimental de la planta, el cual promovió un aumento en el aparato fotosintético, y en consecuencia una mayor formación de hojas. Cabe señalar, que la máxima expansión foliar se pudo observar a los 74 dds con la solución nutritiva al 100 % ( $1,011.9 \text{ cm}^2$ ). Estos resultados coinciden con lo reportado por Huidobro-Medina (2013) quien al aplicar la solución nutritiva Hidro-FESI encontraron área foliar promedio de  $992 \text{ cm}^2$  en plantas de epazote cultivadas en condiciones de invernadero.

En cuanto al índice de área foliar (IAF), al aplicar la concentración a 100 % se observó un IAF de 1.0 a los 74 dds, siendo el más alto en comparación a las concentraciones de

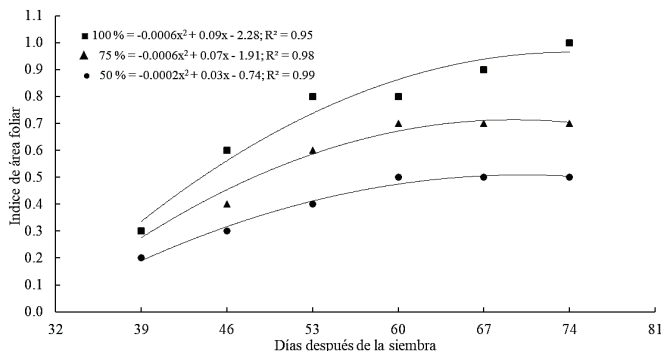




**Figura 6.** Efecto de la solución nutritiva Steiner en el área foliar en el cultivo de epazote.

**Figure 6.** Effect of Steiner nutrient solution on leaf area in the Mexican tea crop.

75 % y de 50 % (Figura 7). Los menores IAF durante el ciclo de cultivo fueron obtenidos con la solución Steiner al 50 %, donde el IAF fue de 0.5 desde los 60 hasta los 74 dds, la concentración y periodo antes mencionado fue superado por la solución nutritiva al 100% con un IAF (0.6) desde los 53 dds, lo que indica que la disponibilidad de los nutrimentos favoreció el incremento en la producción del área foliar por unidad de superficie de suelo en un periodo más corto. Fghire *et al.* (2017) en plantas de *Chenopodium quinoa* reportó IAF entre 1.9 a 3.13 en diferentes genotipos, estas diferencias se deben principalmente a los genotipos utilizados.

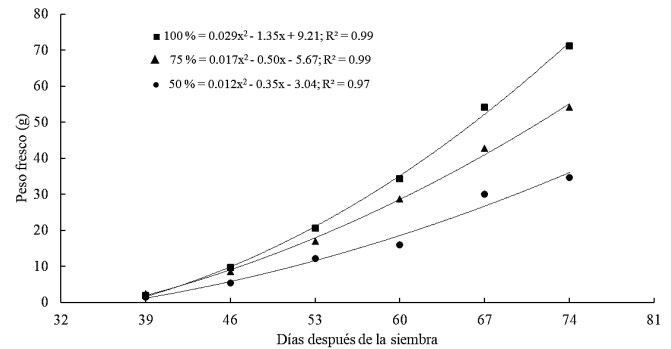


**Figura 7.** Índice de área foliar en el cultivo de epazote en función de la concentración de la solución nutritiva Steiner.

**Figure 7.** Leaf index area of the Mexican tea crop as a function of the Steiner nutrient solution concentration.

### Peso materia fresca

El valor más alto de eso de materia fresca, (Figura 8), se obtuvo a los 74 dds con la concentración de 100 % (71.2 g por planta), seguido de la concentración al 75 % (54.1 g por planta) y la de 50 % (34.7 g por planta). Esto indica que a medida que se incrementó la concentración de la solución nutritiva también se obtuvo una mejor producción en el peso fresco del cultivo. Dicha respuesta está determinada por un aumento en el dosel vegetal estimulado por la solución Steiner que produce un efecto en la expansión foliar. Al respecto, Cruz-Crespo *et al.* (2017) indican que a medida que se incrementa la concentración de la solución Steiner también aumenta la materia fresca en plantas de cilantro, y reportaron la mayor biomasa fresca con la concentración al 100 %, a los 90 dds. En



**Figura 8.** Peso fresco del cultivo de epazote en función de la concentración de la solución nutritiva Steiner.

**Figure 8.** Fresh weight of the Mexican tea crop as a function of the Steiner nutrient solution concentration.

contraste, Juárez-Rosete *et al.* (2019) encontraron que al aplicar el 100 % de la solución Steiner, el peso fresco en orégano disminuyó en comparación al 75 %, lo cual fue atribuido a una excesiva nutrición que induce limitaciones de absorción nutrimental, lo que dificulta la absorción de iones por la raíz. Estos resultados confirman que las concentraciones de la solución nutritiva pueden afectar de manera diferencial el crecimiento de las plantas, en función de la especie.

En general, con las concentraciones de la solución nutritiva a 100 % se obtuvieron los mejores resultados en todas las variables evaluadas, en comparación a la concentración a 75 y 50 %. Este comportamiento puede deberse a que la concentración de N-nitrato corresponde a 6, 9 y 12 mEq L<sup>-1</sup> en las concentraciones de la solución a 50, 75 y 100 %, respectivamente (Cuadro 1). Al respecto, el nitrógeno (N) es el elemento más requerido por las plantas, ya que representa de 1 a 5 % de la materia seca total, y es constituyente integral de proteínas, ácidos nucleicos, clorofila, coenzimas, fitohormonas y metabolitos secundarios (Hawkesford *et al.*, 2012); asimismo, dosis óptimas de nitrógeno mejoran el proceso fotosintético, área foliar y materia seca total, factores que son determinantes para la producción de los cultivos (Leghari *et al.*, 2016).

De acuerdo con los resultados encontrados, se sugiere emplear la solución nutritiva de Steiner a 100 % en el cultivo de epazote, ya que presentó la mayor producción del dosel vegetal en comparación a 75 y 50 % de concentración.

### Producción de epazote

Hubo diferencias ( $P \leq 0.05$ ) en la producción de epazote fresco (g por planta). Las plantas con la mayor producción se obtuvieron cuando se regaron con la solución Steiner a 100 % (Figura 9). Cabe señalar, que a medida que se incrementó la concentración de la solución nutritiva, también la producción por planta aumentó. Esta respuesta puede atribuirse a una mayor disponibilidad y aprovechamiento nutrimental, lo cual influyó directamente sobre la producción de la planta de epazote, como también se ha reportado en cilantro cultivado en tezontle y con solución nutritiva de Steiner (Cruz-Crespo *et al.*, 2017).

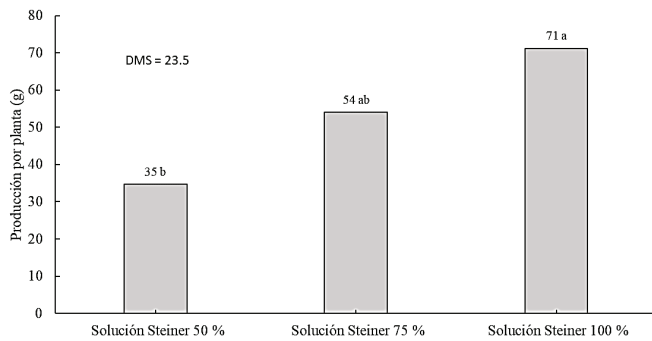


Figura 9. Producción por planta de epazote fresco en función de la concentración de la solución nutritiva de Steiner.

Figure 9. Plant production of fresh Mexican tea as a function of the Steiner nutrient solution concentration.

## CONCLUSIONES

La mayor altura y producción en el cultivo de epazote cultivado en invernadero y con sustrato inorgánico se obtiene con la solución nutritiva de Steiner a 100 %, lo cual coincide con los valores más altos de la tasa de crecimiento del cultivo, la tasa absoluta de crecimiento y el índice de área foliar, y cuyas ecuaciones se ajustan a un modelo cuadrático. Con los resultados obtenidos, se sugiere emplear la solución nutritiva de Steiner a 100 % para obtener la mejor productividad en esta planta aromática y medicinal.

## REFERENCIAS

- Aguilar Carpio, C., Juárez-López, P., Campos-Aguilar I.H., Alia-Tejagal, I., Sandoval-Villa, M. y López-Martínez, V. 2018. Análisis de crecimiento y rendimiento de uchuva (*Physalis peruviana* L.) cultivada en hidroponía e invernadero. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 24: 191-202.
- Aguilar-Carpio, C., Escalante-Estrada, J.A.S. y Aguilar-Mariscal, I. 2015. Análisis de crecimiento y rendimiento de maíz en clima cálido en función del genotipo, biofertilizante y nitrógeno. *Terra Latinoamericana* 33: 51-62.
- Azofeifa, Á., Moreira, M. 2004. Análisis de crecimiento del chile jalapeño (*Capsicum annuum* L. cv. Hot), en Alajuela, Costa Rica. *Agronomía Costarricense*. 28: 57-67.
- Azcón-Bieto, J. y Talón, M. 2008. *Fundamentos de Fisiología Vegetal* (2ª. ed.). McGraw-Hill. Madrid, España. 651 p.
- Blanckaert, I., Paredes-Flores, M., Espinosa-García, F.J., Piñero, D. y Lira, R. 2012. Ethnobotanical, morphological, phytochemical and molecular evidence for the incipient domestication of Epazote (*Chenopodium ambrosioides* L.: Chenopodiaceae) in a semi-arid region of México. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 59: 557-573.
- Barraza, F.V., Fischer, G., Cardona, C.E. 2004. Estudio del proceso de crecimiento del cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en el Valle del Sinú medio, Colombia *Agronomía Colombiana*. 22: 81-90.
- Barrientos-Llanos, H., del-Castillo-Gutiérrez, C.R., García-Cárdenas, M. 2015. Análisis de crecimiento funcional, acumulación de biomasa y translocación de materia seca de ocho hortalizas cultivadas en Invernadero. *Revista de Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales*. 2: 76-86.
- Cruz-Crespo, E., Can-Chulim, A., Loera-Rosales, J., Aguilar-Benítez, G., Pineda-Pineda, J. y Bugarín-Montoya, R. 2017. Extracción de N-P-K en *Coriandrum sativum* "Pakistan" en hidroponía. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 8: 355-367.
- Del Pozo, P.P., Herrera, R.S., García, M., Cruz, A.M. y Romero, A. 2001. Análisis de crecimiento y desarrollo del pasto estrella con y sin adición de fertilizante nitrogenado. *Revista Cubana de Ciencias Agrícolas*. 35: 51-58.
- Escalante-Estrada, A.S. y Kohashi-Shibata, J. 2015. El rendimiento y crecimiento del frijol. Manual para la toma de datos. Colegio de Postgraduados, Montecillo, México. 84 p.
- Fghire, R., Anaya, F., Issa, O.A. y Wahbi, S. 2017. Physiological and growth response traits to water deficit as indicators of tolerance criteria between quinoa genotypes. *Journal of Materials and Environmental Sciences*. 8: 2084-2096.
- Gómez-Castellanos, J.R. 2008. Epazote (*Chenopodium ambrosioides* L.). Revisión a sus características morfológicas, actividad farmacológica, y biogénesis de su principal principio activo, ascaridol. *Boletín Latinoamericano y de Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 7: 3-9.
- Graciano-Cristóbal, M.J., Sumaya-Martínez, M.T., Rodríguez-Carpena, J.G., Bautista-Rosales, P.U., Jiménez-Ruiz, E.I., Sánchez-Herrera, L.M., López-Nahuatt, G. 2020. Impacto en la formación de acrilamida a partir de aditivos de especias culinarias con actividad antioxidante. *Biotecnia*. 22: 128-135.
- Hawkesford, M., Horst, W., Kichey, T., Lambers, H., Schjoerring, J., Moller, I.S. y White, P. 2012. Functions of macronutrients. In P. Marschner (Ed.), *Marschners's Mineral Nutrition of higher plants* (3rd ed., pp. 135-189). USA: Academic press.
- Hernández-Córdova, N., Soto-Carreño, F., Plana-Llerena, R. 2015. Comportamiento del crecimiento y rendimiento del cultivo del trigo (*Triticum aestivum* L.) en tres fechas de siembra. *Cultivos Tropicales*. 36: 86-92.
- Huidobro-Medina, E.S. 2013. Establecimiento del cultivo hidropónico y evaluación de actividad biológica de epazote (*Teloxys ambrosioides* Weber). Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Los Reyes Iztacala, Estado de México. 76 p.
- Méndez-Isidro, M. 2014. Distribución potencial del epazote (*Chenopodium ambrosioides*: Chenopodiaceae). Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Los Reyes Iztacala, Estado de México. 33 p.
- Jaramillo, B.E., Duarte, R.E. y Delgado, W. 2012. Bioactividad del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* L. colombiano. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 17: 54-64.
- Juárez-Rosete, C.R., Aguilar-Castillo, J.A., Aburto-González, C.A. y Alejo-Santiago, G. 2019. Producción de biomasa, requerimiento nutrimental de nitrógeno, fósforo y potasio, y concentración de la solución nutritiva en orégano. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 25: 17-28.
- Laghari, S.J., Wahocho, N.A., Laghari, G.M., Laghari, A.H., Bhabhan, G.M., Talpur, K.H., Bhutto, T.A., Wahocho, S.A. y Lashari, A.A. 2016. Role of nitrogen for plant growth and development: A review. *Advances in Environmental Biology*. 10: 209-218.
- Nascimento, R.F.F., Cruz, G.V.B., Pereira, P.V.S., Maciel, M.C.G., Silva, L.A., Azevedo, A.P.S., Borroqueiro, E.S.B. y Guerra, R.N.M. 2006. Ascitic and solid Ehrlich tumor inhibition by *Chenopodium ambrosioides* L. treatment. *Life Sciences*. 78: 2650-2653.

- Rakesh, P., Vijay, P., Madurima, D., Mahesh, M. y Ramesh, C.M. 2017. Plant Growth Analysis. Manual of ICAR Sponsored Training Programme on "Physiological Techniques to Analyze the Impact of Climate Change on Crop Plant". 103-107 pp.
- Sánchez-Torres, J. D., Ligarreto-Moreno, G.A. y Leiva-Barón, F.R. 2012. Variabilidad del crecimiento y rendimiento del cultivo de maíz para choclo (*Zea mays* L.) como respuesta a diferencias en las propiedades químicas del suelo en la sabana de Bogotá, Colombia. Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín. 65: 6579-6583.
- Santos-Castellanos, M., Segura-Abril, M. y Núñez-López, C.E. 2010. Análisis de crecimiento y relación fuente-demanda de cuatro variedades de papa (*Solanum tuberosum* L.) en el municipio de Zipaquirá (Cudinamarca, Colombia). Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín. 63: 5253-5266.
- SAS Institute. 2004. SAS/STAT User's Guide. Release 9.1. SAS Institute. Cary, North Carolina, USA. 5121 p.
- Steiner, A.A. 1984. The universal nutrient solution. In Proc. 6th International Congress on Soilless Culture (pp: 633-649). ISOSC. Wageningen, The Netherlands.
- SIAP (Sistema de Información Agropecuaria). 2020. Sistema de Información Agropecuaria de Consulta. SAGARPA. México. <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>.
- Taiz, L., E. Zeiger, I. M. Moller and A. Murphy. 2014. Plant Physiology & Development. Sixth Edition. Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA. 756 p.
- Vidal-Gutiérrez, M., Torres-Moreno, H., Velázquez-Contreras, C.A., Rascón-Valenzuela, L.A., Robles-Zepeda, E. 2020. Actividad antioxidante y antiproliferativa de seis plantas medicinales del noroeste de México. Biotencia. 22: 40-45.



# Physicochemical, aromatic, sensory properties and antioxidant activity of roasted coffee (*Coffea arabica* L.) treated with cold plasma technology

Propiedades fisicoquímicas, aromáticas, sensoriales y actividad antioxidante del café tostado (*Coffea arabica* L.) tratado con tecnología de plasma frío

Paloma Patricia Casas-Junco<sup>1</sup>, Juan Arturo Ragazzo-Sánchez<sup>1</sup>, Josué Raymundo Solís-Pacheco<sup>2</sup>, Blanca Rosa Aguilar-Uscanga<sup>2</sup>, Sonia Guadalupe Sáyago-Ayerdi<sup>1</sup>, Montserrat Calderón-Santoyo<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio Integral de Investigación en Alimentos. Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Tepic. Av. Tecnológico #2595, Col. Lagos del Country, C.P. 63175. Tepic, Nayarit, México.

<sup>2</sup> Laboratorio de Microbiología Industrial. Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingeniería. Universidad de Guadalajara, Jalisco, México. Boulevard Marcelino García Barragán #1421, Col. Olímpica, C.P. 44430. Guadalajara, Jalisco, México.

## ABSTRACT

The cold plasma technology has gained popularity in the food industry, since it causes minimal alterations in nutritional content, does not leave chemical residues, and in some cases, does not affect the sensory quality of food. The aim of this research was to evaluate the physicochemical, aromatic, and sensory properties, as well as antioxidant activity of roasted coffee treated with cold plasma technology. Samples were treated with Dielectric Barrier Discharge (DBD) to produce plasma at an input power of 30 W and an output voltage of 850 V, using helium gas (1.5 L min<sup>-1</sup>). The cold plasma was applied at different times (0, 1, 4, 8, 12, 16, 20, 24 and 30 min). Cold plasma treatment showed no significant difference in the color parameter. Moreover, we detected no differences in the aromatic and sensory profile submitted to plasma treatment for 30 min compared with the untreated samples. On the other hand, a 12 % reduction of the total content of soluble polyphenols and an increase of 14 % in the antioxidant capacity were observed in samples treated with cold plasma. This is a novel technology with the potential of ensuring the safety and maintain the sensory characteristics of roasted coffee.

**Keywords:** Dielectric Barrier Discharge (DBD) plasma; reactive species; antioxidant capacity; minimally processed food.

## RESUMEN

La tecnología de plasma frío ha cobrado auge en la industria alimentaria, ya que provoca mínimas alteraciones en el contenido nutricional, no deja residuos químicos y en algunos casos no afecta la calidad sensorial de los alimentos. El objetivo de esta investigación fue evaluar las propiedades fisicoquímicas, análisis sensorial, aromática y actividad antioxidante del café tostado tratado con plasma frío. Las muestras fueron tratadas con descarga de barrera dieléctrica (DBD) con potencia de entrada de 30 W y voltaje de salida de 850 V, usando gas helio (1.5 L min<sup>-1</sup>). El plasma frío fue aplicado en diferentes tiempos (0, 1, 4, 8, 12, 16, 20, 24 y 30 min). El tratamiento con plasma frío no mostró diferencias significativas en el parámetro de color. Además, no se observaron diferencias en el perfil aromático y sensorial sometido a tratamiento con plasma durante 30 min en comparación con las muestras no

tratadas. Por otro lado, se observó una reducción del 12 % del contenido total de polifenoles solubles y un aumento del 14 % en la capacidad antioxidante en muestras tratadas con plasma frío. Esta es una tecnología novedosa con potencial para asegurar la inocuidad y mantener las características sensoriales del café tostado.

**Palabra claves:** Plasma de barrera dieléctrica (DBD); especies reactivas; capacidad antioxidante, alimento mínimamente procesado.

## INTRODUCTION

*Coffea arabica* L. is one of the most popular coffee varieties with 70 % of the global market (Caballero, 2003). Mexico ranked 11<sup>th</sup> among the largest coffee producers worldwide, with 2.4 % of global production (SIAP, 2018). Unfortunately, the coffee quality is affected by environmental, genetic, pre-harvest, and postharvest operations (Haile and Kang, 2019). Casas *et al.* (2017) mention that the fungi *A. niger*, *A. versicolor*, and *Byssochlamys spectabilis* naturally produce Ochratoxin A (OTA) in roasted coffee from Nayarit, Mexico. This toxin represents a health risk for humans and animals since OTA has been reported as carcinogenic (Abdullah Al-Abdalall and Abdullah Al-Talib, 2014).

A promising physical approach for shelf life is the application of non-thermal plasma. Dielectric barrier discharge (DBD) is a plasma generation class characterized by the mode of operation and system configuration which generate ionization of the process gas molecules and the formation of reactive chemical species, such as ions and radicals, heat (gas temperature less than 500 K), and UV light (Keener, 2008).

Various authors have assessed quality attributes like taste, flavor, color, texture, enzymatic activity (peroxide and pectin methylesterase) of fruit and vegetal treated with this technology, showing its potential as an innovative treatment for enzymes inactivation and quality preservation in food products (Lee *et al.*, 2018; Tappi *et al.*, 2016).

Thus, the aim of this work was to evaluate the effect of cold plasma on the phenolic compounds content and antioxidant capacity (AOX), as well as physicochemical, aromatic, and sensorial parameters of roasted coffee (*C. arabica* L.).

\*Autor para correspondencia: Montserrat Calderón Santoyo  
 Correo electrónico: mcalderon@tepic.tecnm.mx



## MATERIALS AND METHODS

### Raw materials

Roasted coffee (*C. arabica* L.) grains produced in Nayarit, Mexico, were obtained from local markets for this study. The coffee had a roasted appearance, an attractive aroma, and a desirable visible coffee quality. Coffee samples were kept in storage in zip-lock bags while awaiting analysis to avoid the loss of volatile compounds.

### Plasma generator equipment

The plasma generating equipment's design and construction correspond to the Plasma Physics Laboratory of the National Institute for Nuclear Research in Toluca, Mexico. The system was made up of the 13.56 MHz radio frequency generator (RF) designed to directly supply a pair of stainless-steel plates in a glass DBD reactor (Peña-Eguiluz *et al.*, 2010).

### Roasted coffee powder treated with cold plasma

Roasted coffee (*C. arabica* L.) grains were pulverized, and 0.5 g of sample was placed on plate Petri on thin layers. They had approximately 1 mm of thickness and were immediately treated with cold plasma energy at atmospheric pressure. Plasma was generated with commercial helium gas (Praxair, Mexico) at a flow of 1.5 L/min, and the energy was applied at different times (0, 1, 4, 8, 12, 16, 20, 24, and 30 min) and 30 W input power and an output voltage of 850 V. Before and after each plasma treatment, we determined antioxidant activity and total polyphenol content. In the case of physicochemical and sensory properties, treatment times were 0 and 30 min.

### Physicochemical quality parameters in roasted coffee

#### Surface color

The color assessment was evaluated with a Hunter Lab MINOLTA Chroma Meter CR300 colorimeter (Hunter Laboratory, México) in the reflectance mode for roasted coffee. The color was expressed as L (brightness), a (redness), and b (yellowness) values. Results were expressed as the average of four measurements. Besides, the total color difference ( $\Delta E$ ) was calculated as below (Kovačević *et al.*, 2016) (Eq. 1):

$$\Delta E = \sqrt{(L_0 - L)^2 + (a_0 - a)^2 + (b_0 - b)^2} \quad (1)$$

Where  $L_0$ ,  $a_0$ , and  $b_0$  were the untreated control values, and  $L^*$ ,  $a^*$ , and  $b^*$  were the values for treated roasted coffee.

#### Aroma compounds evaluation

Samples subjected to a 30 min cold plasma treatment were analyzed with a gas chromatograph (GC-7890) coupled to mass spectrometry (NIST) system with ion trap mass spectrometer from Agilent Technologies Instruments operated in the split mode. A CP-Wax (60 m X 0.25 mm i.d.) column with a 0.25  $\mu\text{m}$  film thickness was employed for chromatographic separation of aromatic compounds. Ion trap mass spectrometer was operated in the electron ionization (EI) mode. The

NIST library was used to detect possible intermediates, and also our mass library was created with this program. The free volatile compounds were identified by GC/MS by means of retention time and mass spectrum. Helium at 1.6 mL/min was used as the carrier gas. Divinylbenzene / carboxen / polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) fiber with coating thicknesses of 50 and 30  $\mu\text{m}$  was used (Akiyama *et al.*, 2008).

The oven temperature program was as follows 50 °C for 2 min (rate 2 °C min<sup>-1</sup>) to 220 °C for 85 min. Hydrogen was used as the carrier gas at 100 kPa; the injector temperature and the splitless flow were set at 260 °C and 30 mL min<sup>-1</sup>, respectively, after a splitless time of 1 min. Solid-phase microextraction (SPME) was carried out according to Solis-Solis *et al.* (2007), with some modifications. Samples of 0.5 g of non-treated and treated roasted coffee were mixed with 1 g NaCl and 1.6 mL deionized water and subsequently sealed with PTFE-silicone septa. Sample vial equilibration was incubated at 40 °C for 30 min; the DVB/CAR/PDMS fiber was then exposed to the headspace above the sample for 30 min followed by 10 min of thermal desorption of the adsorbed substances in the injector port.

#### Polyphenols extraction

0.5 g of roasted coffee were mixed with 20 mL of acidified methanol solution (0.8 M HCl, 50:50, v/v) and extracted by shaking for 1 h in a wrist-action (Burrel, USA) at maximum speed (room temperature). The extracts were then centrifuged (Hermle, Z32HK, Labortechnik GmbH, Wehingen, Germany) at 6000 x g for 15 min at 4 °C. The supernatants were recovered, and the residues were re-extracted using 20 mL of an acetone solution (70:30, v/v, 60 min), supernatants were collected in a flask with the combination of acidified methanol solution and acetone solution (50:50, v/v). The supernatants were considered as total soluble polyphenols (TSP) and were used to evaluate the AOX. Samples were stored at 4 °C in the dark (Pérez-Jiménez *et al.*, 2008).

#### Total Soluble Polyphenols (TSP) content

The soluble polyphenols content was determined by the method of Alvarez-Parilla *et al.* (2010) with some modifications. An 250  $\mu\text{L}$  aliquot of extracts from roasted coffee were mixed with 1000  $\mu\text{L}$  Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (sodium carbonate, 7.5 w/v). After 3 min, 1250  $\mu\text{L}$  of Folin-Ciocalteu's reagent were added, and the mixture heated in a water bath for 15 min at 50°C, which resulted in a final volume of extract sample of 270  $\mu\text{L}$ . A microplate reader (Bio-Tek®, Synergy HT, Winooski, VT, USA) in a multi-mode spectrophotometric detection with 96-well plates and the Gen5 Program was used. Gallic acid was used as a standard (0.0125 – 0.2 mg/mL R<sup>2</sup>  $\geq$  0.9997), and results were expressed as mg of gallic acid equivalents (mg GAE/g DW), the absorbance was read at 750 nm against a blank.

#### AOX activity determination

This assay was based on the ability of different substances to scavenge 2,2'-Azinobis-3-ethyl benzothiazol-

line-6-sulfonic acid (ABTS) radical cation. The method proposed by Re *et al.* (1999) with some modifications was used. The radical cation was prepared by mixing a 7 mM stock solution with 2.42 mM potassium persulfate and kept in the dark at room temperature for 14 h. The ABTS solution was adjusted with phosphate buffer at an absorbance of 0.70 ( $\pm 0.02$ ). Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid) was used as a standard and methanol as a blank. Extract samples of 20  $\mu\text{L}$  were read on a microplate reader (Biotek, Synergy HT, Winooski, VT, USA) with 300  $\mu\text{L}$  capacity, and 280  $\mu\text{L}$  of the ABTS radical was added. Then, it was incubated at 37 °C in the dark and read for 6 min at 734 nm; a calibration curve was prepared using an aqueous solution of Trolox as a standard. We reported the results as mmol TE per 100 g sample DW.

### Sensory evaluation

The roasted coffee (untreated control and 30 min cold plasma treated) was prepared by adding the coffee powder (1:4 w/v) and sugar 5 % (w/v) in boiling water. Prepared coffee was evaluated for sensory attributes by 40 untrained judges. The experiment was divided into two phases: (1) triangular test was performed to compare between three samples simultaneously, two untreated samples and one treated with 30 min cold plasma, without having to specify the sensory characteristic(s) that differ; (2) hedonic test was based on the evaluation of color, odor, taste and overall acceptability parameters. A 9-point hedonic scale (1: dislike extremely to 9: like extremely) was used to analyze the sensory score corresponding to each tasted sample (Kumar *et al.*, 2012).

The sensory results were analyzed by a two-factor analysis (panelist and product) with an ANOVA test and differences were established by the LSD test.

### Statistical Analysis

A unifactorial design where the independent factor was the treatment time, was employed. Statistical analysis was performed using SAS for Windows V9. Analysis of variance (ANOVA) and multiple comparison procedures (Least Significant Difference–LSD) test were conducted to determine whether there were significant differences ( $p < 0.05$ ) among treatments for physicochemical properties, sensory analysis, and antioxidant compounds.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Color evaluation in cold plasma treated roasted coffee

Hunter color parameters for roasted coffee, both treated with cold plasma and untreated, are shown in Table 1. No differences in the surface measured parameters were observed ( $p > 0.05$ ), and the value of  $\Delta E$  of 0.78 was obtained. In conditions of ideal vision, values of  $\Delta E \leq 1$  represent a minimum difference of color, hardly perceptible for the human eye (Vervoort *et al.*, 2012).

The impact of cold plasma on color depends on critical factors associated with the product such as type (cut, solid, liquid), plasma treatment conditions (input voltage,

**Table 1.** Valores de color superficial en café tostado sin tratar y muestras tratadas con plasma frío.

**Table 1.** Surface colour values of untreated roasted coffee and cold plasma treated samples.

Treatments	L*	a*	b*
Rosted coffee untreated (0 min)	22.85 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	11.36 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	17.16 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>
Roasted coffee with cold plasma treatment (30 min)	22.89 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	10.90 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	17.02 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>

a=Similar letters uppercase indicates no significant difference ( $p < 0.05$ ) between treatments.

time, power, working gas), and storage conditions (Pankaj *et al.*, 2018).

### Aroma compounds determination

The aroma compounds detected in the untreated roasted coffee and cold plasma treated samples were not statically significant ( $p > 0.05$ ). A total of 9 volatile compounds were identified in both samples (Figure 1).

This suggests that cold plasma treatment did not significantly affect the covalent bonds responsible for aroma, compounds' integrity and flavor characteristics (Bressanello *et al.*, 2017). However, the chemistry of cold plasma collision reactions generates  $\text{N}_x\text{O}_y$ ,  $\text{O}_3$  (ozone), peroxy-radicals in a discharge produced O atom and attacks molecular  $\text{O}_2$  by a three-body reaction to yield ozone induced oxidation in foods (Gavahian *et al.*, 2018). Also, oxygen species (ROS) can be formed in nature under UV-light influence generating photo-oxidation of lipids (Vandamme *et al.*, 2015). Some studies have demonstrated that, especially fatty foods, can interact with ROS (OH and  $^1\text{O}_2$ ) and be linked by double bonds (Van Durme and Vandamme, 2016). Therefore, the primary oxidation products (non-volatile components) and secondary oxidation products (volatile components) contribute to off-flavors, for example, vinyl ketones, *trans*, *cis*-alkadienals, alkanals, hydrocarbons present oils and fats (Kerrihard *et al.*, 2015).

Vandamme *et al.* (2015), performed a qualitative and semi-quantitative identification of volatile oxidation compounds from by-products in vegetable oil samples treated with DBD plasma jet (Ar / 0.6 %  $\text{O}_2$ ), generating a wide range of highly reactive oxidative species as atomic oxygen, hydroxyl radicals and singlet oxygen, while maintaining ambient temperatures. Alves *et al.* (2017), showed processed by ozone and plasma (oxygen gas) for a long period (1 to 3 min), and obtained oxidation of limonene,  $\gamma$ -terpinene and linalool, causing off-flavor and volatile composition on orange juice.

The main parameters involved in by-products formation are food matrix, voltage, treatment time, oxygen concentration, plasma configuration, and also water and carrier gas concentration. From those parameters, high lipid content in food matrices is critical for off-flavor formation during cold plasma treatment. The coffee beans have a low lipid content, and thus, no formation of off-flavor molecules was observed.

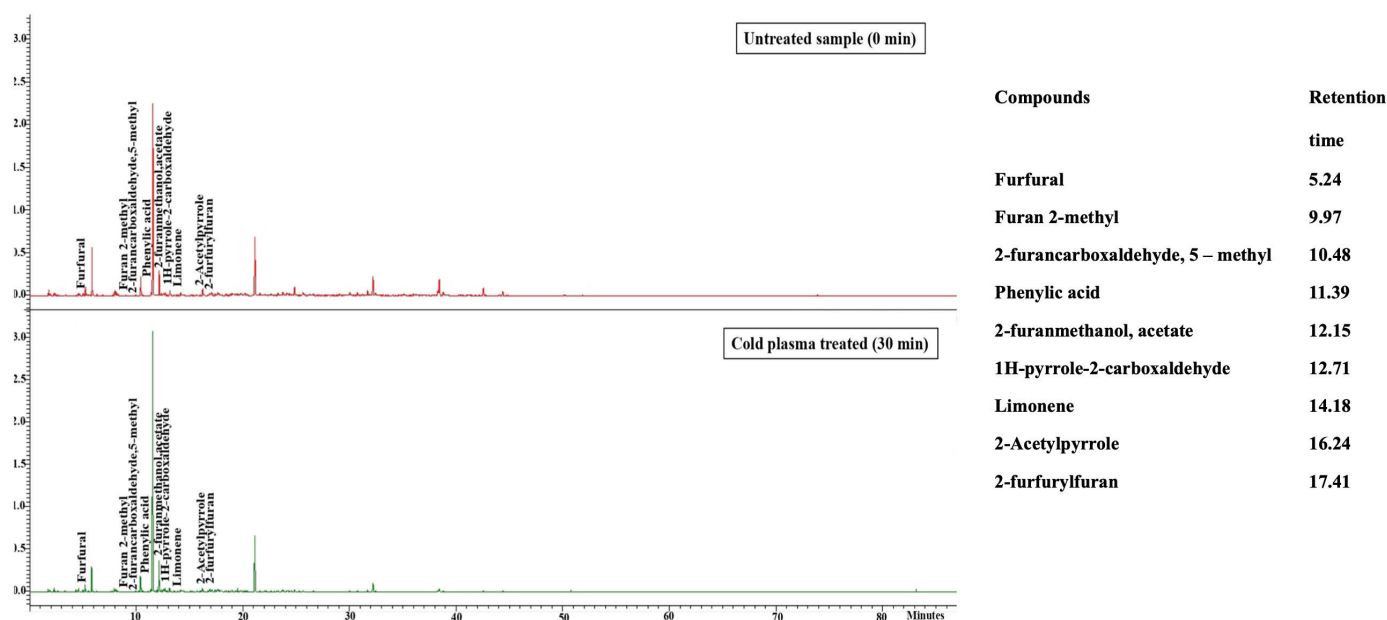


Figura 1. Cromatogramas GC-MS de compuestos aromáticos detectados en café tostado sin tratar y tratado con plasma frío durante 30 min.  
Figure 1. GC-MS chromatograms of aromatic compounds detected in untreated roasted coffee and cold plasma samples treated for 30 min.

### Total Soluble Phenols (TSP) content and AOX in roasted coffee treated with cold plasma

TSP content in roasted coffee showed significant ( $p < 0.05$ ) variations during the cold plasma treatment, decreasing from  $67.74 \pm 2.31$  GAE/g to  $59.12 \pm 3.92$  GAE/g after 30 min of treatment (Table 2). A decrease of 12 % in total phenolic concentration (TPS) after cold plasma treatment, compared with control.

The plasma technology generates reactive oxygen species (ROS) such as hydroxyl radicals, atomic oxygen, and singlet oxygen and ozone (Brandenburg *et al.*, 2007). The TSP can capture radicals and are susceptible to ozone attack (Stalter *et al.*, 2011), explaining the reduction in TSP through the time of plasma application. According to these authors, a phenolic compounds reduction was observed, probably due to oxidation caused by active particles and radicals, depending on the plasma exposure time (Sarangapani *et al.*, 2017). Moreover, molecular ozone acts on the aromatic compounds favoring the formation of hydroxylated and quinone compounds, because the formation of aliphatic compounds is originated from the rupture of the aromatic ring (Perez *et al.*, 2002).

Almeida *et al.* (2015), showed that the total phenolic content was affected ( $p < 0.05$ ) only after 60 s under indirect plasma exposure on orange juice. Solís *et al.* (2013), observed a reduction of 38 % in total polyphenol content in chamomile samples with 10 min of plasma energy at 750 volts, and of 33 % in cinnamon samples treated at 650 volts.

Regarding the AOX in roasted coffee, this increased 14 % after 30 min of treatment with cold plasma ( $p < 0.05$ ) (Table 2). The influence of plasma species and phenolic derivatives

**Table 2.** Fenoles solubles totales (FST) y capacidad antioxidante (ABTS) en café tostado tratado con plasma frío (30 W potencia de entrada y voltaje de salida de 850 V)

**Table 2.** Total soluble polyphenols (TSP) and antioxidant capacity (ABTS) in roasted coffee treated with cold plasma (30 W input power and at output voltage of 850 V).

Treatment time (min)	TSP (mg GAE/g DW)	ABTS value (mmol TE/g DW)
Control	$67.74 \pm 2.31^b$	$528.96 \pm 8.65^f$
1	$65.06 \pm 0.31^{a,b}$	$438.94 \pm 19.82^{a,b}$
4	$63.27 \pm 4.52^{a,b}$	$418.27 \pm 1.24^b$
8	$58.12 \pm 5.76^a$	$306.36 \pm 17.35^d$
12	$59.42 \pm 5.24^a$	$361.92 \pm 21.87^e$
16	$60.06 \pm 0.47^{a,b}$	$480.65 \pm 13.94^a$
20	$61.36 \pm 0.17^{a,b}$	$593.59 \pm 29.51^c$
24	$60.78 \pm 1.02^{a,b}$	$464.55 \pm 13.95^a$
30	$59.12 \pm 3.92^a$	$604.06 \pm 18.83^c$

a=Similar letters uppercase indicates no significant difference ( $p < 0.05$ ) between treatments.

(hydroxyl radicals, peroxy radicals), atomic or singlet oxygen caused reaction, both direct and indirectly (Brandenburg *et al.*, 2007). Therefore, depending on the chemical structure of each of the polyphenols, the antioxidant properties might vary. These chemical conditions influence the ability of polyphenols to scavenge free radicals, changing their biological activity (Vajragupta *et al.*, 2000). The UV-B radiation during cold plasma, plays a crucial role in the individual compounds of the polar fraction due to penetration or favored biosynthesis (Ramazzina *et al.*, 2015; Grzegorzewski *et al.*, 2010), which facilitate the increment of antioxidants (others than polyphenols) in roasted coffee.

Solís *et al.* (2013) reported an increase of antioxidant activity in cinnamon samples at 750 V (21.4 %), 850 V (12.2 %), and 650 V (14.4 %), during 10 min of treatment. Also, Trouillas *et al.* (2006) observed an increase in the antioxidant properties of plasma-treated basmati rice.

The variable effect of cold plasma on functional food components may be due to differences in the food matrices, plasma equipment configuration, and processing parameters, particularly the gas used. Accordingly, further work is needed to clarify the reaction chemistry between plasma RS and antioxidants in food products. For example the elucidate the molecule fragments resulted from the erosion and UV radiations produced during cold plasma treatments to gain further insight into the relationship between antioxidant activity and polyphenols content in treated coffee samples.

### Sensory evaluation

Sensory quality to evaluate triangle test was determined after taking into consideration sensory scores given by untrained judges. The results showed no significant difference between treated and untreated samples ( $p < 0.05$ ). Thus, cold plasma treated samples were found to be acceptable in terms of sensory attributes.

Figure 2 shows the results of a hedonic test of sample C201 (treatment cold plasma) and sample C685 (untreated). The judges evaluated "like moderately" for both samples.

Study by Basaran *et al.* (2008) report no significant difference on the sensory analysis, of nut samples treated with cold plasma LPCP using air gases or sulfur hexafluoride ( $SF_6$ ) (appearance, color, odor, texture).

Another study of cold plasma showed that high lipid such as alkanes, alkenes, aldehydes, alcohols, ketones, and acids produce unpleasant flavors, which are sensory described as fishy, metallic, rancid, and oxidized (Kim *et al.*, 2013; Jayasena *et al.*, 2015). The factor of relative humidity

on fresh fruits and vegetables generates "sour" or "chemical" odor associated with reactive nitrogen species (nitrogen monoxide, nitrogen dioxide and oxygen) and peroxy nitrite (Schnabel *et al.*, 2015; Von-Woedtke *et al.*, 2012). Furthermore, it should be mentioned that coffee bean has a low content of  $a_w$  (10 %) and lipids (16 %) (Alvarado and Puerta, 2002). Hence, the probability of generating new compounds with sensory impact was reduced, and no differences in sensory attributes were observed.

### CONCLUSION

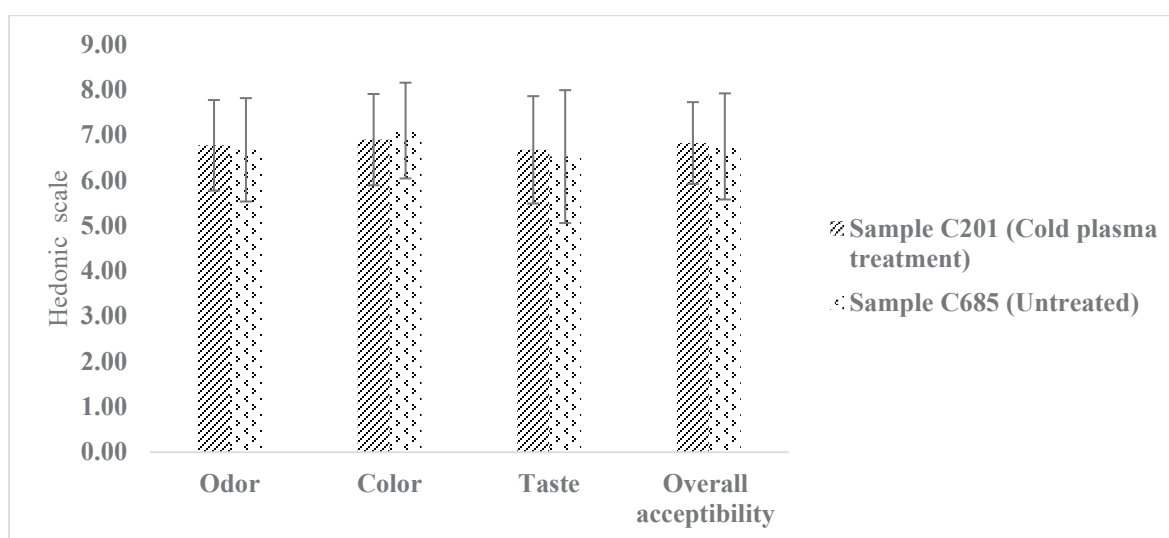
DBD Plasma treatment, a novel technology in value-added coffee processing, results from the research. Good preservation of color, sensory and aromatic properties were obtained after a 30 min treatment at 30 W input power and 850 volts with Helium gas 1.5 L/min. An increase of 14 % in AOX and a decrease of 12 % with respect to TSP during plasma exposure for 30 min were observed. Therefore, it is important to continue the research, especially in the interaction of individual reactive species and /or unravel oxidation reaction pathways in food to improve the quality attributes.

### ACKNOWLEDGMENTS

The support for this research was provided by the Tecnológico Nacional de México through the project 5851.16-P. "Aplicación de plasma frío para el control microbiano en alimentos" and by CONACYT through the fellowship 374701 granted to P. P. Casas Junco.

### AUTHOR CONTRIBUTIONS

Paloma P. Casas-Junco, acquisition of data and writing of the manuscript; Josué R. Solís-Pacheco, supervision of cold plasma treatments; Juan A. Ragazzo-Sánchez, aroma compounds analysis, and article critical revising; Blanca R. Aguilar-Uscanga, supervision of physicochemical and senso-



**Figura 2.** Evaluación sensorial de café tostado (tratado con plasma frío y sin tratar) con una escala hedónica de 9 puntos.  
**Figure 2.** Sensory evaluation of roasted coffee (cold plasma treated and untreated) on a 9-point hedonic scale.



rial analysis; Sonia G. Sáyago-Ayerdi, supervision of TSP and AOX analysis; Montserrat Calderón- Santoyo, conception, and design of the study, analysis and interpretation of data and article critical revising.

## CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest and none to declare concerning the results in this manuscript.

## DATA AVAILABILITY

Data are available under request.

## REFERENCES

- Al-Abdalall, A. H. A., & Al-Talib, E. A. 2014. Aflatoxin and ochratoxin production in ground coffee during storage. *Canadian Journal of Pure and Applied Sciences* 8: 2825-2836.
- Akiyama, M., Murakami, K., Hirano, Y., Ikeda, M., Iwatsuki, K., Wada, A., Tokuno, K., Onishi, M., Iwabuchi, H. 2008. Characterization of headspace aroma compounds of freshly brewed Arabica coffees and studies on a characteristic aroma compound of Ethiopian coffee. *Journal Food Science* 73: C335-C346.
- Almeida, F. D. L., Cavalcante, R. S., Cullen, P. J., Frias, J. M., Bourke, P., Fernandes, F. A., & Rodrigues, S. 2015. Effects of atmospheric cold plasma and ozone on prebiotic orange juice. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 32:127-135.
- Alvarado, G., & Puerta, G. 2002. La variedad Colombia y sus características de calidad física y en taza. *Avance Técnicos Cenicafe* 303:1-4.
- Alvarez-Parrilla, E., De La Rosa, L. A., Legarreta, P., Saenz, L., Rodrigo-García, J., & González-Aguilar, G. A. 2010. Daily consumption of apple, pear and orange juice differently affects plasma lipids and antioxidant capacity of smoking and non-smoking adults. *International Journal Food Science Nutrition* 61:69-380.
- Alves, E., Rodrigues, T., Fernandes, F., de Brito, E., Cullen, P., Frias, J. M., Bourke, P., Calvante, R., Almeida, F., Rodrigues, S. 2017. An untargeted chemometric evaluation of plasma and ozone processing effect on volatile compounds in orange juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 53:63-69.
- Amini, M., & Ghoranneviss, M. 2016. Effects of cold plasma treatment on antioxidants activity, phenolic contents and shelf life of fresh and dried walnut (*Juglans regia* L.) cultivars during storage. *LWT- Food Science Technology* 73:178-184.
- Basaran, P., Basaran-Akgul, N., & Oksuz, L. 2008. Elimination of *Aspergillus parasiticus* from nut surface with low pressure cold plasma (LPCP) treatment. *Food Microbiology* 25:626-632.
- Brandenburg, R., Ehlbeck, J., Stieber, M., v. Woedtke, T., Zeymer, J., Schlüter, O., & Weltmann, K. D. 2007. Antimicrobial treatment of heat sensitive materials by means of atmospheric pressure Rf-Driven Plasma Jet. *Contributions to Plasma Physics* 47:72-79.
- Bressanello, D., Liberto, E., Cordero, C., Rubiolo, P., Pellegrino, G., Ruosi, M., & Bicchi, C. 2017. Coffee aroma: Chemometric comparison of the chemical information provided by three different samplings combined with GC-MS to describe the sensory properties in cup. *Food Chemistry* 214:218-226.
- Caballero, B., Trugo, L., & Finglas, P. 2003. *Encyclopedia of food sciences and Nutrition*. Elsevier Science, Norwich: UK.
- Casas, P., Ragazzo, J., Ascencio F., Calderón, M. 2018. Determination of potentially mycotoxigenic fungi in coffee (*Coffea arabica* L.) from Nayarit. *Food science and biotechnology* 27(3): 891-898.
- Gavahian, M., Chu, Y., Khaneghah, A., Barba, F., Misra, N. 2018. A critical analysis of the cold plasma induced lipid oxidation in foods. *Trends in Food Science & Technology* 77:32-41.
- Grzegorzewski, F., Rohn, S., Kroh, L. W., Geyer, M., & Schlüter, O. 2010. Surface morphology and chemical composition of lamb's lettuce (*Valerianella locusta*) after exposure to a low-pressure oxygen plasma. *Food Chemistry* 122:1145-1152.
- Haile, M., & Kang, W. 2019. The harvest and postharvest management practices' impact on coffee quality. *Coffee-Production and Research* 1-18.
- Jayasena, D., Kim, H., Yong, H., Park, S., Kim, K., Choe, W., & Jo, C. 2015. Flexible thin-layer dielectric barrier discharge plasma treatment of pork butt and beef loin: Effects on pathogen inactivation and meat-quality attributes. *Food Microbiology* 46:51-57.
- Keener, K. M. 2008. Atmospheric non-equilibrium plasma. *Encyclopedia of Agricultural, Food, and Biological Engineering* 1:1-5.
- Kerrihard, A., Pegg, R., Sarkar, A., Craft, B. 2015. Update on the methods for monitoring UFA oxidation in food products. *European Journal of Lipid Science and Technology* 117:1-14.
- Kim, H., Yong, H., Park, S., Choe, W., & Jo, C. 2013. Effects of dielectric barrier discharge plasma on pathogen inactivation and the physicochemical and sensory characteristics of pork loin. *Current Applied Physics* 13:1420-1425.
- Kovačević, D. B., Putnik, P., Dragović-Uzelac, V., Pedisić, S., Jambak, A. R., & Herceg, Z. 2016. Effects of cold atmospheric gas phase plasma on anthocyanins and color in pomegranate juice. *Food Chemistry* 190:317-323.
- Kumar, S., Kunwar, A., Gautam, S., & Sharma, A. 2012. Inactivation of *A. ochraceus* spores and detoxification of ochratoxin A in coffee beans by gamma irradiation. *Journal Food Science* 77:T44-T51.
- Lee, T., Puligundla, P., & Mok, C. 2018. Intermittent corona discharge plasma jet for improving tomato quality. *Journal of Food Engineering* 223:168-174.
- Pankaj, S., Wan, Z., & Keener, K. 2018. Effects of cold plasma on food quality: A review *Foods*, 7(1), 4.
- Pérez-Jiménez, J., Arranz, S., Taberner, M., Díaz-Rubio, M. E., Serrano, J., Goñi, I., & Saura-Calixto, F. 2008. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Research International* 41:274-285.
- Perez, M., Torrades, F., Domenech, X., & Peral, J. 2002. Treatment of bleaching Kraft mill effluents and polychlorinated phenolic compounds with ozonation. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 77:891-897.
- Peña-Eguiluz, R., Pérez, J., Solís, J., Aguilar, B., López, R., Mercado, A., Valencia, A., Muñoz, A., Barocio, S., de la Piedad, A. 2010. Instrumentation for a plasma needle applied to *E. coli* bacteria elimination. *The European Physical Journal Applied Physics* 49: 13109.

- Ramazzina, I., Berardinelli, A., Rizzi, F., Tappi, S., Ragni, L., Sacchetti, G., & Rocculi, P. 2015. Effect of cold plasma treatment on physico-chemical parameters and antioxidant activity of minimally processed kiwifruit. *Postharvest Biology and Technology* 107: 55-65.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26:1231-1237.
- Sarangapani, C., O'Toole, G., Cullen, P., & Bourke, P. 2017. Atmospheric cold plasma dissipation efficiency of agrochemicals on blueberries. *Innovative Food Science and Emerging* 44:235-241.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera SIAP, México, onceavo productor de café mundial. [Consultado 25 Enero 2021] 2018. Disponible en: <https://www.gob.mx/agricultura/es/articulos/mexico-onceavo-productor-mundial-de-cafe?idiom=es>
- Solís, J., Villanueva, J., Peña, R., González, O., Cabrera, E., González, V., Aguilar, B. 2013. Effect of plasma energy on the antioxidant activity, total polyphenols and fungal viability in chamomile (*Matricaria chamomilla*) and cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*). *Journal of Microbiology, Biotechnol and Food Sciences* 2:2318.
- Solis-Solis, H.M., Calderon-Santoyo, M., Gutierrez-Martinez, P., Schorr-Galindo, S., & Ragazzo-Sanchez, J. A. 2007. Discrimination of eight varieties of apricot (*Prunus armeniaca*) by electronic nose, LLE and SPME using GC-MS and multivariate analysis. *Sensors and Actuators B: Chemical* 125:415-421.
- Schnabel, U., Niquet, R., Schlüter, O., Gniffke, H., & Ehlbeck, J. (2015). Decontamination and sensory properties of microbiologically contaminated fresh fruits and vegetables by microwave plasma processed air (PPA). *Journal of Food Processing and Preservation* 39:653-662.
- Stalter, D., Magdeburg, A., Wagner, M., & Oehlmann, J. 2011. Ozonation and activated carbon treatment of sewage effluents: removal of endocrine activity and cytotoxicity. *Water Research* 45: 1015-1024.
- Tappi, S., Gozzi, G., Vannini, L., Berardinelli, A., Romani, S., Ragni, L., & Rocculi, P. 2016. Cold plasma treatment for fresh-cut melon stabilization *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 33:225-233.
- Trouillas, P., Marsal, P., Siri, D., Lazzaroni, R., & Duroux, J. 2006. A DFT study of the reactivity of OH groups in quercetin and taxifolin antioxidants: The specificity of the 3-OH site. *Food Chemistry* 97: 679-688.
- Van Durme, J., Vandamme, J. 2016. Non-thermal plasma as preparative technique to evaluate olive oil adulteration. *Food chemistry* 208:185-191.
- Vandamme, J., Nikiforov, A., Dujardin, K., Leys, C., De Cooman, L., & Van Durme, J. 2015. Critical evaluation of non-thermal plasma as an innovative accelerated lipid oxidation technique in fish oil. *Food Research International* 72: 115-125.
- Vajragupta, O., Boonchoong, P., & Wongkrajang, Y. 2000. Comparative quantitative structure-activity study of radical scavengers. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 8: 2617-2628.
- Vervoort, L., Van der Plancken, I., Grauwet, T., Verlinde, P., Matser, A., Hendrickx, M., & Van Loey, A. 2012. Thermal versus high pressure processing of carrots: a comparative pilot-scale study on equivalent basis. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 15: 1-13.
- Von-Woedtke, T., Oehmigen, K., Brandenburg, R., Hoder, T., Wilke, C., Hähnel, M., & Weltmann, K.-D. 2012. Plasma-liquid interactions: chemistry and antimicrobial effects. In *Plasma for Bio-decontamination, Medicine and Food Security*. Springer: Netherlands.



## Evaluation of biochemical, chemical, physical and microbiological quality of tilapia (*Oreochromis niloticus*) muscle during 0 and 5 °C storage

Evaluación de la calidad bioquímica, química, física y microbiológica del músculo de tilapia (*Oreochromis niloticus*) durante el almacenamiento a 0 y 5 °C

**Nathaly Montoya-Camacho<sup>1,2</sup>, Francisco Javier Castillo-Yáñez<sup>3</sup>, Enrique Márquez-Ríos<sup>4</sup>, Saúl Ruíz-Cruz<sup>4</sup>, Aldo Alejandro Arvizu Flores<sup>3</sup>, Hebert Jair Barrales-Cureño<sup>5</sup>, Edgar Iván Jiménez-Ruiz<sup>6</sup>, Leticia Mónica Sánchez-Herrera<sup>6</sup>, Víctor Manuel Ocaño-Higuera<sup>3\*</sup>**

<sup>1</sup> Universidad Estatal de Sonora. Unidad Académica Hermosillo. Ley Federal del Trabajo s/n. C.P. 83100. Hermosillo, Sonora, México.

<sup>2</sup> Escuela de Ciencias de la Salud. Universidad del Valle de México. Blvd. Enrique Mazón López 617. C.P. 83165. Hermosillo, Sonora, México.

<sup>3</sup> Departamento de Ciencias Químico Biológicas. Universidad de Sonora. Blvd. Luis Encinas y Rosales s/n. C.P. 83000. Hermosillo, Sonora, México.

<sup>4</sup> Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos. Universidad de Sonora. Blvd. Luis Encinas y Rosales s/n. C.P. 83000. Hermosillo, Sonora, México.

<sup>5</sup> Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Ciudad Universitaria. C.P. 58030. Morelia, Michoacán, México.

<sup>6</sup> Unidad de Tecnología de Alimentos. Secretaria de Investigación y Posgrado. Universidad Autónoma de Nayarit. Ciudad de la Cultura s/n. C.P. 63000, Tepic, Nayarit, México.

### ABSTRACT

Fishing products are characterized for being highly perishable; therefore, preservation methods are used to retain freshness, quality and extend shelf life. One of the factors that influences most on the loss of freshness, quality and shelf life, is storage temperature. This study evaluated the effect of storage temperature (0 °C and 5 °C) on the quality and shelf life of tilapia (*Oreochromis niloticus*) muscle during 20 days of storage. Adenosine 5'-triphosphate (ATP) and related compounds, K-value, pH, color, texture, water holding capacity (WHC), total volatile bases (TVB-N), and total count of mesophilic microorganisms were monitored. The results indicated that time and storage temperature had a significant effect ( $P < 0.05$ ) on K-value, TVB-N, and total count of mesophilic microorganisms. The present study concludes that, by storing tilapia muscle at a lower temperature, a longer shelf life is produced, which implies that the product can be kept with good quality for a longer period of time. Likewise, the edible quality of tilapia muscle was affected by storage temperature, observing a shelf life of 16 days at 0 °C and 8 days at 5 °C.

**Keywords:** *Oreochromis niloticus*; storage temperature; quality; shelf life; K-value

### RESUMEN

Los productos pesqueros se caracterizan por ser altamente perecederos; por lo tanto, se utilizan métodos para conservar la frescura, la calidad y extender la vida útil. Uno de los factores que más influye en la pérdida de frescura, calidad y vida útil es la temperatura de almacenamiento. Este estudio evaluó el efecto de la temperatura de almacenamiento (0 °C

y 5 °C) sobre la calidad y vida útil del músculo de tilapia (*Oreochromis niloticus*) durante 20 días de almacenamiento. Se monitorearon el ATP (adenosina-5'-trifosfato) y compuestos relacionados, el índice K, el pH, el color, la textura, la capacidad de retención de agua (CRA), las bases volátiles totales (TVB-N) y el recuento total de microorganismos mesófilos. Los resultados indicaron que el tiempo y la temperatura de almacenamiento tuvieron un efecto significativo ( $P < 0.05$ ) sobre el índice K, TVB-N y el recuento total de microorganismos mesófilos. En el presente estudio se concluye que al almacenar el músculo de tilapia a menor temperatura se produce una mayor vida útil, lo que implica que el producto se puede conservar con buena calidad por más tiempo. Asimismo, la calidad comestible del músculo de tilapia se vio afectada por la temperatura de almacenamiento, observándose una vida útil de 16 días a 0 °C y 8 días a 5 °C.

**Palabras clave:** *Oreochromis niloticus*; temperatura de almacenamiento; calidad; vida de anaquel; índice K

### INTRODUCTION

Tilapia production has increased considerably worldwide, with a production of 6.5 million tons by 2019 (Tveteras *et al.*, 2020). Currently, consumers have widely accepted the consumption of these freshwater fish. Not only are these fish considered an excellent food source, but they also represent great potential as an income source, leading commercialization in the national and international markets (Fitzsimmons, 2016).

Today, there is a growing consumer demand to purchase fish products with the highest freshness and quality possible. For this reason, quality and safety are of great interest to processing industries and authorities dedicated to food sanitary control (Fitzsimmons, 2016).

\*Autor para correspondencia: Víctor Manuel Ocaño-Higuera  
 Correo electrónico: victor.ocano@unison.mx

Recibido: 13 de enero de 2021

Aceptado: 26 de marzo de 2021

In general, fish products begin to lose their freshness immediately after capture or harvest. It is known that the loss of freshness and the fish pattern of spoilage varies significantly from species to species. Once the fish dies, several postmortem changes occur. Post-harvest handling practices strongly influence these changes in fish muscle. These postmortem changes, which directly and strongly affect the quality and shelf life of fish products, are associated with protein and ATP degradation, a drop in pH, lipid oxidation, production of undesirable compounds such as trimethylamine nitrogen (TMA-N) and low weight molecular volatile bases (TVB-N), which are produced by bacterial action. Likewise, the muscle changes its texture, water retention capacity, and color (Alasalvar *et al.*, 2002; Cheng *et al.*, 2013). The methods to evaluate the freshness and quality of different fish species measure postmortem changes associated with sensory, chemical and physical changes and microbiological growth (Cheng *et al.*, 2013).

The literature describes that a series of antemortem and *postmortem* factors influences the quality of fish products, among which are: species, initial composition, size, physiological condition, feeding, method of capture, environmental temperature, storage temperature, among others (Sikorski *et al.*, 1990).

On the other hand, one of the most used methods to evaluate muscle quality in fish products is the degradation of ATP to ADP → AMP → IMP → HxR → Hx. Concentrations of these products during storage have been used as biochemical indicators of freshness and deterioration (Saito *et al.*, 1959). In addition, different reports on the *postmortem* factors states that storage temperature has more impact on the biochemical changes and the quality and shelf life of the fish species. Therefore, this study evaluated the effect that storage temperature (0 °C and 5 °C) exerts on the quality and shelf life of tilapia (*Oreochromis niloticus*) muscle.

## MATERIALS AND METHODS

### Collection and sampling

This study used tilapia organisms obtained directly from the cultivation site located at the El Novillo dam in Sonora, Mexico. Specimens with an average weight and length of 961.00 ± 0.15 g and 33.60 ± 1.69 cm, respectively, were sacrificed by thermal shock in a container with water and ice. Once slaughtered, they were frozen in alternating beds of ice-fish-ice inside a hermetic cooler for transportation to the Food Research Laboratory of the Universidad de Sonora. The time between post-harvest and the arrival of the organisms at the university facilities did not exceed 3 hours. Once in the laboratory, the organisms were manually filleted, these were packed in polyethylene bags and stored for 20 days at 0 °C and 5 °C. Subsequently, at 0, 2, 5, 8, 11, 14, 17 and 20 days, fillet samples were taken to monitor the behavior of ATP and related compounds, K value, pH, color, texture, WHC, TVB-N and count of mesophilic microorganisms. Except for the mesophilic microbial count where the sample consisted of three fresh fillets, the rest of the analyses had six fresh fillets taken

at each sampling day. In the case of ATP and degradation products determinations, part of the fillets was frozen and stored at -80 °C until the moment of analysis.

### Analysis

#### ATP, related compounds and K value

Determinations of nucleotides and related compounds were carried out by a Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography procedure (Ryder, 1985). The identification of nucleotides, nucleosides and bases were made by comparing their retention times with those of commercially obtained standards and by the addition or spiking of standards. The K value was calculated as the percentage rate of HxR and Hx to the sum of ATP and degradation products as follows:

$$\%K = [(HxR + Hx) / (ATP + ADP + AMP + IMP + HxR + Hx)] \times 100$$

Where: ATP = adenosine-5'-triphosphate, ADP = adenosine-5'-diphosphate, AMP = adenosine-5'-monophosphate, IMP = inosine-5'-monophosphate, HxR = inosine and Hx = hypoxanthine

#### TVB-N and pH

The determination of TVB-N was determined by previously described methods (Woyewoda *et al.*, 1986), with a technique based on the distillation of these compounds and the results obtained expressed as mg of TVB-N/100 g. The pH determination was done according to the method recommended by Woyewoda *et al.* (1986).

#### Texture

The shear test was used to evaluate texture in tilapia muscle using a Warner-Bratzler blade in a universal testing machine (Model 1130, Instron Corp., Canton, MA) equipped with a 50-kg cell. The speed was set at 20 cm/min, with a shear force transversally applied in the direction of the muscle fibers, using standardized cuts (10×10×20 mm) and recording the necessary force (N) to shear the muscle.

#### WHC

Water-holding capacity was measured using a standard methodology (Cheng *et al.*, 1979) and expressed as a "loss of water," which was the percentage of weight loss by the sample compared to the initial weight.

#### Color

Color changes in the tilapia muscle were determined using the standard methodology of the International Commission on Illumination (CIE, 1978) with a tri-stimulus colorimeter (Model CR-300, Minolta Co., New York, NY). Measurements were taken on the surface of the muscle.

#### Total count of mesophilic microorganisms

The total count determination of mesophilic aerobic microorganisms was according to the methodology described by the Official Mexican Standard (NOM-092-SSA1-1994)



(1994) for the count of aerobic microorganisms on plate. To this end, 10 g of fish muscle were homogenized and later a series of decimal dilutions were prepared, which were inoculated (1 mL) in plate count agar (PCA), making a triplicate of each dilution. The total mesophilic count was expressed as the log of colony-forming units (CFU) per gram of muscle.

### Statistical analysis

Analyses were performed with the NCSS 2000 statistics software (NCSS, Kaysville, UT), applying descriptive statistics (mean and standard deviation), one-way ANOVA and linear regression analysis. The level of significance was set at 5 %. Six repetitions of each determination were made, except for the microbiological analysis, which used an  $n=3$ , where each organism and fillet was considered an experimental unit. For the determination of the K value, a linear regression analysis was performed, which resulted in the prediction equation for the freshness index.

## RESULTS AND DISCUSSION

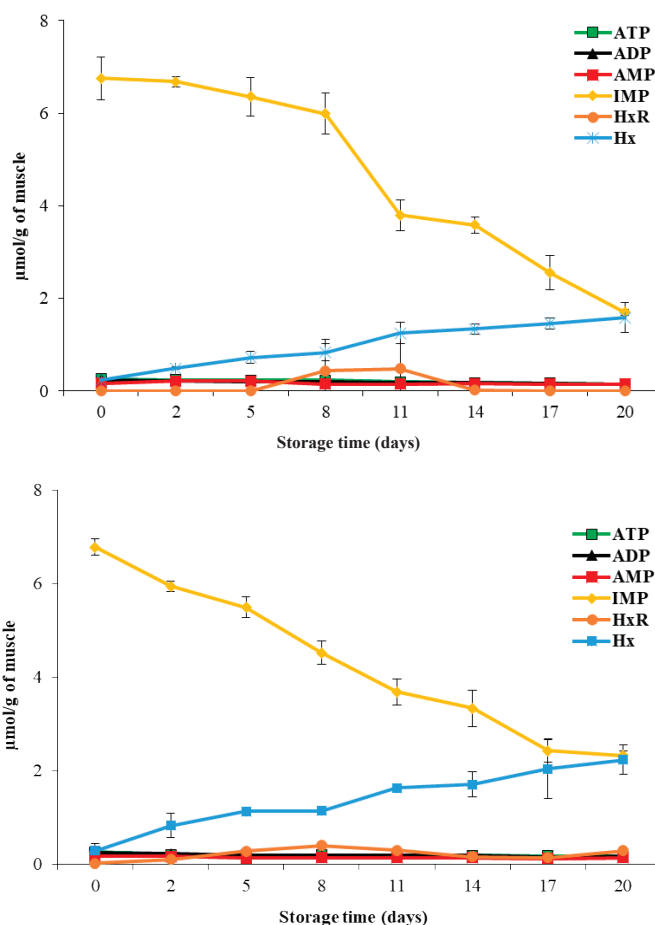
### Behavior of ATP and related compounds

In the muscle of vertebrate organisms, ATP is enzymatically degraded to  $ADP \rightarrow AMP \rightarrow IMP \rightarrow HxR \rightarrow Hx$ . Concentrations of these products during storage have been used as biochemical indicators of freshness and deterioration (Saito *et al.*, 1959). This study found initial ATP, ADP, AMP, IMP, Hx and HxR values of  $0.26 \pm 0.01$ ,  $0.24 \pm 0.02$ ,  $0.17 \pm 0.02$ ,  $6.00 \pm 0.29$ ,  $0.25 \pm 0.06$  and  $0.01 \pm 0.01$   $\mu\text{mol/g}$ , respectively (Figure 1). IMP was the most abundant compound at the beginning, which coincides with Batista *et al.* (2004), who reported  $\sim 7.0$   $\mu\text{mol/g}$  IMP, in the matrixá (*Brycon cephalus*) muscle. In response to storage temperature, ATP and ADP concentrations did not change ( $P \geq 0.05$ ), while those of AMP, IMP, HxR and Hx, did ( $P < 0.05$ ). The degradation rate of ATP and degradation products was higher at 5 °C. On the other hand, concerning storage time, the ATP and IMP content decreased ( $P < 0.05$ ), while the Hx concentration increased ( $P < 0.05$ ) to  $1.58 \pm 0.33$  and  $2.23 \pm 0.32$   $\mu\text{mol/g}$  at 0 °C and 5 °C, respectively, after 20 days of storage. The obtained Hx concentrations are lower than those reported by Tomé *et al.* (2000), who found a value of 5.2  $\mu\text{mol/g}$  of Hx in tilapia (*Oreochromis niloticus*) muscle stored at 0 °C.

In this study, the compounds that presented the most change were IMP and Hx. For IMP at both temperatures, a linear decrease ( $P < 0.05$ ) was obtained with respect to storage time ( $Y = -0.79x + 8.24$ ,  $R^2 = 0.93$ ; and  $Y = -0.66x + 7.31$ ,  $R^2 = 0.98$ , for 0 °C and 5 °C, respectively). On the other hand, Hx accumulated linearly with storage time ( $P < 0.05$ ) ( $Y = 0.19x + 0.10$ ,  $R^2 = 0.97$ ; and  $Y = 0.26x + 0.20$ ,  $R^2 = 0.96$ , for 0 °C and 5 °C, respectively). Using these prediction equations, IMP and Hx could be used as indicators of loss of freshness, since the proportion of their changes correlates parallelly with the loss of muscle freshness during storage.

### K value

The K value is one of the most widely used biochemical methods for assessing the freshness products of aquatic



**Figure 1.** ATP and related degradation compounds until hypoxanthine in tilapia (*Oreochromis niloticus*) muscle stored at a) 0 °C and b) 5 °C for 20 days. ATP = adenosine 5'-triphosphate, ADP = adenosine 5'-diphosphate, AMP = adenosine 5'-mophosphate, IMP = Inosine 5'-mophosphate, HxR = Inosine and Hx = Hypoxantine. Data points are the mean of  $n = 6$  for each sampling. Bars represent the standard deviation.

**Figura 1.** ATP y productos de degradación hasta hipoxantina en músculo de tilapia (*Oreochromis niloticus*) almacenado a) 0 °C y b) 5 °C por 20 días. ATP = adenosina 5'-trifosfato, ADP = adenosina 5'-difosfato, AMP = adenosina 5'-monofosfato, IMP = inosina 5'-monofosfato, HxR = inosina e Hx = hipoxantina. Los datos son la media de  $n = 6$ . Las barras representan la desviación estándar.

origin, as it provides a high correlation between loss of freshness and sensory quality with respect to storage time (Saito *et al.*, 1959; Ryder, 1985; Lowe *et al.*, 1993). Figure 2 shows an initial K value of  $2.82 \pm 0.4$  %. This result is similar to those described by Ocaño-Higuera *et al.* (2011) and Jiménez-Ruiz *et al.* (2019), who reported initial values of 5 % and 3.4 % in stingray (*Dasyatis brevis*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*) muscle stored in ice, respectively.

Regarding the storage temperature, a more significant increase ( $P < 0.05$ ) was present in the K value percentage at 5 °C. This increase coincided with the higher hydrolysis rate of ATP and the consequent increase in the concentration of Hx at that same temperature. At the end of storage, this study found K value of  $39.5 \pm 2.6$  % and  $47.2 \pm 2.9$  % for 0 °C and 5 °C, respectively. These values are lower than those reported by Özoğul *et al.* (2006), Bosco *et al.* (2010), Liu *et al.* (2010)

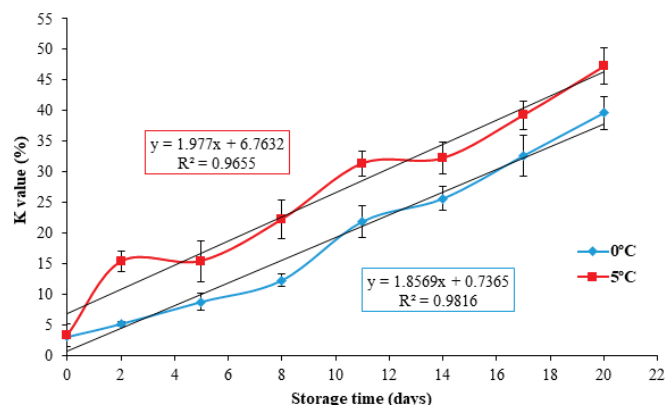


Figure 2. K value in tilapia (*Oreochromis niloticus*) muscle stored at 0 and 5 °C for 20 days. Data points are the mean of n = 6 for each sampling. Bars represent standard deviation.  
 Figura 2. Índice K en músculo de tilapia (*Oreochromis niloticus*) almacenado a 0 y 5 °C por 20 días. Los datos son la media de n = 6. Las barras representan la desviación estándar.

and Jiménez-Ruiz *et al.* (2019), who reported final K values of 90 %, 58 %, ~72 % and ~60 % in turbot (*Scophthalmus maximus*), medregal (*Seriola dumerilii*), tilapia (*Oreochromis niloticus*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*) muscle at 19, 15, 17 and 19 days of ice storage, respectively. Figure 2 shows that the K value presented a linear behavior ( $P < 0.05$ ) with respect to storage time: ( $Y = 1.85x + 0.73$ ,  $R^2 = 0.98$ ; and  $Y = 1.97x + 6.76$ ,  $R^2 = 0.96$ ) for 0 °C and 5 °C, respectively. With the above prediction equations, the K value could be used as an indicator to assess freshness in tilapia muscle.

The results obtained from the K value, demonstrate that by storing the tilapia muscle at a 0 °C, results in greater freshness, which implies that the product can be preserved with good quality for a longer period.

### pH and TVB-N

Batista *et al.* (2004), Özcan *et al.* (2011) and Jiménez-Ruiz *et al.* (2019) indicated that pH determination during storage is a good indicator of muscle quality in marine organisms. Figure 3 illustrates that the initial pH value in tilapia muscle was  $6.77 \pm 0.03$ , which decreased significantly ( $P < 0.05$ ) after five days after storage, to values of  $6.62 \pm 0.07$  and  $6.58 \pm 0.08$ , for 0 °C and 5 °C, respectively. The speed and degree of muscular pH decrease is due to the accumulation of lactic acid and its dissociation under postmortem anaerobic conditions, which in turn is a function of the amount of glycogen in the muscle (Tomé *et al.* 2000; Batista *et al.* 2004; Durán *et al.* 2008), the species (Durán *et al.* 2008), and the levels of activity or stress generated during capture, as well as the type of muscle (Ocaño-Higuera *et al.* 2009).

The pH values at the end of storage increased ( $P < 0.05$ ) to  $6.86 \pm 0.05$  and  $6.93 \pm 0.02$  for 0 °C and 5 °C, respectively. The increase in pH during storage has been associated with the formation of volatile compounds such as ammonia and certain amines produced by autolytic route, as well as by bacterial action on free amino acids (Liu *et al.* 2010; Günşen

*et al.*, 2011). This study found no significant differences in pH behavior ( $P \geq 0.05$ ) concerning storage temperature.

On the other hand, the determination of TVB-N is one of the most commonly used tests to measure the deterioration of fish products. Figure 3 illustrates an initial TVB-N value of  $26.2 \pm 1.6$  mg N/100 g, greater than the 10.2 and 6.5 mg N/100 g described by Pankyamma *et al.* (2020) and Liu *et al.* (2010), respectively, for tilapia (*Oreochromis niloticus*) muscle.

Regarding storage time, a significant increase in TVB-N values was present until reaching  $32.2 \pm 1.6$  and  $36.5 \pm 1.5$  mg N/100 g at 0 °C and 5 °C, respectively, at the end of storage. In the case of fish products, the maximum established value allowed for a product suitable for human consumption is 30 mg N/100 g of muscle (Gökodlu *et al.* 1998), a value obtained in this study at 17 (0 °C) and 8 (5 °C) days. It is important to emphasize that for these days of storage, both the pH values and the microbial load increased. Therefore, the TVB-N content increased due to the growth of deteriorating microorganisms, which are capable of generating volatile compounds characteristic deterioration.

The TVB-N content exhibited significant differences ( $P < 0.05$ ) at the storage temperatures evaluated, being greater at 5 °C, which agrees with the increase of the total count of microorganisms reached at this same temperature. It has also been described that the increase in TVB-N content can be related to species, food, temperature, and in general, to post-capture handling and storage conditions (Durán *et al.* 2008; Ocaño-Higuera *et al.* 2009; Liu *et al.* 2010).

### Texture and WHC

The literature reports that during storage, fishery products present a loss of texture (Sato *et al.* 1991). In this study, the texture evaluated by cutting effort decreased ( $P < 0.05$ ) with storage time, from an initial value of  $6.52 \pm 0.22$  N to final values of  $2.6 \pm 0.3$  and  $2.4 \pm 0.5$  N at 0 °C and 5 °C, respectively (Figure 4). These values are superior to those reported by Liu *et al.* (2010), who obtained a value of 0.29 N in

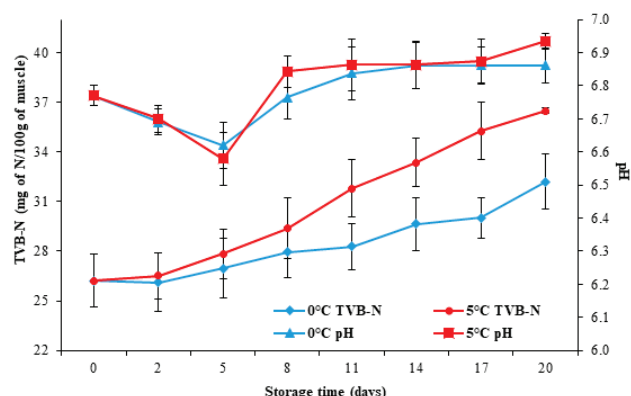
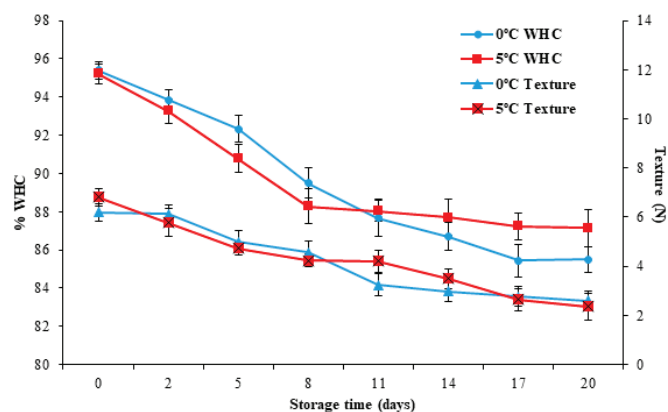


Figure 3. Changes in pH and TVB-N in tilapia (*Oreochromis niloticus*) muscle stored at 0 and 5 °C during 20 days. Data points are the mean of n = 6 for each sampling. Bars represent standard deviation.

Figura 3. Cambios de pH y BVT-N en músculo de tilapia (*Oreochromis niloticus*) almacenado a 0 y 5 °C por 20 días. Los datos son la media de n = 6. Las barras representan la desviación estándar.



**Figure 4.** Changes in texture (shear force) and water holding capacity (WHC) in tilapia (*Oreochromis niloticus*) muscle stored at 0 and 5 °C for 20 days. Data points are the mean of n = 6 for each sampling. Bars represent standard deviation.

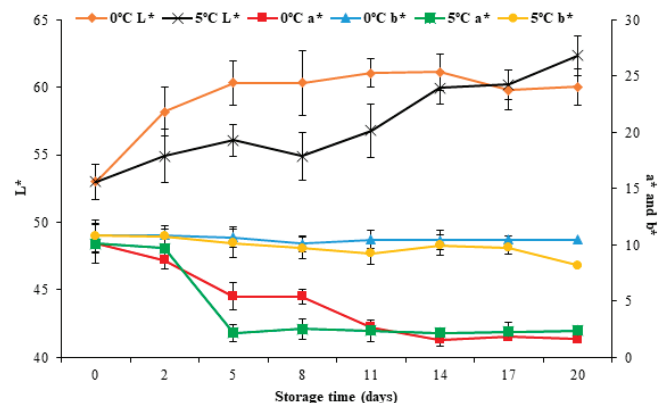
**Figura 4.** Cambios de textura (fuerza al corte) y capacidad de retención de agua (CRA) en músculo de tilapia (*Oreochromis niloticus*) almacenado a 0 y 5 °C por 20 días. Los datos son la media de n = 6. Las barras representan la desviación estándar.

tilapia (*Oreochromis niloticus*) muscle after 17 days of storage at 0 °C. The decrease can be attributed to autolytic degradation (Huss, 1998). Durán *et al.* (2008), Liu *et al.* (2010) and Jiménez-Ruiz *et al.* (2019), reported autolytic degradation caused by the action of endogenous proteases on the integrity of myofibrillary proteins, especially cathepsins, calpains, and hydrolytic enzymes such as elastases and collagenases. These enzymes, in turn, cause modifications in structural and functional characteristics such as the reduction of WHC (Delbarre *et al.*, 2006). Moreover, various factors observed in the postmortem stage affect the texture, such as glycolysis, *rigor mortis*, lower pH, and storage temperature, among others (Hyldig and Nielsen, 2001). In this study, the texture was not affected ( $P \geq 0.05$ ) by the storage temperature.

Water holding capacity is a fundamental property when assessing muscle quality (Ocaño-Higuera *et al.*, 2009). Figure 4 illustrates that the WHC decreased ( $P < 0.05$ ) from an initial value of  $95.3 \pm 0.4$  to values of  $85.5 \pm 0.6$  % and  $87.1 \pm 0.9$  % for 0 °C and 5 °C, respectively, on the 20<sup>th</sup> day of storage. However, it was not significantly affected ( $P \geq 0.05$ ) by the storage temperature. These changes in WHC can be associated with pH and texture changes in fillets during storage.

### Color

Color is another of the parameters used to evaluate the quality of fish products. Figure 5 show color changes as a function of  $L^*$ ,  $a^*$ , and  $b^*$  parameters during storage at 0 °C and 5 °C for 20 days. It can be observed that in the case of  $L^*$ , the initial value increased ( $P < 0.05$ ) from  $53.0 \pm 1.1$  to  $60.0 \pm 1.4$  and  $62.3 \pm 1.5$  at 0 °C and 5 °C, respectively, on the 20<sup>th</sup> day of storage. This increase may be because the muscle presented fluid loss by exudation, which produces an aqueous aspect and a greater refraction of light rays, causing an increase in luminosity. For parameter  $a^*$ , an initial value of  $10.1 \pm 1.8$  was observed. Subsequently, this value decreased



**Figure 5.** Color changes in tilapia (*Oreochromis niloticus*) muscle stored at 0 and 5 °C for 20 days. Data points are the mean of n = 6 for each sampling. Bars represent standard deviation.

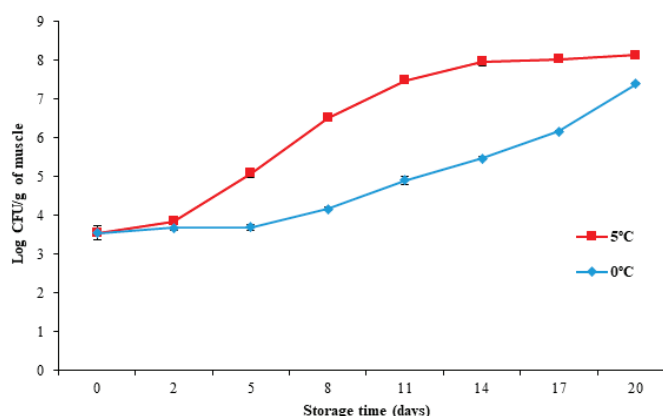
**Figura 5.** Cambios en el color del músculo de tilapia (*Oreochromis niloticus*) almacenado a 0 y 5 °C por 20 días. Los datos son la media de n = 6. Las barras representan la desviación estándar.

( $P < 0.05$ ) to  $1.6 \pm 0.3$  and  $2.4 \pm 0.8$  for 0 °C and 5 °C, respectively. For parameter  $b^*$ , it decreased ( $P < 0.05$ ) from  $10.8 \pm 0.9$  to  $10.5 \pm 0.4$  and  $8.2 \pm 0.6$  for 0 °C and 5 °C, respectively. Of the color parameters, only  $L^*$  showed changes ( $P < 0.05$ ) concerning the storage temperature.

### Total count of mesophilic microorganisms

The plate counting technique is commonly used to determine the content of viable microorganisms in food. Figure 6 illustrates that the initial mesophilic microorganism count increased ( $P < 0.05$ ) from  $3.54 \pm 0.18$  Log CFU/g to  $7.3 \pm 0.03$  and  $8.1 \pm 0.03$  CFU/g for 0 °C and 5 °C, respectively, with the storage temperature ( $P < 0.05$ ) affecting the microbiological count. This increase was more evident at 5 °C, which agrees with the increases in pH, TVB-N, and Hx found for the same storage temperature.

The International Standard sets a maximum permitted value of 7 Log CFU/g of mesophilic microorganisms for fresh



**Figure 6.** Changes in total count of mesophilic microorganisms in tilapia (*Oreochromis niloticus*) muscle stored at 0 and 5 °C for 20 days. Data points are the mean of n = 3 for each sampling. Bars represent standard deviation.

**Figura 6.** Cambios en la cuenta total de microorganismos mesófilos en músculo de tilapia (*Oreochromis niloticus*) almacenado a 0 y 5 °C por 20 días. Los datos son la media de n = 3. Las barras representan la desviación estándar.

or chilled fish for human consumption. Based on the above recommendations, tilapia muscle has an edible quality of at least 14 days during storage at 0 °C ( $5.46 \pm 0.04$  Log CFU/g), and of at least eight days at 5 °C ( $6.51 \pm 0.07$  Log CFU/g).

## CONCLUSIONS

Storage temperature affected the quality and shelf life of tilapia fillet (*Oreochromis niloticus*), obtaining a shelf life of 16 days at 0 °C and 12 days at 5 °C. The results of this study will allow for a better use of this species.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank CONACyT Mexico for the scholarship granted to the first author for the development of his master's thesis.

## CONFLICT OF INTERESTS

The authors have declared no conflicts of interest for this article.

## REFERENCES

- Alasalvar, C., Taylor, K.D.A. y Shahidi, F. 2002. Comparative quality assessment of cultured and wild sea bream (*Sparus aurata*) stored in ice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (50): 2039-2045.
- Batista, M. G., Lessi, E., Kodaira, M. y Falcão, P.D.T. 2004. Alterações bioquímicas *post-mortem* de *matrinã brycon cephalus* (Günther, 1869) procedente da piscicultura, mantido em gelo. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 24(4): 573-581.
- Bosco, A. J., Inoue, K., Shibata, T. y Aoki, T. 2010. Effect of bleeding on the quality of amberjack *Seriola dumerili* and red sea bream *Pagrus major* muscle tissues during iced storage. *Food Science and Technology*. 76: 389-394.
- Cheng, C.S., Hamann, D.D., Webb, N.B. y Sidwell, V. 1979. Effects of species and storage time on minced fish gel texture. *Journal of Food Science*. 44: 1087-1092.
- Cheng, J.H., Sun, D.W., Zeng, X.A. y Liu, D. 2013. Recent advances in methods and techniques for freshness quality determination and evaluation of fish and fish fillets: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 55(7): 1012-1225.
- Delbarre, L.C., Chéret, R., Taylor, R. y Verrez, B.V. 2006. Trends in *postmortem* aging in fish: understanding of proteolysis and disorganization of the myofibrillar structure, *Critical Reviews in Food Science*. 46(5): 409-421.
- Díaz-Tenorio, L.M. 2006. Cambios *postmortem* en el músculo de camarón patiblanco (*Litopenaeus vannamei*) y el efecto de procesos post-cosecha en su textura. (Tesis inédita de doctorado). Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. La Paz, B.C.S. México.
- Durán, A., Erdemli, U., Karakaya, M. y Tyilmaz, M. 2008. Effects of slaughter methods on physical, biochemical and microbiological quality of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and mirror carp *Cyprinus carpio* filleted in pre- in- or post-rigor periods, *Fisheries Science*. 74(5): 1146-1156.
- Fitzsimmons, K. 2016. Tilapia aquaculture 2016 and where will we be in 2026. *ISTA 11. WAS-APC 2016*. Surabaya, Indonesia. pp. 51.
- Gökodlu, N., Özden, Ö. y Erkan, N. 1998. Physical, chemical and sensory analyses of freshly harvested sardines (*Sardina pilchardus*) stored at 4 °C. *Journal of Aquatic Food Product Technology*. 7(29): 5-15.
- Günşen, U., Özcan, A. y Aydin, A. 2011. Determination of some quality criteria of cold storage marinated anchovy under vacuum and modified atmosphere conditions. *Journal Fisheries Aquatic Science*, 11, 233-242.
- Huss, H. H. 1998. Quality and quality changes in fresh fish. *FAO, Fisheries Technical Paper*, pp. 348, Food and Agriculture of the United Nations. pp. 202. Rome, Italy.
- Hyldig, G. y Nielsen, D. 2001. A review of sensory and instrumental methods used to evaluate the texture of fish muscle. *Journal of Texture Studies*. 32(3): 219-242.
- International Commission on Illumination (CIE). 1978. Recommendations on uniform color spaces, color difference equations, psychometric color terms. Supplement No 2 to CIE. Publication No 15, Colorimetry, Bureau Central de la CIE, Paris.
- Jiménez-Ruiz, E.I., Maeda-Martínez, A.N., Sumaya-Martínez, M.T., Sánchez-Herrera, L.M., Balois-Morales, R., López-Guzmán, G.G., Palomino-Hermosillo, Y.A. y Tortoledo-Ortiz, O. 2019. Vida de anaquel de tilapia *Oreochromis niloticus* eviscerada transportada y almacenada en hielo. *Interciencia*. 44(2): 82-87.
- Liu, S., Fan, W., Zhong, S., Ma, C., Li, P., Zhou, K. y Zhu, M. 2010. Quality evaluation of tray-packed tilapia fillets stored at 0 °C based on sensory, microbiological, biochemical and physical attributes, *Journal of Biotechnology*. 9(5): 692-701.
- Lowe, T.E., Ryder, J.M., Carragher, J.F. y Wells, R.M. 1993. Flesh quality in snapper, *Pagrus auratus*, affected by capture stress. *Journal of Food Science*. 58(4): 770-773.
- Norma Oficial Mexicana (NOM-092-SSA1-1994). 1994. Bienes y Servicios, Método para la cuenta de bacterias mesófilas aerobias en placa, Especificaciones sanitarias. México, Secretaría de Salud, pp. 26.
- Ocaño-Higuera, V.M., Maeda-Martínez, A.N., Márquez-Ríos, E., Canizales-Rodríguez, D.F., Castillo-Yáñez, F.J., Ruiz-Bustos, E., Graciano-Verdugo, A.Z. y Plascencia-Jatomea, M. 2011. Freshness assessment of ray fish stored in ice by biochemical, chemical and physical methods. *Food Chemistry*. 125: 49-54.
- Ocaño-Higuera, V.M., Márquez-Ríos, E., Canizales-Dávila, M., Castillo-Yáñez, F. J., Pacheco-Aguilar, R. y Lugo-Sánchez, M.E. (2009). *Postmortem* changes in cazon fish muscle stored on ice, *Food Chemistry*. 116(4): 933-938.
- Özoğul, Y., Özoğul, F., Kuley, E., Özkutuk, A.S., Gökbulut, C. y Köse, S. 2006. Biochemical, sensory and microbiological attributes of wild turbot (*Scophthalmus maximus*), from the black sea, during chilled storage, *Food Chemistry*. 99(4): 752-758.
- Pankyamma, V. Sandhya R.K. y Binsi P.K. 2020. Gravading process of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and evaluation of its biochemical and sensory changes during refrigerated storage. *Journal of Food Processing Preservation*. 44(9): 1-9.
- Ryder, J.M. 1985. Determination of adenosine triphosphate and its breakdown products in fish muscle by high performance liquid chromatography, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 33: 678-680.
- Saito, T., Arai, K. y Matuyoshi, M. 1959. A new method for estimating the freshness of fish, *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*. 24: 749-750.



- Sato, M., Takeuchi, M., Kanno, N., Nagahisa, E. y Sato, Y. 1991. Determination of octopine by pre-column fluorescence derivatization using benzoin. *Biochemical International*. 23(6): 1035-1039.
- Sikorski, Z.E., Kolakowska, A. y Burt, J.R. 1990. Postharvest Biochemical and microbial changes. In: Z. E. Sikorski, (Ed.) *Seafood: Resources, Nutritional Composition and Preservation*, Boca Raton, FL, CRC Press. pp. 55-75.
- Tomé, E., Iglesias, M., Kodaira, M. y González, A. 2000. Efecto de la temperatura de almacenamiento en el *rigor mortis* y en la estabilidad de la tilapia (*Oreochromis* spp.) cultivada. *Revista Científica, Facultad de Ciencias Veterinarias*. 10(4): 339-345.
- Woyewoda, A.D., Shaw, S.J., Ke, P.J. y Burns, B.G. 1986. Recommended laboratory methods for assessment of fish quality, Canadian Technical Report of Fisheries. pp. 143.



## Supplementation of corn tortilla with freeze-dried jumbo squid muscle flour: physicochemical properties and microbiological stability during storage

Suplementación de tortilla de maíz con harina de músculo de calamar gigante liofilizado: propiedades fisicoquímicas y estabilidad microbiológica durante el almacenamiento

Nina Gisella Heredia-Sandoval, Aaron Jonary Santiaguin-Padilla, María del Carmen Granados-Nevarez, Susana María Scheuren-Acevedo, Alma Rosa Islas-Rubio, Miguel Angel Mazorra-Manzano, Guillermina García-Sánchez and Juan Carlos Ramírez-Suarez\*

Centro de Investigación y Desarrollo, A.C. (CIAD, A.C.), Carretera Gustavo Enrique Astiazarán Rosas # 46, Col. La Victoria, CP. 83304, Hermosillo, Sonora.

### ABSTRACT

Corn tortilla is one of the most consumed foods in Latin America, representing a good nutrients source, although deficient in some essential amino acids. Jumbo squid (*Dosidicus gigas*) muscle possesses high-quality protein, useful for tortilla supplementation. Our objective was to elaborate corn tortillas supplemented with jumbo squid muscle flour (JSMF), using composite corn flours containing JSMF (2.5 and 5.0%), to improve their nutritional quality without affecting their physicochemical/sensory properties and storage stability. Supplementation with 5% JSMF increased ( $P < 0.05$ ) tortilla protein level, and the essential amino acids versus the control. The 2.5% JSMF tortillas were sensory acceptable ( $P \geq 0.05$ ) as the control. JSMF addition showed an antimicrobial effect on mesophilic and psychrophilic bacteria; however, yeast and moulds grew beyond the permissible limit at day 5 of storage. JSMF addition did not affect ( $P \geq 0.05$ ) the cutting force, with tortillas tending to become harder to roll without cracking as storage elapsed. Tortilla storage stability (supplemented or not) was 3 days at 2–4 °C. Results suggest the feasibility of adding JSMF to corn tortilla, improving its nutritional characteristics without markedly affecting other parameters.

**Keywords:** Corn tortilla, jumbo squid, supplementation, storage stability.

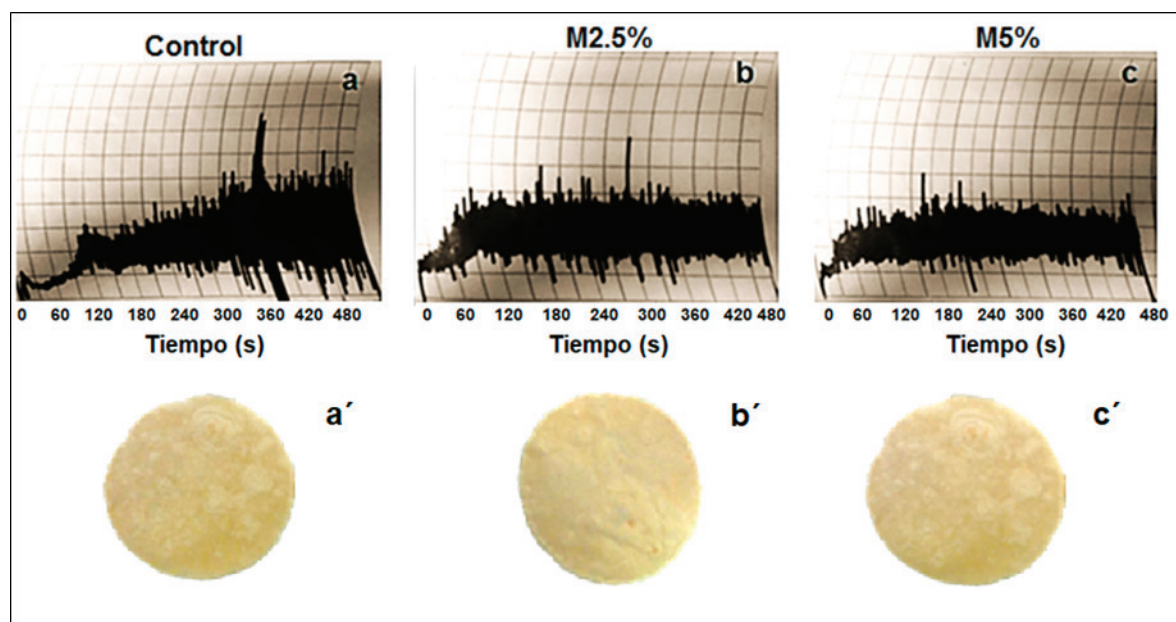
### RESUMEN

La tortilla de maíz es de los alimentos más consumidos en Latinoamérica, representa una buena fuente de nutrientes, pero deficiente en algunos aminoácidos esenciales. El músculo de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) posee proteína de alta calidad, útil para suplementar tortillas. Nuestro objetivo fue elaborar tortillas de maíz suplementadas con harina de músculo de calamar gigante (HMCG), utilizando harinas de maíz compuestas, conteniendo HMCG (2.5 y 5%), para mejorar su calidad nutricional sin afectar sus propiedades fisicoquímicas/sensoriales y su estabilidad durante el almacenamiento. La suplementación con 5% HMCG incrementó ( $P < 0.05$ ) el contenido de proteína y aminoácidos versus el control. Las tortillas con 2.5% HMCG fueron sensorialmente aceptables ( $P \geq 0.05$ ) como el control. La adición

de HMCG mostró un efecto antibacteriano contra bacterias mesófilas y psicrófilas; levaduras y hongos crecieron superando los límites permitidos al día 5 de almacenamiento. La suplementación no afectó ( $P \geq 0.05$ ) la fuerza de corte, las tortillas tendieron a ser difícilmente enrollables sin agrietarse a medida que transcurrió el almacenamiento. La estabilidad de la tortilla durante el almacenamiento (suplementada o no) fue de 3 días a 2–4 °C. Los resultados sugieren que es factible agregar HMCG a tortillas de maíz, mejorando sus características nutricionales sin afectar notablemente otros parámetros. **Palabras clave:** tortilla de maíz, calamar gigante, suplementación, estabilidad de almacenamiento.

### INTRODUCTION

Maize (*Zea mays* L.), also known as corn, is an important cereal in the human diet worldwide. Corn tortilla is an ancestral unleavened bread prepared from the grounding of lime-cooking corn kernels (process called "nixtamalization") into a cohesive dough (masa) that is molded into a flat circular (~12-18 cm diameter, see figure 1) product that is baked into the so-called tortilla (Serna-Saldivar, 2015a). Corn tortillas are one of the most important foods consumed in Mexico, as well as other Central American countries, greatly impacting their population's nutritional status. In Mexico, the National Council for the Evaluation of Social Development Policy (CONEVAL) estimates an average annual per capita corn tortillas consumption of 56.7 kg in urban areas, and 79.5 kg in rural areas (CONEVAL, 2018). Nowadays, the corn tortilla and its chips market has expanded around the world, particularly in the USA, Asia and Europe (Cortés-Gómez et al., 2005). Although corn tortillas are considered an excellent source of calories due to their high starch content and adequate level of micronutrients as iron, zinc, and vitamins A, D, E and B12 (Serna-Saldivar, 2015b), it is deficient in some essential amino acids, such as tryptophan and lysine (Martínez-Velasco et al., 2018). In protein nutrition, supplementation is the addition of a moderate quantity of quality protein with a high content of essential amino acids, to another protein source in which that amino acid is limiting, thereby improving the protein quality of the food (FAO, 1989). The nutritional value of tortillas can be upgraded by the addition of legumes and/



**Figure 1.** Mixographs and tortilla images of white corn flour and jumbo squid (*Dosidicus gigas*) muscle flour blends. a, a': Control (white corn flour); b, b': 97.5:2.5, white corn flour:squid flour mix (M2.5%); and, c, c': 95:5, white corn flour:squid flour mix (M5.0%).  
**Figura 1.** Mixogramas e imágenes de tortillas de maíz blanco y mezclas con harina de músculo de calamar gigante (*Dosidicus gigas*). a, a': Control (harina de maíz blanco); b, b': 97.5:2.5, harina de maíz blanco:harina de calamar (M2.5%); y, c, c': 95:5, harina de maíz blanco:harina de calamar (M5.0%).

or animal products. Several studies have been conducted to improve the protein score in corn tortilla by the addition of vegetable protein such as soybean products (whole, defatted flour, protein concentrates, isolates, okara, or soymilk) (Chuck-Hernández and Serna-Saldivar, 2019), cottonseed (McPherson and Ou, 1976), germinated corn (Wang and Fields, 1978), amaranth seed (Sanchez-Marroquin *et al.*, 1987), sorghum bran (Serna-Saldivar *et al.*, 1988) and animal protein such as sardine (*Sardina pilchardus*) protein concentrate (López-Alarcón *et al.* 2018) and egg (Serna-Saldivar and Perez-Carrillo, 2016). However, there has been a limited use of these ingredients most probably due to the change in the tortilla sensory properties.

Jumbo squid (*Dosidicus gigas*) is a marine cephalopod mollusc from the Ommastrephidae family, which represents one of the five main species caught in the northwest Pacific in Mexico. This species is attractive due to its abundance, high yield, low cost, low-fat content and the whiteness of its muscle (Dihort-García *et al.*, 2011; Ramirez-Suarez *et al.*, 2012). Nutritionally, the squid muscle is a source of high-quality, easily-digestible protein, containing all of the essential amino acids required by humans (Raya *et al.*, 2006). Although possessing a high nutritional quality, its consumption in Mexico is low. According to surveys, factors, such as the lack of knowledge about the nutritional properties and cooking methods, have limited the consumption of squid in the national market (De La Fuente-Betancourt *et al.*, 2008).

Therefore, the supplementation of corn products with seafood protein, a high-quality protein source, could be a good strategy to enhance their nutritional quality without affecting the physicochemical characteristics. Thus, the aim

of this study was to elaborate corn tortillas supplemented with jumbo squid (*D. gigas*) muscle flour to improve their nutritional value, evaluating its stability during storage, physicochemical and sensory properties.

## MATERIALS AND METHODS

### Raw matter and preparation of blends

Commercial white corn flour from "MINSAs" (Grupo Minsa, S.A. de C.V., Tlalnepantla, México) was used to elaborate the tortillas. Squid mantle muscle was obtained frozen from a local market. At the Seafood Laboratory of the Research Centre for Food and Development (CIAD for its initials in Spanish), the interior and exterior skins were removed. The freeze-drying technique was used to obtain a dehydrated product of the highest quality to be incorporated into tortilla production. First, mantle muscle was washed in cold water (<4 °C), cut into 10 × 10 cm pieces and frozen at -86 °C overnight, followed by lyophilisation using a Labconco freeze-drier (Labconco Corporation, Kansas City, MO, USA). The freeze-dried sample was powdered with a food processor, eliminating any remaining unprocessed collagenous fibres. Two flour blends were prepared with 97.5:2.5 (M2.5%) and 95:5 (M5.0%) corn flour:squid flour ratios. All flour mixtures were adjusted to 14% moisture, according to the American Association of Cereal Chemists (AACC) methods. Corn flour was used as a control (CRL).

### Mixograph analysis

The mixograph of the corn flour and flour blends was determined in duplicate following the method 54-40A (AACC, 1995) using a 30-g National Mixograph (National

Manufacturing Co., Lincoln, NE, USA). The amount of water to add to the blends for tortilla preparation was estimated based on the mixographs. Dough consistency was suitable for processing when dough, placed in a press covered with a plastic sheet, was easily separated from the plates (Arámbula *et al.*, 2002).

### Tortillas elaboration

Tortillas were made from corn flour (500 g) and water (500 mL for CRL and 550 mL for the squid blends). All blends (CRL and squid added) were kneaded in a domestic kneader (Kitchen Aid, K5SS, St. Joseph, MI, USA) at low speed. Once the dough was prepared, tortillas were formed by using a manual tortilla maker, placing dough portions (18 g) between two plastic covers and pressing them until tortillas of approximately 13-cm in diameter were obtained. Tortillas were cooked in an electric grill at high level (~200 °C). Cooked tortillas were cooled and packed in polythene bags (eight per bag) to avoid moisture loss and then stored at 2–4 °C. Forty tortillas per treatment were prepared.

### Physicochemical characterisation of tortillas

Proximate analysis (moisture, method 44-15A; fat, method 30-25; ash, method 08-02 and protein, method 46-30.01) was performed according to the official methods of the AACC (AACC, 1995). The physical characteristics, including weight (g), diameter (cm) and thickness (mm), were measured. Weight was determined using a regular balance. Diameter and thickness were measured using a Vernier calliper. Analyses were determined in triplicate. Water activity ( $a_w$ ) was measured using a HygroPalm  $a_w$  meter (Rotronic Instrument Corp., Huntington, NY, USA). Briefly, two tortilla layers (3.8 cm in diameter) were placed in a tray for  $a_w$  measurement.

### Amino acids composition

The effect of jumbo squid muscle flour (JSMF) addition on the protein supplemented corn tortillas was evaluated by determining the amino acid composition on previously ground and defatted tortillas, hydrolysed using 6 M HCl at 150 °C for 6 h. After cooling, hydrolysed samples were buffered to pH 2.2, then the amino acids composition was measured by HPLC using a Hewlett Packard 1100 apparatus equipped with a fluorescence detector (Hewlett Packard 1100) and an Agilent 3000-extend C18 column (3.5 × 150 mm), as described previously (Vázquez-Ortiz *et al.*, 1995).

### Storage stability of tortillas

To observe the changes in the tortilla (supplemented with JSMF) stored at 2–4 °C, microbiological and texture analyses were performed on the product at 0, 3 and 5 days. Microbiological enumeration of the aerobic mesophilic and psychrophilic bacteria, total coliforms, *Salmonella* spp., *Vibrio cholerae*, and moulds and yeasts was undertaken according to the Official Mexican Standard NOM-187-SSA1/SCFI-2002 for dough products, tortillas, tostadas and flour, and NOM-

129-SSA1-1995 for fishery products: dry-salted, smoked, cephalopods and gastropods fresh-chilled and frozen.

Total plate count, expressed as a colony forming unit/g (CFU/g), were evaluated using plate count agar medium incubated at 35 ± 1 °C for 48 h (aerobic mesophilic bacteria) and 5 ± 2 °C for 7–10 days (psychrophilic bacteria) respectively (Maturin and Peeler, 1998). Yeast and moulds were enumerated on potato dextrose agar medium incubated at 25 °C for 4 days (Tournas *et al.*, 1998). Total coliforms were assessed using lauryl-tryptose broth incubated at 35 ± 2 °C, as per standard guidelines. Total coliforms were expressed as most probable number (MNP) (Feng *et al.*, 1998). Tests were also conducted to detect the presence of bacterial pathogens, including *Salmonella* spp. (on lactose broth at 35–37 °C (Andrews and Hammack, 1998) and *V. cholerae* (on alkaline peptone water at 27–35 °C for 24 h and then on thiosulphate–citrate–bile salts–sucrose agar at 35–27 °C for 24 h).

Moisture, texture and rollability were measured on the tortillas during storage. The moisture content (method 44-15A) was assessed according to the AACC (1995). Texture analysis was performed by evaluating the cutting force using a TA-XT2 texture analyser (Texture Technologies Corp., Godalming, Surrey, UK). Briefly, the tortilla was placed on the platform and then penetrated by the probe moving at 2 mm/s. Rollability was tested by the subjective method reported by Bedolla (Bedolla, 1983). First, tortillas were cut into four strips, and then each strip was wrapped around a timber rod of 2 cm in diameter. The rupture degree was determined using his subjective scale of 1 to 5. A score of 1 represents a 100% tortilla breakage or torn tortilla; a score 3 indicates a partially ruptured tortilla or 50% breakage in tortilla structure; and a score of 5 indicates an unruptured tortilla, the best rollability. Four tortillas were measured per treatment.

### Sensory evaluation

A panel of 80 untrained individuals evaluated three sensory attributes of the tortilla (aroma, taste and general acceptability) on the day of its production (day 0) only. Responses were scored on the following hedonic scale: 1 = dislike extremely; 3 = dislike; 5 = neither like nor dislike; 7 = like; 9 = like extremely (Lawless and Heymann, 2010).

### Statistical analysis

For the physicochemical properties of the tortillas, a 3×3 factorial experiment arranged in a completely randomised design was used, considering the storage time (0, 3 and 5 days) as factor 1 and three treatments (CRL, M2.5% and M5.0%) as factor 2. For sensory evaluation, repeated measures ANOVA were used for detailed analyses. Multiple comparisons of the means were achieved by using the Tukey–Kramer test when interactions were not significant. Statistical analysis software NCSS (version 2007) was used. Values with a  $P < 0.05$  were considered statistically significant.



## RESULTS AND DISCUSSION

### Mixograph analysis

Figure 1 shows the dough resistance during mixing for each treatment. Results showed that the mixing tolerance (bandwidth after peak) decreased with increasing level of JSMF in the blends. It can be observed that as JSMF was added to corn flour, the dough retained its resistance throughout the blending time but was smaller than the CRL. The amount of water to be added for best dough consistency was determined from the mixographs. Thus, the best dough consistency for CRL (maize flour) was achieved by adding 100% of water (w/v, flour:water), while an additional 10% (w/v) of water was necessary for samples supplemented with JSMF, probably because of the increase in the water absorption capacity, considering the blends contained higher protein than the CRL (Table 1) (Adeyeye *et al.*, 2017; Kongo-Dia-Moukala and Zhang, 2011). However, JSMF addition decreased the hydration time compared with CRL. According to the mixographs, the kneading time was 3 min for the control and 3 min 30 s for the squid mixtures.

**Table 1.** Proximate composition and water activity ( $a_w$ ) of corn tortillas supplemented with 2.5 (M2.5%) and 5.0% (M5.0%) of jumbo squid muscle flour (*Dosidicus gigas*).

**Tabla 1.** Composición proximal y actividad de agua ( $a_w$ ) de tortillas de maíz suplementadas con 2.5 (M2.5%) y 5.0% (M5.0%) de harina de músculo de calamar gigante (*Dosidicus gigas*).

Sample	Moisture	Protein	Fat	Ash	$a_w$
Control	41.5 ± 0.9	8.6 ± 0.0 <sup>a</sup>	3.3 ± 0.4	1.2 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.930 ± 0.0
M2.5%	40.1 ± 0.4	10.4 ± 0.4 <sup>b</sup>	3.4 ± 0.1	1.4 ± 0.2 <sup>a</sup>	0.935 ± 0.0
M5.0%	41.8 ± 0.4	12.6 ± 0.2 <sup>c</sup>	3.4 ± 0.1	1.7 ± 0.1 <sup>b</sup>	0.950 ± 0.0

Different letters in the same column are significantly different ( $p < 0.05$ ).

### Physicochemical analysis of tortillas

The tortillas supplemented with JSMF (Figure 1) had a similar appearance to the control, although no evaluations were performed to determine differences in parameters, such as colour, appearance or texture. All tortillas were standardised to a diameter, thickness and weight of 13 cm,  $2 \pm 0.2$  mm and  $22 \pm 2$  g, respectively, to ensure the analysed samples were homogenous. The proximate composition of tortillas is shown in Table 1. Their moisture content showed no significant difference ( $P \geq 0.05$ ) between the treatments and CRL, all fluctuating between 40 and 42%. The moisture content was in the expected range for maize tortillas (34–48%; Hernández-Uribe *et al.*, 2007; Rendón-Villalobos *et al.*, 2009). Similarly, tortillas fat content (3.34–3.42%) was not affected ( $P \geq 0.05$ ) by JSMF addition, due to the low-fat content (<1%) present in the squid muscle (Ramírez-Suarez *et al.*, 2008). Tortilla ash and protein contents increased ( $P < 0.05$ ) with supplementation of JSMF at both levels. Interestingly, the addition of JSMF significantly increased ( $P < 0.05$ ) the tortilla protein content by 20 and 45% for M2.5 and M5.0%, respectively. These results highlight the great impact that JSMF addition has over the nutritional quality of the maize tortillas. Similarly, tortilla ash content also increased ( $P < 0.05$ ) due to JSMF addition. Similar behaviour was found

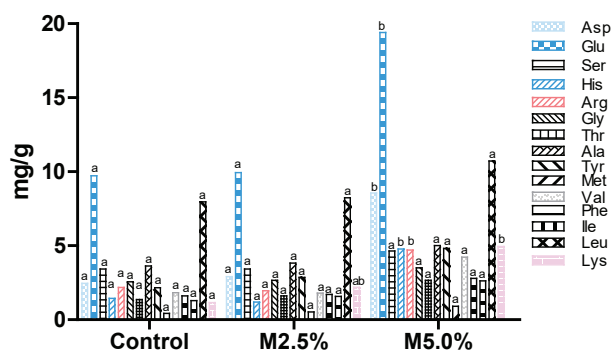
by Lopez-Alarcón *et al.* (2018) when adding sardine protein concentrate to this type of tortillas, increasing their protein and ash contents. There were no significant changes in the  $a_w$  ( $P \geq 0.05$ ) between treatments, with a mean of 0.94  $a_w$  among them. Relatively higher  $a_w$  values (0.96) were found by Tellez-Giron *et al.* (1988) in commercial corn tortillas but the storage stability was comparable between both studies, as discussed below in section 3.5.

### Amino acid composition

Although corn nixtamalisation is conducted to improve its nutritional quality over the unprocessed grain, the tortilla made from this flour is deficient in essential amino acids, such as lysine and tryptophan (Martínez-Velasco *et al.*, 2018). Figure 2 shows the amino acid composition of maize tortillas added with different levels of JSMF. As expected, with JSMF addition, the majority of essential and non-essential amino acid contents increased proportionally. Interestingly, lysine, one of the deficient essential amino acids in corn flour, increased from 2.8 mg/g in M2.5% to 5.8 mg/g in M5.0% maize tortillas. Methionine is another essential amino acid that was greatly improved in tortillas with an increase ( $P < 0.05$ ) of 175% when 5.0% JSMF was used. It is evident that jumbo squid muscle proteins, possessing high nutritional quality, improved the nutritional quality of the corn tortillas, as reflected by their increased essential amino acid content.

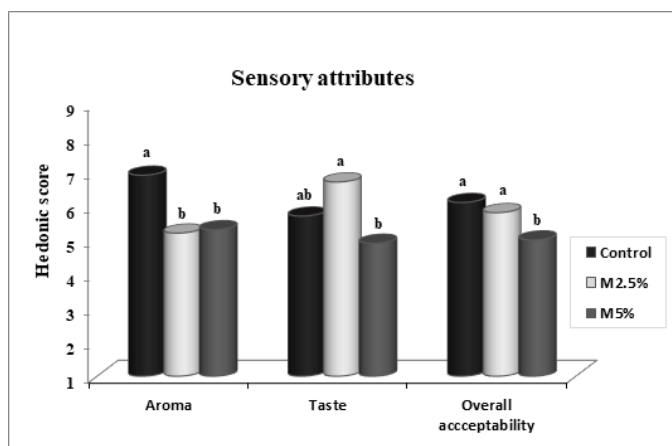
### Sensory evaluation

Figure 3 reveals the panellists' scores for the sensory attributes (aroma, taste and overall acceptability) of corn tortillas supplemented with JSMF. Aroma scores were similar between the tortillas supplemented with JSMF (M2.5% and M5.0%), although lower ( $P < 0.05$ ) than the control. As expected, and due to the nature of the material used for supplementation (JSMF), the untrained panellists perceived a "fishy" aroma, which contributed to the results. However, the supplemented tortillas scored above the range of "neither like nor dislike". Notably, the addition of JSMF to tortillas did not affect the taste attribute scores, presenting similar scores for M2.5% M5.0% and CRL ( $P \geq 0.05$ ). Moreover, overall accep-



**Figure 2.** Amino acid content of corn tortillas supplemented with 2.5 (M2.5%) and 5.0% (M5.0%) jumbo squid muscle flour (*Dosidicus gigas*).

**Figura 2.** Contenido de aminoácidos de tortillas de maíz suplementadas con 2.5 (M2.5%) y 5.0% (M5.0%) de harina de músculo de calamar gigante (*Dosidicus gigas*).



**Figure 3.** Sensory attributes of corn tortillas supplemented with 2.5 (M2.5%) and 5.0% (M5.0%) jumbo squid muscle flour (*Dosidicus gigas*). *n* = 80.

**Figura 3.** Atributos sensoriales de tortillas de maíz suplementadas con 2.5 (M2.5%) y 5.0% (M5.0%) de harina de músculo de calamar gigante (*Dosidicus gigas*). *n* = 80.

tability of the tortillas supplemented with JSMF, particularly M2.5% did not differ ( $P \geq 0.05$ ) from the control. However, tortillas supplemented with 5.0% JSMF, despite scoring the lowest ( $P < 0.05$ ) acceptability value, were still acceptable (“neither like nor dislike”).

It is reasonable to suggest that the attributes that scored lower for the supplemented tortillas than the control is because the panellists’ are unfamiliar with this type of product. No other tortillas supplemented with JSMF have been introduced into the regional market, in which no consumption of seafood products prevails.

**Storage stability of tortillas**

Changes in the microbiological quality of food influences the product shelf-life and can have an effect on consumer’s health. Corn tortillas are mostly consumed when freshly-made. However, due to its moisture and high  $a_w$ , this product presents a short shelf-life. Proposals to increase its shelf-life include storage at refrigerated temperatures either alone or in combination with antimicrobial agents (Martínez Flores *et al.*, 2004). The microbiological results of tortillas stored at 2–4 °C for 5 days are shown in Table 2. Interestingly, the addition of JSMF to the formulation affected the growth of mesophilic and psychrophilic bacteria in tortillas, especially at day 5 of storage, with values remaining under the maximum permissible level of  $1 \times 10^4$  CFU/g (NOM-147-SSA1-1996). A previous *in vitro* analysis of crude extracts from two different squid species tissues (*Loligo duvauceli* and *Doryteuthis sibogae*) indicated a potential antimicrobial effect (Barwin Vino *et al.*, 2014), which could explain the microbiological effect afforded by the addition of JSMF to corn tortillas observed in the present study.

One of the main obstacles to storing maize tortillas is mould growth, which can be delayed but not prevented (McDonough *et al.*, 2015). In this regard, all tortillas (CRL, M2.5%, M5.0%) presented permissible levels of mould and yeast (300

**Table 2.** Microbiological analysis of corn tortillas supplemented with 2.5 (M2.5%) and 5.0% (M5.0%) jumbo squid (*Dosidicus gigas*) muscle flour, stored at 2–4 °C for 5 days.

**Tabla 2.** Análisis microbiológico de tortillas de maíz suplementadas con 2.5 (M2.5%) y 5.0% (M5.0%) de harina de músculo de calamar gigante (*Dosidicus gigas*), almacenadas a 2–4 °C por 5 días.

Sample	Storage time		
	Day 0	Day 3	Day 5
Aerobic Mesophilic Bacteria (UFC/g)			
Control	600	<100	308,000
M2.5%	400	<100	300
M5.0%	300	<100	300
Aerobic Psychrophilic Bacteria (UFC/g)			
Control	<100	<100	248,000
M2.5%	<100	<100	200
M5.0%	<100	<100	<100
Yeasts and Moulds (UFC/g)			
Control	<100	<100	2,200
M2.5%	<100	<100	2,200
M5.0%	<100	<100	107,000
Total Coliforms (MPN/g)			
Control	<3	<3	<3
M2.5%	<3	<3	<3
M5.0%	<3	<3	<3
<i>Salmonella</i> spp. (presence/25g)			
Control	Absence	ND	Absence
M2.5%	Absence	ND	Absence
M5.0%	Absence	ND	Absence
<i>Vibrio cholerae</i> (presence/50 g)			
Control	Absence	ND	Absence
M2.5%	Absence	ND	Absence
M5.0%	Absence	ND	Absence

ND: not detected

CFU/g, based on NOM-147-SSA1-1996) up to storage day 3. Foodborne pathogens, such as total coliform counts, remained <3 MPN in all samples and storage days, a value below the permissible limits, indicating a good hygienic control in the processing of tortillas (Feng *et al.*, 1998). Besides, *Salmonella* spp. and *V. cholera* were absent in all samples during the study.

In addition to the microbiological control, it is also difficult to retain the original texture and sensory characteristics of tortilla after its elaboration. As the storage progresses, the tortilla texture becomes firmer and more rigid, which in turn, affect its rollability (Suhendro *et al.*, 1998).

Table 3 shows the textural properties (cutting force and rollability) measured on tortillas stored at 2–4 °C for 5 days. No differences ( $P \geq 0.05$ ) in cutting force were observed among the treatments on each storage day. In other words, the addition of JSMF did not affect the resistance strength of tortillas. However, when comparing each treatment throughout the storage, significant differences ( $P < 0.05$ ) were obser-

**Table 3.** Texture properties of corn tortillas supplemented with 2.5 (M2.5%) and 5.0% (M5.0%) jumbo squid flour (*Dosidicus gigas*), stored at 2–4 °C for 5 days.

**Tabla 3.** Textura de tortillas de maíz suplementadas con 2.5 (M2.5%) y 5.0% (M5.0%) de harina de músculo de calamar gigante (*Dosidicus gigas*), almacenadas a 2–4 °C por 5 días.

Treatment	Storage time (days)			P-value		
	0	3	5	T	S	T × S
	Cutting force (N) ± SD*			0.37	0.00	0.43
Control	3.6 ± 0.7	4.8 ± 1.2	10.9 ± 2.1			
M2.5%	4.0 ± 0.4	6.8 ± 0.7	10.7 ± 1.1			
M5.0%	3.3 ± 0.1	5.7 ± 0.5	11.1 ± 1.5			
	Rollability ± SD**			0.02	0.00	0.00
Control	4.9 ± 0.3	4.0 ± 0.6	1.8 ± 0.7			
M2.5%	4.1 ± 0.9	3.2 ± 0.7	2.3 ± 0.7			
M5.0%	4.5 ± 0.7	2.8 ± 0.9	2.1 ± 0.8			

T: Principal effect in treatments; S: Principal effect in storage time; T × S: Interaction effect between T and S. Values with  $P < 0.05$  are significantly different. Data represent mean ± standard deviation (SD). \* Triplicate means. \*\* Quadruplicate means.

ved, and it became increasingly harder to cut the tortillas. This behaviour can be related to the starch retrogradation since no major changes were noticed in the moisture content of tortillas stored for 5 days (results not shown) (Alvarez-Ramirez *et al.*, 2018). It is known that starch retrogradation causes corn tortillas to stale rapidly after elaboration (Hernández-Uribe *et al.*, 2007). Regarding the corn tortilla rollability, although a significant ( $P < 0.05$ ) interaction of the main effects was found (Table 3), no matter the treatment, the tortillas tended to become harder to roll without cracking as the storage elapsed. Nevertheless, similar values were found among treatments.

Based on the microbiological (yeast and moulds) and texture results, under the conditions of the study, all the tortillas (CRL, M2.5%, M5.0%) lasted up to 3 days when stored at 2–4°C. Results demonstrate that the addition of JSMF did not affect most of the physical characteristics of corn tortillas.

## CONCLUSION

Overall results suggest the feasibility of adding JSMF to corn tortillas for improving the nutritional characteristics, without affecting other parameters. However, more research is needed to improve storage stability. It can also be concluded that this product, with its particular fishy taste, can be introduced into other regions where consumers frequently consume fish products, considering that the addition of JSMF conferred a delicate “fishy” taste to the product.

## CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

None declared

## FUNDING

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

## REFERENCES

- AACC. 1995. Approved methods of the American Association of Cereal Chemists. AACC, St. Paul, MN.
- Adeyeye, S. A. O., Adebayo-Oyetoro, A. O. y Omoniyi, S. A. 2017. Quality and sensory properties of maize flour cookies enriched with soy protein isolate. *Cogent Food & Agriculture*, 3: 1278827.
- Alvarez-Ramirez, J., Garcia-Diaz, S., Vernon-Carter, E. J. y Bello-Perez, L. A. 2018. A novel, simple, economic and effective method for retarding maize tortilla staling. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 98: 4403-4410.
- Andrews, W. H. y Hammack, T. S. 1998. Salmonella. En: *Bacteriological Analytical Manual*. AOAC International, Gaithersburg, MD.
- Arámbula, V. G., González-Hernández, J., Moreno, M. E. y Ordorica, F. C. A. 2002. Characteristics of Tortillas Prepared from Dry Extruded Masa Flour Added with Maize Pericarp. *Journal of Food Science*. 67: 1444-1448.
- Barwin Vino, A., Shanmugam, V. y Shanmugam, A. 2014. Antimicrobial activity of methanolic extract and fractionated polysaccharide from *Loligo duvauceli Orbingy* 1848 and *Doryteuthis sibogae* Adam 1954 on human pathogenic microorganisms. *African Journal of Microbiology Research*. 8: 230-236.
- Bedolla, S. 1983. Development and characterization of instant tortilla flours from sorghum and corn by infrared cooking (micronizing) and extrusion cooking. Ph. D. Dissertation, Texas, A&M University, College Station, TX, USA.
- Chuck Hernández, C. E. y Serna-Saldivar, S.O. 2019. Capítulo 25- Soybean-Fortified Nixtamalized Corn Tortillas and Related Products. En: *Flour and Breads and their Fortification in Health and Disease Prevention*. V. R. Preedy y R. R. Watson (eds.) pp. 319-332. Academic Press.
- Coneval (2018). Evolución de la canasta alimentaria. Consulta del valor de las líneas de bienestar. <https://www.coneval.org.mx/Medicion/MP/Paginas/Lineas-de-bienestar-y-canasta-basica.aspx>
- Cortés-Gómez, A., Martí n-Martí nez, E. S., Martí nez-Bustos, F. y Vázquez-Carrillo, G. M. 2005. Tortillas of blue maize (*Zea mays* L.) prepared by a fractionated process of nixtamalization: analysis using response surface methodology. *Journal of Food Engineering*. 66: 273-281.
- De La Fuente-Betancourt, G., García-Carreño, F., Navarrete del Toro, M. A., Pacheco-Aguilar, R. y Córdova-Murueta, J. H. 2008. Effect of storage at 0 °C on mantle proteins and functional properties of jumbo squid. *International Journal of Food Science & Technology*. 43: 1263-1270.
- Dihort-García, G., Ocano-Higuera, V. M., Ezquerro-Brauer, J. M., Lugo-Sanchez, M. E., Pacheco-Aguilar, R., Barrales-Heredia, S. M. y Marquez-Rios, E. 2011. Producción y evaluación funcional de un concentrado proteico de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) obtenido mediante disolución alcalina Production and functional evaluation of a protein concentrate from giant squid (*Dosidicus gigas*) obtained by alkaline dissolution. *CyTA - Journal of Food*. 9: 171-179.
- FAO. 1989. General Guidelines for the Utilization of Vegetable Protein Products (VPP) in Foods. En: *CAC/GL 4-1989* (C. A. I. F. Standards, ed.). [http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/it/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCAC%252FBGL%252B4-1989%252FCXG\\_004e.pdf](http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/it/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCAC%252FBGL%252B4-1989%252FCXG_004e.pdf).

- Feng, P., Weagant, S. D. y Grant, M. A. 1998. Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria. En: Bacteriological Analytical Manual. AOAC International, Gaithersburg, MD.
- Hernández-Urbe, J. P., Agama-Acevedo, E., Islas-Hernández, J. J., Tovar, J. y Bello-Pérez, L. A. 2007. Chemical composition and in vitro starch digestibility of pigmented corn tortilla. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 87: 2482-2487.
- Kongo-Dia-Moukala, J. U. y Zhang, H. 2011. Defatted Corn Protein Extraction: Optimization by Response Surface Methodology and Functional Properties. *American Journal of Food Technology*. 6: 870-881.
- Lawless, H. T. y Heymann, H. 2010. Acceptance Testing. En: *Sensory Evaluation of Food*, pp. 325-344. Springer-Verlag New York.
- López-Alarcón, M., Montalvo-Velarde, I., Bernal-Gracida, L. y Barbosa-Cortés, M. L. 2018. Maíznixtamalizado suplementado con un concentrado de proteínas de sardina para mejorar el valor biológico de las tortillas. *Gaceta Médica de México*. 154: 327-334.
- Martínez-Velasco, A., Alvarez-Ramirez, J., Rodríguez-Huezo, E., Meraz-Rodríguez, M., Vernon-Carter, E. J. y Lobato-Calleros, C. 2018. Effect of the preparation method and storage time on the in vitro protein digestibility of maize tortillas. *Journal of Cereal Science*. 84: 7-12.
- Martínez Flores, H. E., Gaytán Martínez, M., Figueroa Cárdenas, J. d. D., Martínez Bustos, F., Reyes Vega, M. d. I. L. y Rodríguez Vidal, A. 2004. Effect of Some Preservatives on Shelf-life of Corn Tortillas Obtained From Extruded Masa. *Agrociencia*. 38: 285-292.
- Maturin, L. J. y Peeler, J. T. 1998. Aerobic plate count. En: Bacteriological Analytical Manual. AOAC International, Gaithersburg, MD.
- McPherson, C. M. y Ou, S. Y. L. 1976. Evaluation of corn tortillas supplemented with cottonseed flour. *Journal of Food Science*. 41(6): 1301-1304.
- McDonough, C. M., Alviola, J. N. y Waniska, R. D. 2015. Capítulo 9 - Preservatives: Extending Shelf Life and Shelf Stability. En: *Tortillas* (L. W. Rooney y S. O. Serna-Saldivar, eds.), pp. 195-200. AACC International Press.
- NOM-147-SSA1-1996. 1996. Bienes y Servicios. Cereales y sus Productos. Harinas de cereales, semolas o semolinas. Alimentos a base de cereales, de semillas comestibles, harinas, semolas o semolinas o sus mezclas. Productos de panificación. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales.
- NOM-129-SSA1-1995. 1997. Bienes y servicios. Productos de la pesca: secos-salados, ahumados, moluscos cefalópodos y gasterópodos frescos-refrigerados y congelados. Disposiciones y especificaciones sanitarias. <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/129ssa15.html>.
- NOM-187-SSA1/SCFI-2002. 2003. Productos y servicios. Masa, tortillas, tostadas y harinas preparadas para su elaboración y establecimientos donde se procesan. Especificaciones sanitarias. Información comercial. Métodos de prueba. <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/187ssa1scfi02.html>.
- Ramírez-Suarez, J. C., Ibarra-León, L. R., Pacheco-Aguilar, R., Lugo-Sánchez, M. E., García-Sánchez, G. y Carvallo-Ruiz, G. 2008. Physicochemical and functional changes in jumbo squid (*Dosidicus gigas*) mantle muscle during ice storage. *Food Chemistry*. 111: 586-591.
- Ramírez-Suarez, J. C., Islas-Rubio, A. R., Montoya-Ballesteros, L. C., Granados-Nevarez, M. C., Vázquez-Lara, F., Pacheco-Aguilar, R. y Lugo-Sánchez, M. E. 2012. Effect of lyophilized jumbo squid (*Dosidicus gigas*) fin and mantle muscle on dough properties and bread baking performance of commercial wheat flour. *CyTA - Journal of Food*. 10: 57-62.
- Raya, M. C. L., García, J. I. U., Zavala, C. A. S., Mata, M. Á. C. y Morales, L. F. B. 2006. Diagnóstico del consumo del calamar gigante en México y en Sonora. *Economía Sociedad y Territorio*. VI: 535-560.
- Rendón-Villalobos, R., Agama-Acevedo, E., Osorio-Díaz, P., Tovar, J. y Bello-Pérez, L. A. 2009. Proximal composition and in vitro starch digestibility in flaxseed-added corn tortilla. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 89: 537-541.
- Sanchez-Marroquin, A., Feria-Morales, A., Maya, S. y Ramos-Moreno, V. 1987. Processing, nutritional quality and sensory evaluation of amaranth enriched corn tortilla. *Journal of Food Science*. 52:1611-1614.
- Serna-Saldívar, S. O., Canett, R., Vargas, J., González, M., Bedolla, S. y Medina, C. 1988. Effect of value of maize and decorticated sorghum tortillas produced by extrusion-cooking. *Cereal Chemistry*. 65: 44-48.
- Serna-Saldivar, S. O. 2015a. Nutritional and nutraceutical features of regular and protein fortified corn tortillas. En: *Bread and its Fortification: Nutrition and Health Benefits*. C. M. Rosell, J. Bajerska, A. F. El Sheikh (eds.), pp. 322-354. CRC Press. Boca Raton.
- Serna-Saldivar, S. O. 2015b. Nutrition and fortification of corn and wheat tortillas. En: *Tortillas*. L. W. Rooney, S. O. Serna-Saldivar (eds), pp. 29-63. AACC International Press.
- Serna-Saldivar, S. O. y Perez-Carrillo, E. 2016. Maize. En: *Encyclopedia of Food and Health*. B. Caballero, P. Finglas y F. Toldra (eds.), pp. 601-609. Academic Press. Oxford.
- Suhendro, E. L., Almeida-Dominguez, H. D., Rooney, L. W. y Waniska, R. D. 1998. Objective Rollability Method for Corn Tortilla Texture Measurement. *Cereal Chemistry*. 75: 320-324.
- Tellez-Giron, A., Acuff, G. R., Vanderzant, C., Rooney, L. W. y Waniska, R. D. 1988. Microbiological Characteristics and Shelf Life of Corn Tortillas with and without Antimicrobial Agents. *Journal of Food Protection*. 51: 945-948.
- Tournas, V., Stack, M. E., Mislivec, P. B., Koch, H. A. y Bandler, R. 1998. Yeasts, Molds and Mycotoxins. En: Bacteriological Analytical Manual. AOAC International, Gaithersburg, MD.
- Vázquez-Ortiz, F. A., Caire, G., Higuera-Ciapara, I. y Hernández, G. 1995. High Performance Liquid Chromatographic Determination of Free Amino Acids in Shrimp. *Journal of Liquid Chromatography*. 18: 2059-2068.
- Wang, D.Y.Y. y Fields, M. L. 1978. Enrichment of home-prepared tortillas made from germinated corn. *Journal of Food Science*. 43(5): 1630-1631.





## Effect of hypoxia on purine metabolism in human skeletal muscle cells

Efecto de la hipoxia en el metabolismo de purinas en células de músculo esquelético de humanos

**Crisalejandra Rivera-Pérez<sup>1</sup>, Ramón Gaxiola-Robles<sup>2</sup>, Norma O. Olguín-Monroy<sup>3</sup>, Orlando Lugo-Lugo<sup>3</sup>, Roberto I. López-Cruz<sup>3</sup>, Tania Zenteno-Savín<sup>3\*</sup>**

<sup>1</sup> CONACYT-Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., Instituto Politécnico Nacional 195, Playa Palo Santa Rita Sur, La Paz, Baja California Sur, C.P. 23096, México.

<sup>2</sup> Hospital General de Zona No. 1, Instituto Mexicano del Seguro Social, La Paz, Baja California Sur, México.

<sup>3</sup> Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., Programa de Planeación Ambiental y Conservación, Instituto Politécnico Nacional 195, Playa Palo Santa Rita Sur, La Paz, Baja California Sur, C.P. 23096, México.

### ABSTRACT

Mammals experience some degree of hypoxia during their lifetime. In response to hypoxic challenge, mammalian cells orchestrate specific responses at transcriptional and posttranslational level, which lead to changes in purine metabolites in order to cope with threatening conditions. The aim of this study was to evaluate the response of the enzymes involved in purine metabolism at human muscle cells under hypoxic conditions. Muscle cells in culture were exposed to hypoxia and the enzymatic activity of inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH), xanthine oxidase (XO), purine nucleoside phosphorylase (PNP) and hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT) as well as their transcript expression were quantified under normoxic and hypoxic conditions. Purine metabolite (hypoxanthine (HX), xanthine (X), uric acid (UA), inosine monophosphate (IMP), inosine, nicotinamide adenine dinucleotide (NAD<sup>+</sup>), adenosine, adenosine monophosphate (AMP), adenosine diphosphate (ADP), adenosine triphosphate (ATP), guanosine diphosphate (GDP) and guanosine triphosphate (GTP)) concentrations were also quantified. Significant reduction of IMPDH activity as well as in HX and IMP concentrations ( $p < 0.05$ ) were observed after hypoxia, suggesting a decrease in the purines *de novo* synthesis. After hypoxia a global reduction of transcripts was observed, suggesting a reduction of the metabolic machinery of purine metabolism to new steady states that balance ATP demand and ATP supply pathways.

**Key words:** hypoxia, cell culture, purines, salvage pathway.

### RESUMEN

Los mamíferos experimentan cierto grado de hipoxia durante su vida. Como respuesta al reto de hipoxia, las células de mamíferos orquestan respuestas específicas a nivel transcripcional y postraducciona que conducen a cambios en los metabolitos de purinas para hacer frente a las condiciones amenazantes. El objetivo de este estudio fue evaluar la respuesta de las enzimas involucradas en el metabolismo de las purinas de células musculares humanas a condiciones hipóxicas. Las células musculares en cultivo se expusieron a hipoxia y la actividad enzimática de la inosina monofosfato

deshidrogenasa (IMPDH), la xantina oxidasa (XO), la purina nucleósido fosforilasa (PNP) y la hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT), así como su expresión de transcripción, se cuantificaron bajo condiciones de normoxia e hipoxia. Los metabolitos de purina (hipoxantina (HX), xantina (X), ácido úrico (UA), monofosfato de inosina (IMP), inosina, dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD<sup>+</sup>), adenosina, monofosfato de adenosina (AMP), difosfato de adenosina (ADP), trifosfato de adenosina (ATP), difosfato de guanosina (GDP) y trifosfato de guanosina (GTP)) también se cuantificaron. Se observó una reducción significativa de la actividad de IMPDH y de las concentraciones de HX e IMP ( $p < 0.05$ ) después de la hipoxia, lo que sugiere una disminución de la síntesis *de novo* de purinas. Después de la hipoxia, se observó una reducción global de la expresión transcripcional, lo que sugiere una reducción de la maquinaria metabólica del metabolismo de las purinas a nuevos estados estacionarios que equilibran la demanda de ATP y las vías de suministro de ATP. **Palabras clave:** hipoxia, cultivo celular, purinas, vía de rescate.

### INTRODUCTION

Purine metabolism constitutes a key pathway for every organism. It is involved in DNA and RNA synthesis and degradation, and involves the production of ubiquitous metabolites, such as adenosine triphosphate (ATP) (Yin *et al.*, 2018). There are two main routes for the synthesis of nucleotides, the *de novo* biosynthetic pathway and the complementary salvage pathway. The *de novo* biosynthetic pathway is responsible for the production of inosine monophosphate (IMP) in a twelve-step biosynthetic process with consumption of ATP (Pang *et al.*, 2012; Yin *et al.*, 2018). The complementary salvage pathway, however, converts extracellular nucleobases or degraded purine metabolites into the corresponding nucleosides and nucleotides (Nelson *et al.*, 2008), and obviates energetically expensive *de novo* synthesis of these compounds.

When mammals are exposed to oxygen limiting situations, such as breath-hold diving induced hypoxia or ische-

\*Autor para correspondencia: Tania Zenteno Savín  
 Correo electrónico: tzenteno04@cibnor.mx

Recibido: 26 de febrero de 2021

Aceptado: 19 de abril de 2021

nia, systemic and intracellular changes operate together to minimize injury and restore adequate oxygenation. During hypoxia, mammalian tissues cannot produce enough energy to maintain essential cellular processes (Giordano, 2005); thus, a reduction of ATP synthesis is produced, promoting the degradation of purine nucleotides (Nelson *et al.*, 2008) which are accumulated in the cells (Raivio *et al.*, 2001). The catabolic compounds derived from ATP breakdown, hypoxanthine (HX), inosine (I), xanthine (X), uric acid (UA) and adenosine (A), have been widely used as markers of tissue hypoxia (Maiuolo *et al.*, 2016).

Purine degradation involves the activation of purine nucleotide phosphorylase (PNP, E.C. 2.4.2.1) and xanthine oxidase (XO, E.C. 1.1.3.22) (Maiuolo *et al.*, 2016). PNP catalyzes the reversible conversion of nucleosides (guanosine, xanthosine, inosine) to purine bases (guanine, xanthine, and hypoxanthine) (Dudzinska *et al.*, 2006), while XO catalyzes the oxidation of hypoxanthine and xanthine to uric acid (Vorbach *et al.*, 2003). Salvage of purines occurs through two main enzymes, adenine phosphoribosyltransferase (APRT), which mediates the transfer of phosphoribosyl-1-pyrophosphate (PRPP), a high energy sugar phosphate, to adenine, to form adenosine monophosphate (AMP), and hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT, E.C. 2.4.2.8), which forms IMP and guanosine monophosphate (GMP) (Nelson *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008). The enzyme inosine 5-monophosphate dehydrogenase (IMPDH, E.C. 1.1.1.205) uses IMP to produce xanthosine 5-monophosphate (XMP) and, ultimately, ATP (Cherin *et al.*, 2006).

Oxygen limitation has a tissue-dependent effect (Wagner, 2008), which triggers transcriptional (Huang *et al.*, 2004; Rocha, 2007) and posttranslational (Schumacker, 2011) modifications to the enzymes involved in the nucleotide synthesis and degradation. The *de novo* biosynthetic pathway is energy demanding, requiring five ATP molecules, two glutamine and formate molecules, and one glycine, aspartate and carbon dioxide molecules to generate one IMP molecule. During 24h hypoxia in human cells, a significant increase in hypoxanthine (HX) level is produced (Nagao *et al.*, 2018), which is used by XO. Hypoxia, as well as other stimuli, including growth factors, cytokines and hormones, upregulates XO mRNA expression (Battelli *et al.*, 2016). However, XO activity increases in response to hypoxia without changes in mRNA or protein levels (Berry and Hare, 2004), indicating that XO is modulated at a posttranslational level, mainly through phosphorylation (Kayyali *et al.*, 2001).

Purine recycling in mammals increases in response to prolonged fasting and ischemia (López-Cruz *et al.*, 2014). PNP activity increases significantly during ischemia (Vannoni *et al.*, 2004) and its enzymatic deficiency in purine metabolism leads to several diseases, including Lesch-Nyhan syndrome, clinical gout, nephropathy and neurological disease (Nyhan, 2005). HPGRT activity in mammals plasma indicates an elevated purine recycling rate to avoid accumulation of non-recyclable purines (xanthine and uric acid) (López-Cruz *et al.*, 2014), which rise the need for a comprehensive unders-

tanding of the regulation of enzymes involved in the purine metabolism.

The aim of this study was to analyze and compare the enzymatic activity and transcript expression of the proteins involved in purine degradation (XO, PNP) and salvage pathway (HPGRT), and the concentration of metabolites involved in purine metabolism after hypoxic conditions in human muscle cells.

## MATERIAL AND METHODS

### Cell culture

Human skeletal muscle cells (36 cell culture boxes) were cultured in DMEM/F12 50 (Cellgro) supplemented with 15% fetal bovine serum (FBS, Gibco), antibiotics (50 U mL<sup>-1</sup> penicillin, 50 µg mL<sup>-1</sup> streptomycin), 2 mM glutamax (Gibco), 25 mM HEPES (pH 7.4) and 100 µM sodium pyruvate (Gibco). Cells (18 culture boxes) were cultured in a humid atmosphere at 35°C and serially passaged upon 80% confluence. Hypoxic conditions were obtained by placing the cells (18 cell culture boxes) in a sealed hypoxic workstation for 1 h, medium degas time took around 5 minutes. Afterwards, control cells (normoxia) and hypoxic cells (hypoxia) with 80% confluency were detached from the box using trypsin 0.25% (GIBCO) by a 4 min incubation at 35°C, then trypsin was inactivated by the addition of fresh medium. Cell suspension was recovered in 15 mL tubes, centrifuged at 1200 rpm for 10 min. Supernatant was discarded and the pellet (cells) was re-suspended in 500 µL of medium containing 1% DMSO for metabolite and protein analysis, and in tubes containing TRIzol® Reagent (15596, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) for gene expression. This process was performed for nine cell culture boxes for each treatment. All samples were stored at -80°C until further analysis.

### Protein extraction and quantification

Prior to analysis, cells (nine cell culture boxes per treatment) in medium containing DMSO were centrifuged at 1200 rpm for 15 min to remove the medium. Afterwards, 350 µL of deionized water were added and then vortexed for 30 s, followed by three cycles of freezing/thawing for cellular disruption. Finally, samples were centrifuged at 17900 x g for 15 min at 4°C. Supernatant, containing soluble proteins was recovered and stored at -80°C until further analysis. Total soluble protein was quantified using a commercial kit (Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA, USA) based on the method described by Bradford (1976). Bovine serum albumin (BSA) was used as standard, and results expressed in mg mL<sup>-1</sup>.

### Purine metabolite concentration

Concentration of purines (HX, X, A, I, NAD<sup>+</sup>, UA, IMP, AMP, ADP, ATP, XMP, GDP and GTP) was quantified in human muscle cell culture samples from normoxia and hypoxia experiments by high performance liquid chromatography (HPLC) (Waters 2695, Milford, MA, USA) (Gianattasio *et al.*, 2003). Samples were treated with 0.5 M cold perchloric acid to precipitate soluble protein, and the solution was

then neutralized with 0.5 M potassium hydroxide. The potassium perchlorate produced from the neutralization was eliminated by centrifugation at  $17900 \times g$  for 10 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . The supernatant containing the purine metabolites was recovered and filtered through a Nylon membrane filter of  $0.22 \mu\text{m}$  (Int. Millipore, Bedford, MA, USA) into a HPLC vial for analysis, the medium was also analyzed to evaluate if the metabolites were expelled from the cell during hypoxia. Purine metabolites were analyzed by HPLC in an analytical column Supelcosil C-18 ( $150 \times 4.6 \text{ mm ID}$ ,  $3 \mu\text{m}$  particle size; Waters). Metabolites were separated using a gradient from 0 to 19 min, beginning at 100% of buffer A ( $100 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$ ,  $8 \text{ mM TBA pH } 6.0$ ) to 50% buffer B ( $100 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$ ,  $8 \text{ mM TBA}$ ,  $30\% \text{ acetonitrile pH } 6.0$ ) at a flow rate of  $1.3 \text{ mL min}^{-1}$ . The eluate was monitored at  $214 \text{ nm}$ . The concentration of each purine metabolite was quantified using standard curves of a purine standards mixture ( $0.625$  to  $100 \mu\text{M}$ ), expressing the metabolite concentrations as  $\mu\text{M mg}^{-1} \text{ protein}$ .

### Enzymatic assays

#### Inosine 5'-monophosphate dehydrogenase (IMPDH, E.C. 1.1.1.205) activity

IMPDH activity was measured by quantifying the concentration of xanthosine 5'-monophosphate (XMP), resulting from the conversion of IMP, using HPLC (Waters 2695, Mildford, MA, USA) (Glander *et al.*, 2001). Enzymatic assays were performed in  $40 \text{ mM}$  sodium phosphate buffer  $\text{pH } 7.4$ , containing  $0.5 \text{ mM IMP}$ ,  $0.25 \text{ mM NAD}^+$  and  $50 \text{ mM KCl}$ . Reactions were incubated for 3 h at  $37^{\circ}\text{C}$ , subsequently  $4 \text{ M}$  cold perchloric acid was added to stop the reaction; the reaction mixture was neutralized with  $5 \text{ M}$  potassium carbonate and finally centrifuged at  $15800 \times g$  for 5 min, the supernatant was recovered and filtered through a nylon membrane filter of  $0.22 \mu\text{m}$  (Int. Millipore, Bedford, MA, USA) into an HPLC vial for analysis. XMP was analyzed by HPLC on an analytical column ODS hypersyl 125 AQ ( $250 \times 3.1 \text{ mm ID}$ ,  $3 \mu\text{m}$  particle size; Waters). XMP was separated using a gradient from 2 to 20 min, beginning at 100% of buffer A ( $100 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$ ,  $8 \text{ mM TBA pH } 6.0$ ) to 60% buffer B ( $100 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$ ,  $8 \text{ mM TBA}$ ,  $30\% \text{ acetonitrile pH } 6.0$ ) at flow rate of  $1.1 \text{ mL min}^{-1}$ . The eluate was monitored at  $214 \text{ nm}$ . The XMP concentration was quantified using XMP standard curves ( $1.5$  to  $50 \mu\text{M}$ ). One unit of IMPDH is defined as the amount of enzyme needed to produce  $1 \text{ mM}$  of XMP, and the activity expressed as  $\mu\text{M mg}^{-1} \text{ protein h}^{-1}$ .

#### Purine nucleotide phosphorylase (PNP, E.C. 2.4.2.1) activity

PNP activity was measured indirectly by the oxidation of 3, 5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonic acid/4-aminophenazone to N-(4-antipiryl)-3-chloro-5-sulphonate-b-benzoquinonamionio, by the hydrogen peroxide formed in the PNP-xanthine oxidase reaction (Chu *et al.*, 1989). Briefly, the enzymatic reaction was performed in  $22 \text{ mM}$  potassium phosphate buffer  $\text{pH } 7.5$ , containing  $25 \text{ U XO}$ ,  $2000 \text{ U}$  of horseradish peroxidase (HRP),  $160 \text{ mM}$  4-aminoantipyrine,  $120 \mu\text{M}$

potassium ferrocyanide,  $8 \text{ mM}$  3,5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonic acid, and  $12 \text{ mM}$  inosine. Production of N-(4-antipiryl)-3-chloro-5-sulfonate-p-benzoquinone-monoimine was recorded at  $520 \text{ nm}$  in a spectrophotometer (Beckman Coulter DU 800, Fullerton, CA, USA) and the change of absorbance was recorded every 5 s for 3 min. The activity of PNP expressed as units (U)  $\text{mg}^{-1} \text{ protein}$ , defining a unit of PNP activity as the amount of enzyme necessary to deplete  $1 \mu\text{M}$  of inosine per min at  $25^{\circ}\text{C}$ .

#### Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT, E.C. 2.4.2.8) activity

HGPRT activity was measured by quantifying the rate of IMP production, which is oxidized by IMPDH, using the PIERCE HPRT Assay Kit (NOVOCIB, Lyon, France) following the manufacturer's instructions. Briefly, enzymatic assay was performed in reaction buffer (1X) containing IMPDH, DTT,  $\text{NAD}^+$  and PRPP. The reaction mixture was recorded every 5 min for 120 min at  $340 \text{ nm}$  using a microplate reader (Multiskan FC, Thermo Scientific, Finland), and HGPRT activity expressed as  $\text{nmol mg}^{-1} \text{ protein h}^{-1}$ .

#### Xanthine oxidase (XO, E.C. 1.17.3.2) activity

XO activity was measured using an Amplex® Red Xanthine/Xanthine oxidase assay kit (A22182; Invitrogen, Paisley, UK). The quantification is based on the superoxide anions ( $\text{O}_2^-$ ) produced by XO, which are degraded to hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), which reacts stoichiometrically with Amplex® Red reagent to generate the oxidation product, resofurin. Briefly, the enzymatic assay was performed in reaction buffer (1X) containing  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  Amplex Red reagent solution,  $0.4 \text{ U mL}^{-1}$  HRP and  $200 \mu\text{mol L}^{-1}$  hypoxanthine, incubated for 30 min at  $37^{\circ}\text{C}$ . The presence of resofurin was recorded at  $550 \text{ nm}$  using a microplate reader (Multiskan FC, Thermo Scientific, Finland), and the XO activity expressed as  $\text{mU mg}^{-1}$ . One unit of XO activity is defined as the amount of enzyme required to produce  $1 \mu\text{M}$  of UA from HX per min at  $25^{\circ}\text{C}$ .

#### Quantification of XO, PNP, IMPDH and HGPRT transcripts RNA extraction and cDNA synthesis

Total RNA was isolated from  $1 \times 10^6$  cells of skeletal muscle cells from human cell cultures (normoxia and hypoxia) using TRIzol® Reagent (15596, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Contaminating genomic DNA was removed using DNase I (AMPD-1, Sigma-Aldrich Chemical), and total RNA concentration was spectrophotometrically determined at  $260 \text{ nm}$ . RNAs ( $1 \mu\text{g}$ ) were reverse transcribed into cDNA using the QuantiTect® Reverse Transcription kit (205313, Qiagen) using random hexamer primers and according to the manufacturer instructions. cDNA samples were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until further analysis.

#### Real-time PCR analysis

Determination of relative mRNA expression of IMPDH, XO, HGPRT and PNP was performed by real-time PCR, using



the ABI 7000 Real Time PCR (Applied Biosystems). cDNA was diluted (1:5) and analyzed using the QuantiTect<sup>®</sup> SYBR<sup>®</sup> Green PCR Kit (204145, Qiagen). The reaction mixture contained 10  $\mu\text{L}$  of SYBR<sup>®</sup> Green, 1.0  $\mu\text{L}$  of forward and reverse primers (10  $\mu\text{M}$  each), 5.0  $\mu\text{L}$  of cDNA (50 ng), and 4.0  $\mu\text{L}$  of sterile, distilled water. Controls without template were included to ensure absence of contaminating DNA. PCR reactions were carried out as follows, an initial cycle at 95°C for 15 min to activate the HotStarTaq<sup>®</sup> DNA polymerase, followed by the denaturalization of the cDNA at 94°C for 15 s, 40 cycles at 94°C for 15 s each, 60°C for 30 s, and 72°C for 30 s. The specificity of each primer set was validated by the construction of a melting curve, constructed after PCR by increasing the temperature from 75°C to 95°C at a rate of 0.3°C every 20 s. The expression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA was determined as housekeeping gene. The relative expression of target mRNA was normalized to the amount of GAPDH in the same cDNA using the standard curve method. Amplification efficiency for each analyzed gene was ~98%, using dilution from  $0.25 \times 10^{-2} \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  to  $0.25 \times 10^{-6} \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  of PCR fragments. Each RT-PCR data point is average of three independent biological replicates. Primer sequences and accession numbers for the housekeeping gene GAPDH and for the different enzyme genes are included in Table 1.

### Ethical aspects

Muscle samples were obtained in accordance with institutional ethical standards and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments from healthy volunteers subjected to programmed cesarean section at the Hospital de Especialidades Médicas Fidepaz in La Paz, Baja California Sur, México. All participants in the study signed the informed consent form, which, together with the research project, were approved by the Baja California Sur Chapter of the National Mexican Academy of Bioethics and registered with the Comité de Ética en Investigación (CONBIOÉTI-CA-09-CEI-009-20160601).

### Statistical analyses

Data were tested for normality and homoscedasticity using Kolmogorov-Smirnov ( $p < 0.05$ ) and Levene ( $p < 0.05$ ) tests, respectively. Significant differences in the non-parametric data were determined with Kruskal-Wallis and Mann-Whitney U tests (Zar, 2009). Statistical significance was considered when  $p \leq 0.05$ , determined using GraphPad Prism version 3.03.

**Table 1.** Primer sequences for real-time PCR.

**Tabla 1.** Secuencias de oligonucleótidos para PCR en tiempo real.

Target gene	Sense-primer (5'-3')	Antisense-primer (5'-3')	GenBank accession no.	Size (bp)
IMPDH	GGCTCCATCTGCATCACCCA	CCATGCCCCGGTACTTCTTG	NM_000883	262
HPRT	GACTGAAGAGCTACTGTAATG	CACCAGCAAGCTTGAACC	NM_000194	198
PNP	CTGTGTGATGATGCAGGGCAG	TCATTGGGCCCTCTGAGAGG	NM_000270	225
XO	ACAGAACACCATGAAGACCC	CTGCCACCAGTTATCAGCATG	NM_000379	224
GADPH	GGAAACTGTGGCGTGATGG	CCTGCTTACCACCTTCTTG	AF261085	216

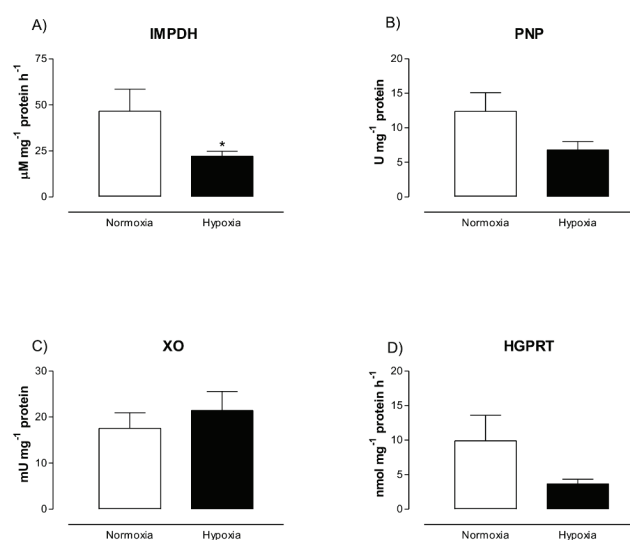
## RESULTS

### Enzyme activity

Figure 1 show the activity of IMPDH, PNP, XO and HGPRT from human skeletal muscle cells after normoxia and hypoxia conditions. IMPDH activity was significantly higher in normoxic ( $46.59 \pm 11.95 \mu\text{M mg}^{-1} \text{ protein h}^{-1}$ ) than hypoxic cells ( $22.09 \pm 2.74 \mu\text{M mg}^{-1} \text{ protein h}^{-1}$ ) ( $p < 0.036$ ). There were no significant differences in PNP, XO and HGPRT activities between treatments ( $p > 0.05$ ).

### Purine metabolite concentration

The concentration of purine bases (HX, X), nucleosides (I, A), nucleotides (AMP, GDP, ADP, GTP, ATP), NAD<sup>+</sup> and UA were measured by HPLC after normoxia and hypoxia treatments in human skeletal muscle cells (Table 2). UA was not detected in neither normoxic nor hypoxic cells. There



**Figure 1.** Effect of hypoxia on enzymes involved in purine metabolism.

A) Inosine 5'-monophosphate dehydrogenase (IMPDH) activity, B) purine nucleotide phosphorylase (PNP) activity, C) xanthine oxidase (XO) activity and D) hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT) activity. Skeletal muscle cells were incubated under normoxic or hypoxic conditions for 1 h and cells were collected and tested for each enzymatic activity. Data are shown as mean  $\pm$  S.E. of at least five independent biological experiments by triplicate. \* denotes differences between treatments ( $p < 0.05$ ).

**Figura 1.** Efecto de la hipoxia en las enzimas involucradas en el metabolismo de purinas. A) Actividad de inosina monofosfato dehidrogenasa (IMPDH), B) Actividad de purina nucleótido fosforilasa (PNP), C) Actividad de Xantina oxidasa y D) hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HPGRT). Las células de músculo esquelético fueron incubadas bajo condiciones de normoxia o hipoxia por 1 h y las células fueron colectadas y evaluadas para cada ensayo enzimático. Los datos representan medias  $\pm$  D.S. de al menos cinco experimentos biológicos independientes realizados por triplicado. Asteriscos (\*) denotan diferencias estadísticas entre tratamientos ( $p < 0.05$ ).



**Table 2.** Purine metabolite concentrations in human skeletal muscle cells exposed to hypoxia.

**Tabla 2.** Concentración de metabolitos de purina en células de músculo esquelético de humano expuestos a hipoxia.

Metabolite	Normoxia	Hypoxia
HX	1.54 (0.81, 2.17)	0.76 (0.62, 0.99)*
Xanthine	2.04 (0.99, 3.35)	1.52 (0.98, 2.06)
UA	ND	ND
IMP	1.04 (0.55, 2.12)	0.42 (0.29, 0.62)*
Inosine	4.71 (2.5, 7.22)	3.33 (1.86, 4.38)
NAD <sup>+</sup>	0.25 (0.08, 0.50)	0.21 (0.09, 0.78)
Adenosine	0.18 (0.02, 8.34)	1.11 (1.00, 1.15)
AMP	0.18 (0.02, 8.34)	1.11 (1.10, 1.15)
GDP	0.07 (0.03, 0.11)	0.05 (0.02, 0.08)
ADP	0.37 (0.06, 7.17)	0.09 (0.03, 2.68)
GTP	4.56 (2.24, 6.88)	0.08 (0.01, 2.20)
ATP	0.31 (0.17, 0.87)	0.16 (0.09, 0.60)

Hypoxanthine (HX), xanthine, uric acid (UA), inosine monophosphate (IMP), inosine, nicotinamide adenine dinucleotide (NAD<sup>+</sup>), adenosine, adenosine monophosphate (AMP), guanosine diphosphate (GDP), adenosine diphosphate (ADP), guanosine triphosphate (GTP) and adenosine triphosphate (ATP). Data are expressed in  $\mu\text{M mg}^{-1}$  protein and represent five independent experiments for each treatment. Data are presented as median (25<sup>th</sup>-75<sup>th</sup> percentiles). ND = not detected. \*=Significant differences between treatments,  $p < 0.05$ .

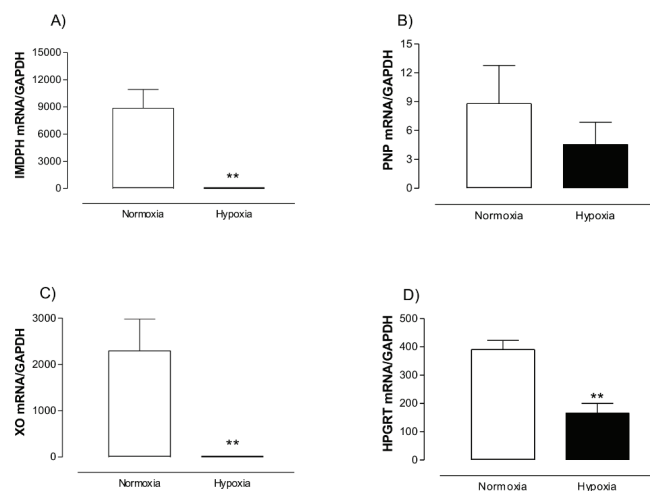
was a reduction in the content of most of the metabolites, purine bases, nucleosides and nucleotides, in cells under hypoxic conditions as compared to normoxic cells; however, differences were only statistically significant for HX and IMP concentrations ( $p = 0.0031$ ).

Hypoxia downregulates gene expression of enzymes that participate in purine metabolism

Transcripts encoding for IMPDH, PNP, XO and HGPRT were obtained from human skeletal muscle cells cDNA. The BLAST analysis of the sequences from the obtained fragments (~300 bp), confirmed the identity of the coding sequences obtained which correspond to the enzymes of purine metabolism. Quantitative real-time PCR was used to analyze the levels of expression of mRNAs encoding IMPDH, PNP, XO and HGPRT enzymes involved in purine metabolism (Fig. 2). IMPDH and XO were the most abundant transcripts, showing the highest significant reduction ( $p < 0.01$ ) after hypoxia in contrast to normoxic cells (~99% each). HGPRT mRNA showed a 58% reduction ( $p < 0.01$ ) under hypoxic conditions, while PNP presented the lowest expression from all the transcripts analyzed, and it did not show significant differences in contrast to hypoxic cells.

## DISCUSSION

Mammals have developed effective strategies to cope with oxygen limiting situations. To achieve tolerance to acute or chronic hypoxia, the organism reduces metabolism, to prevent cellular injury and maintain functional integrity (Ramirez *et al.*, 2007). Failure of these strategies results in different physiological and pathophysiological conditions



**Figure 2.** Effect of hypoxia on the expression of the enzymes involved in purine metabolism. A) Inosine 5'-monophosphate dehydrogenase mRNA (IMPDH), B) purine nucleotide phosphorylase mRNA (PNP), C) xanthine oxidase mRNA (XO), and D) hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase mRNA (HGPRT). Skeletal muscle cells were incubated under normoxic or hypoxic conditions for 1 h, afterwards cells were collected and transcripts were quantified by real-time PCR. Data were normalized using glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as housekeeping gene. Data are shown as mean  $\pm$  S.E. of three independent biological experiments by triplicate. \*=statistical differences between treatments ( $p < 0.05$ ).

**Figura 2.** Efecto de la hipoxia en la expresión de las enzimas involucradas en el metabolismo de purinas. A) Actividad de inosina monofosfato dehidrogenasa (IMPDH), B) Actividad de purina nucleótido fosforilasa (PNP), C) Actividad de Xantina oxidasa y D) hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT) RNAm. Las células de músculo esquelético fueron incubados bajo condiciones de normoxia o hipoxia por 1 h, posteriormente las células fueron colectadas y los transcritos cuantificados por PCR en tiempo real. Los datos fueron normalizados usando gliceraldehído 3-fosfato dehidrogenasa (GAPDH) como gen de referencia. Los datos representan medias  $\pm$  D.S. de tres experimentos biológicos independientes realizados por triplicado cada uno. Los asteriscos denotan diferencias estadísticas entre tratamientos ( $p < 0.05$ ).

(e.g. ischemia, inflammation and tumors) (Lahat *et al.*, 2011).

The primary response to hypoxia within the cell ultimately leads to alternative routes of ATP generation (Wheaton and Chandel, 2011). IMPDH is a key enzyme in the purine nucleotide pathway, since it controls the gateway to guanine nucleotides (Hedstrom, 2009). IMPDH activity has been widely studied in several tissues, including plasma, erythrocytes, lymphocytes, spleen and thymus (Jonsson and Carlsten, 2001; Fukuda *et al.*, 2011; Vethe *et al.*, 2014; Citterio-Quentin *et al.*, 2019) from different mammals and aquatic organisms (Velasco-Martinez *et al.*, 2016). Differential activity patterns between tissues have been reported; low activity has been observed in erythrocytes and lymphocytes ( $89 \text{ pmol mg Hb}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ,  $4514 \text{ pmol mg}^{-1} \text{ protein h}^{-1}$ , respectively) compared to human skeletal muscle cells in this study ( $46.59 \text{ } \mu\text{M mg}^{-1} \text{ protein h}^{-1}$ ). Human cells contain two IMPDH genes, which share 84% homology, although protein sequence differences does not affect their kinetic properties (Hedstrom, 2009). In the present study, a partial sequence of IMPDH from human skeletal muscle cells, amplified and sequenced contained a conserved functional region, shared by the two

IMPDH genes. Normoxic cells showed high expression of IMPDH mRNA and IMPDH activity. After hypoxia treatment, IMPDH mRNA and IMPDH activity, as well as the endogenous levels of IMP, were downregulated, suggesting that oxygen limitation transcriptionally affects the *de novo* production of purines, as has been shown in normal lymphocyte cells (Jain *et al.*, 2004) and hypoxia-treated human leukemic cells (Han *et al.*, 2006).

PNP and XO are involved in purine degradation, PNP catalyzes the inosine breakdown to hypoxanthine (Dudzinska *et al.*, 2006), the substrate for xanthine oxidase (Moriwaki *et al.*, 1999). PNP activity has been reported in erythrocytes, liver and plasma of mammals (Schomaker *et al.*, 2013; López-Cruz *et al.*, 2014; Giuliani *et al.*, 2016). Previous reports on PNP activity in human muscle cells show a higher activity in cell cultures than in human muscle homogenates (Jacobs *et al.*, 1988). In this study, muscle cell PNP activity was  $12.37 \pm 2.71 \text{ U mg}^{-1}$  under normoxic conditions, while after hypoxia treatment lower PNP activity was observed ( $6.79 \pm 1.20 \text{ U mg}^{-1}$ ), although this decrease was not significant. The same pattern was observed when the PNP mRNA was analyzed. In erythrocytes from rats, changes in PNP activity were evident after seven days of hypoxia (Hosek *et al.*, 1986), while liver from the same species required an hour to stimulate its activity (Rao *et al.*, 1989). In human adipocytes, PNP mRNA expression increased after 24h hypoxia (Nagao *et al.*, 2018). The differential activity and expression pattern of PNP among tissues, might reflect different metabolic demands of each tissue and responses to stress conditions. XO activity in muscle tissue has been reported as less than  $0.5 \text{ mU g}^{-1}$  tissue (Dorion *et al.*, 1993); in this study, higher levels of XO activity were obtained ( $17.55 \pm 3.40 \text{ mU mg}^{-1}$ ). The hypoxia treatment resulted in a mild increase of XO activity ( $21.44 \pm 4.13 \text{ mU mg}^{-1}$ ); however, this increase was not statistically significant. Previous reports indicate that moderate hypoxia significantly enhances XO activity in endothelial arterial cells (Kelley *et al.*, 2006) and skeletal muscle and human plasma (Terada *et al.*, 1992). The lack of increased activity in this study might be related to the significant reduction of HX levels observed after hypoxia ( $1.54 \mu\text{M mg}^{-1}$  under normoxia and  $0.76 \mu\text{M mg}^{-1}$  under hypoxic conditions), limiting the catalytic capability of the enzyme. This level is consistent with the absence of UA and low levels of X. Interestingly, XO mRNA expression is modulated by hypoxia in a dose- and time-dependent manner, either by enhancing their expression (moderate hypoxia) or not affecting the gene expression (Poss *et al.*, 1996; Kelley *et al.*, 2006). In this study, XO mRNA in muscle cells was downregulated in hypoxic conditions; these differences might relate to the time of exposure to hypoxia and to the level of regulation that XO presents, which is at transcriptional and posttranslational level (Kayyali *et al.*, 2001; Poss *et al.*, 1996).

The alternate pathway for purine nucleotide formation is the purine salvage pathway, in which instead of generating new purines, preexisting purine bases are taken up for the generation of nucleotides. HGPRT activity in human muscle cells has been previously reported to be  $4.8 \pm 0.015 \text{ nmoles mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (Jacobs *et al.*, 1988), which is in agreement with

the levels obtained in the muscle cell culture under basal conditions ( $9.90 \pm 3.6 \text{ nmoles mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) in this study. An increase of HGPRT activity has been observed after prolonged fasting (Soñanez-Organis *et al.*, 2012) and as a compensatory response to hypoxia in mice heart tissue (Wu *et al.*, 2015). Interestingly, cerebral hypoxia-ischemia experiments in rabbits did not show changes in HGPRT activity (Cherin *et al.*, 2006). In this study, HGPRT activity decreased after hypoxia exposure; however, this reduction was not significant at the protein level, but it was significant at the transcriptional level.

The analysis of the purine metabolites showed a significant increase in HX content, which correlates with the low activity of XO observed. These results correlated with previous findings in adipocyte tissues exposed to hypoxia, which showed an increase in HX and acid uric secretion during prolonged hypoxia (Nagao *et al.*, 2018). The significantly reduction of IMP concentration in this study, might be related to an active uptake of this compound by IMPDH, as has been shown in other mammalian tissues, including erythrocytes, placenta, liver and heart (Traut, 1994; Pérez-Milicua *et al.*, 2015).

## CONCLUSIONS

The observed reduction in enzyme activities for purine metabolism as well as their transcripts, along with the significant reduction of HX and IMP levels suggest that skeletal muscle cells respond differently to oxygen limitation than other tissues previously studied. This reduction might relate to a decrease of the metabolic machinery to avoid the excessive production of metabolites, which may lead to apoptotic signaling. This could suggest that skeletal muscle cells are able to withstand longer periods of hypoxia, before developing alternative mechanisms to cope with hypoxia effects via the salvage pathway, as has been observed in erythrocytes and plasma. However, further research is necessary to understand the mechanism underlying purine metabolism under hypoxia conditions.

## ACKNOWLEDGMENTS

Authors appreciate the assistance of the personnel at Hospital de Especialidades Médicas Fidepaz in sample collection and at Laboratorio de Estrés Oxidativo, CIBNOR, in sample processing and technical assistance. This study was funded by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (SEP-CONACYT 152784) and Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. (CIBNOR, PC0.10). RILC is recipient of a graduate scholarships from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, 270373). Suggestions by anonymous reviewers contributed to improve this manuscript. In loving memory of Dr. Robert Elsner.

## REFERENCES

- Battelli, M.G., Polito, L., Bortolotti, M. and Bolognesi, A. 2016. Xanthine oxidoreductase-derived reactive species: Physiological and pathological effects. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016: 8.

- Berry, C.E. and Hare, J.M. 2004. Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *The Journal of Physiology*. 555: 589-606.
- Borgers, M. and Thoné, F. 1992. Species differences in adenosine metabolic sites in the heart. *Histochemical Journal*. 24: 445-452.
- Bradford, M.M. 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.
- Cherin, T., Catbagan, M., Treiman, S. and Mink, R. 2006. The effect of normothermic and hypothermic hypoxia-ischemia on brain hypoxanthine phosphoribosyl transferase activity. *Neurological Research*. 28: 831-836.
- Chu, S.Y., Cashion, P. and Jiang, M. 1989. A new colorimetric assay for purine nucleoside phosphorylase. *Clinical Biochemistry*. 22: 357-362.
- Citterio-Quentin, A., Mahmoudi, A.E., Perret, T., Conway, A., Ryan, A., Beringer, A., Lachaux, A. and Boulieu, R. 2019. Red blood cell IMPDH activity in adults and children with or without azathioprine: Relationship between thiopurine metabolites, ITPA and TPMT activities. *Basic Clinical and Pharmacological Toxicology*. 124: 600-606.
- Dorion, D., Zhong, A., Chiu, C., Forrest, C.R., Boyd, B. and Pang, C.Y. 1993. Role of xanthine in reperfusion injury of ischemic skeletal muscles in the pig and human. *Journal of Applied Physiology*. 75: 246-255.
- Dudzinska, W., Hlynczak, A.J., Skotnicka, E. and Suska, M. 2006. The purine metabolism of human erythrocytes. *Biochemistry*. 71: 467-475.
- Fukuda, T., Goebel, J., Thogersen, H., Maseck, D., Cox, S., Logan, B., Shebotie, J., Seikaly, M. and Vinks, A.A. 2011. Inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH) activity as a pharmacodynamics biomarker of mycophenolic acid effects in pediatric kidney transplant recipients. *Journal of Clinical Pharmacology*. 51: 309-320.
- Giannattasio, S., Gagliardi, S., Samaja, M. and Marra, E. 2003. Simultaneous determination of purine nucleotides, their metabolites and  $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide in cerebellar granule cells by ion-pair high performance liquid chromatography. *Brain Research Protocol*. 10: 168-174.
- Giordano, F.J. 2005. Oxygen, oxidative stress, hypoxia and heart failure. *Journal of Clinical Investigation*. 115: 500-509.
- Giuliani, P., Zuccarini, M., Buccella, S., Rossini, M., D'Alimonte, I., Ciccarelli, R., Marzo, M., Marzo, A., Di Lorio, P. and Caciagli, F. 2016. Development of a new HPLC method using fluorescence detection without derivatization for determining purine nucleoside phosphorylase activity in human plasma. *Journal of Chromatography B*. 1009-1010: 114-121.
- Glander, P., Braun, K.P., Hambach, P., Bauer, S., Mai, I., Roots, I., Waiser, I., Fritsche, L., Neumayer, H.H. and Budde, K. 2001. Non-radioactive determination of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase (IMPDH) in peripheral mononuclear cells. *Clinical Biochemistry*. 34: 543-549.
- Han, Y.H., Xia, L., Song, L.P., Zheng, Y., Chen, W.L., Zhang, L., Huang, Y., Chen, G.Q. and Wang, L.S. 2006. Comparative proteomic analysis of hypoxia-treated and untreated human leukemic U937 cells. *Proteomics*. 6: 3262-3274.
- Hedstrom, L. 2009. IMP dehydrogenase: Structure, mechanism and inhibition. *Chemical Review*. 109: 2903-2928.
- Hosek, B., Bohacek, J. and Kautská, J. 1986. The effect of hypoxia on the activity of purine nucleoside phosphorylase in rats. *Biomedical and Biochemical Acta*. 45: 281-284.
- Huang, Y., Hickey, R.P., Yeh, J.L., Dadak, A., Young, L.H., Johnson, R.S. and Giordano, F.J. 2004. Cardiac myocyte-specific HIF-1 $\alpha$  deletion alters vascularization, energy availability, calcium flux, and contractility in the normoxic heart. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*. 18: 1138-1140.
- Jacobs, A.E., Oosterhof, A. and Veerkamp, J.H., 1988. Purine and pyrimidine metabolism in human muscle and cultured muscle cells. *Biochemical and Biophysical Acta*. 30: 130-136.
- Jain, J., Almquist, S.J., Ford, P.J., Shlyakhter, D., Wang, Y., Nimmesgern, E. and Germann, U.A., 2004. Regulation of inosine monophosphate dehydrogenase type I and type II isoforms in human lymphocytes. *Biochemical Pharmacology*. 67: 767-776.
- Jonsson, C.A. and Carlsten, H. 2001. Inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH) inhibition in vitro suppress lymphocyte proliferation and the production of immunoglobulins, autoantibodies and cytokines in splenocytes from MRL/pr/lpr mice. *Clinical and Experimental Immunology*. 124: 486-491.
- Kayyali, U.S., Donaldson, C., Huang, H., Abdelnour, R. and Hassoun, P.M. 2001. Phosphorylation of xanthine dehydrogenase/oxidase in hypoxia. *Journal of Biological Chemistry*. 276: 14359-14366.
- Kelley, E.E., Hock, T., Khoo, N.K.H., Richardson, G.R., Johnson, K.K., Powell, P.C., Giles, G.I., Agarwal, A., Lancaster, J.R. and Tarpey, M.M. 2006. Moderate hypoxia induces xanthine oxidoreductase activity in arterial endothelial cells. *Free Radical Biology and Medicine*. 15: 952-959.
- Lahat, N., Bitterman, H., Engelmayer-Goren, M., Rosenzweig, D., Weiss-Cerem, L. and Rahat, M.A. 2011. Reduced TIMP-2 in hypoxia enhances angiogenesis. *American Journal of Physiology- Cell Physiology*. 300: C557-C566.
- López-Cruz, R.I., Pérez-Milicua, M.B., Crocker, D.E., Gaxiola-Robles, R., Bernal-Vertiz, J.A., de la Rosa, A., Vázquez-Medina, J.P. and Zenteno-Savín, T. 2014. Purine nucleoside phosphorylase and xanthine oxidase activities in erythrocytes and plasma from marine, semiaquatic and terrestrial mammals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*. 171: 31-35.
- Maiuolo, J., Oppedisano, F., Gratteri, S., Muscoli, C. and Mollace, V. 2016. Regulation of uric acid metabolism and excretion. *International Journal of Cardiology*. 213: 8-14.
- Moriwaki, Y., Yamamoto, T. and Higashino, K. 1999. Enzymes involved in purine metabolism: a review of histochemical localization and functional implications. *Histology and Histopathology*. 14: 1321-1340.
- Nagao, H., Nishizawa, H., Tanaka, Y., Fukata, T., Mizushima, T., Furuno, M., Bamba, T., Tsushima, Y., Fujishima, Y., Kita, S., Funahashi, T., Maeda, N., Mori, M., Fukusaki, E. and Schimomura, I. 2018. Hypoxanthine secretion from human adipose tissue and its increase in hypoxia. *Obesity*. 26: 1168-1178.
- Nelson D.L., Lehninger A.L., Cox M.M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 5th ed. Ch WH Freeman and Company; New York, NY, USA: 2008. pp. 882-900.
- Nyhan, W.L. 2005. Disorders of purine and pyrimidine metabolism. *Molecular Genetics and Metabolism*. 86: 25-33.



- Pang, B., McFaline, J.L., Burgis, N.E., Dong, M., Taghizadeh, K., Sullivan, M.R., Elmquist, C.E., Cunningham, R.P. and Dedon, P.C. 2012. Defects in purine nucleotide metabolism lead to substantial incorporation of xanthine and hypoxanthine into DNA and RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 109: 2319-2324.
- Poss, W.B., Huecksteadt, T.P., Panus, P.C., Freeman, B.A. and Hoidal, J.R. 1996. Regulation of xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase activity by hypoxia. *American Journal of Physiology*. 270: 941-946.
- Raivio, K. O., Saksela, M. and Lapatto, R. 2001. Xanthine oxidoreductase – Role in human pathophysiology and in hereditary xanthinuria. En: *The metabolic and molecular bases of inherited diseases*. Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. (Eds.), 8<sup>th</sup> edn. pp 2639-2652. New York: McGraw Hill.
- Ramírez, J.M., Folkow, L.P. and Blix, A.S., 2007. Hypoxia tolerance in mammals and birds: From the wilderness to the clinic. *Annual Review of Physiology*. 69: 113-143.
- Rao, P.N., Walsh, T.R., Makowka, L., Rubin, R.S., Weber, T., Snyder, J.T. and Starzl, T.E. 1989. Purine nucleoside phosphorylase: a new marker for free oxygen radical injury to the endothelial cell. *Hepatology*. 11: 193-198.
- Schomaker, S., Warner, R., Bock, J., Johnson, K., Potter, D., Winkle, J.V. and Aubrecht, J. 2013. Assessment of emerging biomarkers of liver injury in human subjects. *Toxicological Sciences*. 132: 276-283.
- Schumacker, P.T. 2011. Lung cell hypoxia: Role of mitochondrial reactive oxygen species signaling in triggering responses. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 8: 477-484.
- Soñanez-Organis, J.G., Vázquez-Medina, J.P., Zenteno-Savín, T., Aguilar, A., Crocker, D.E. and Ortiz, R.M. 2012. Prolonged fasting increases purine recycling in post-weaned northern elephant seals. *Journal of Experimental Biology*. 215: 1448-1455.
- Pérez-Milicua, M., Zenteno-Savín, T., Crocker, D.E. and Gallo-Reynoso, J.P. 2015. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase and inosine 5'-monophosphate dehydrogenase activities in three mammalian species: aquatic (*Miroiunga angustirostris*), semi-aquatic (*Lontra longicaudis*) and terrestrial (*Sus scrofa*). *Frontiers in Physiology*. 6: 1-7.
- Terada, L.S., Guidot, D.M., Leff, J.A., Willingham, I.R., Hanley, M.E., Piermattei, D. and Repine, J.E. 1992. Hypoxia injures endothelial cells by increasing endogenous xanthine oxidase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 89: 3362-3366.
- Traut, T.W. 1994. Physiological concentrations of purines and pyrimidines. *Molecular Cell and Biochemistry*. 140: 1-22.
- Rocha, S. 2007. Gene regulation under low oxygen: holding your breath for transcription. *Trends in Biochemical Sciences*. 32: 389-397.
- Vannoni, D., Bernini, A., Carlucci, F., Civitelli, S., Pietro, M.C.D., Leoncini, R., Tabucchi, A., Tanzini, G. and Marinello, E. 2004. Enzyme activities controlling adenosine levels in normal and neoplastic tissues. *Medical Oncology*. 21: 187-195.
- Velasco-Martínez, I.C., Hernández-Camacho, C.J., Méndez-Rodríguez, L.C. and Zenteno-Savín, T. 2016. Purine metabolism in response to hypoxic conditions associated with breath-hold diving and exercise in erythrocytes and plasma from bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part: A Molecular and Integrative Physiology*. 191: 196-201.
- Vethe, N.T., Mohamad, A., Reine, P.A., Andersen, A.M., Bremer, S., Line, P.-D., Rootwelt, H. and Bergan. 2014. Simultaneous quantification of IMPDH activity and purine base in lymphocytes using LC-MS/MS: Assessment of biomarker responses to mycophenolic acid. *Therapeutic Drug Monitoring*. 36: 108-118.
- Vorbach, C., Harrison, R. and Capecci, M.R. 2003. Xanthine oxidoreductase is central to the evolution and function of the innate immune system. *Trends in Immunology*. 24: 512-517.
- Wagner, P.D. 2008. The biology of oxygen. *European Respiratory Journal*. 31: 887-890.
- Wheaton, W.W. and Chandel, N.S. 2011. Hypoxia. 2. Hypoxia regulates cellular metabolism. *American Journal of Physiology and Cellular Physiology*. 300: C385-C393.
- Wu, J., Bond, C., Chen, P., Chen, M., Li, Y., Shohet, R.V. and Wright, G. 2015. HIF-1 $\alpha$  in the heart: remodeling nucleotide metabolism. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 82: 194-200.
- Yin, J., Ren, W., Huang, X., Deng, J., Li, T. and Yin, Y. 2018. Potential mechanism connecting purine metabolism and cancer therapy. *Frontiers in Immunology*. 9: 1697.
- Zar, J.H. 2009. *Biostatistical analysis* 5<sup>th</sup> ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.
- Zhang, Y., Morar, M. and Ealick, S.E. 2008. Structural biology of the purine biosynthetic pathway. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 65: 3699-3724.





## Respuesta de cilantro (*Coriandrum sativum* L.) a la luz LED azul y roja

Coriander (*Coriandrum sativum* L.) response to blue and red LED light

J.E. Mendoza-Paredes<sup>1\*</sup>, A.M. Castillo-González<sup>1</sup>, L.A. Valdéz-Aguilar<sup>2</sup>, E. Avitia-García<sup>1</sup> y M.R. García-Mateos<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco de Mora, Estado de México, México.

<sup>2</sup> Departamento de Horticultura, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila, México.

### RESUMEN

El cilantro es una especie ampliamente aceptada debido a usos culinarios y propiedades medicinales. Este cultivo podría desarrollarse en ambiente controlado con iluminación LED y permitiría tener una producción continua, con un aumento exponencial de rendimiento y estar libre de plagas y enfermedades. Hay poca investigación sobre la respuesta del cilantro en tales condiciones. Los objetivos de este estudio fueron evaluar el efecto de cinco proporciones de luz LED azul:roja sobre parámetros de crecimiento en planta, concentración de pigmentos fotosintéticos y nutrimental en la parte aérea de cilantro 'Gladiator' bajo condiciones controladas de crecimiento. Los resultados se ajustaron a una regresión polinomial de tercer grado. Una proporción de luz azul (A) y roja (R) de A37.7 %:R62.3 % promovió los parámetros de crecimiento y concentración de pigmentos fotosintéticos, mientras que una proporción A57.7 %:R42.3 % promovió la concentración nutrimental en la parte aérea de cilantro. Lo anterior permite deducir que para una posible producción comercial de cilantro, en condiciones de ambiente controlado, la mejor proporción de luz azul y roja es de A37.7 %:R62.3 % ya que se promueve el crecimiento y por lo tanto el rendimiento comercial.

**Palabras clave:** ambiente controlado, hidroponía, pigmentos fotosintéticos, macronutrientes, micronutrientes

### ABSTRACT

Coriander is a widely accepted species due to its culinary uses and medicinal properties. This crop could be developed in a controlled environment with LED lighting and would allow continuous production, with an exponential increase in yield, and free of pests and diseases. There is little research about the response of coriander under such conditions. The objectives of this study were to evaluate the effects of five ratios of blue:red LED light on growth parameters, photosynthetic pigments and nutrients concentration in the aerial part of coriander 'Gladiator' under controlled growth conditions. The results were adjusted to a third-degree polynomial regression. A A37.7 %: R62.3 % blue (A) and red (R) light ratio promoted growth parameters and photosynthetic pigments concentration, while a A57.7 %: R42.3 % ratio promoted nutrient concentration in the aerial coriander part. This allows us to deduce that for a possible

commercial production of coriander, under controlled environment conditions, the best blue and red light ratio is A37.7 %: R62.3 %, since growth and therefore commercial yield are promoted.

**Key words:** controlled environment, hydroponic, photosynthetic pigments, macronutrient, micronutrient

### INTRODUCCIÓN

El cilantro es nativo del sur de Europa y del oeste de la región Mediterránea (Wei *et al.*, 2019), se cultiva extensamente en países de Latinoamérica, Europa central, Asia, África y Australia (Laribi *et al.*, 2015; Mahendra y Bisht, 2011). Se ha usado por diversas culturas del mundo en cuestiones culinarias y en medicina tradicional (Prachayasittikul *et al.*, 2018; Wei *et al.*, 2019), tiene actividad antimicrobiana, antioxidante, antiinflamatoria entre otras (Laribi *et al.*, 2015).

La agricultura vertical, es un sistema de producción agrícola cerrado donde se pueden controlar, establecer y monitorear, todas las variables ambientales, nutrición y de riego necesarias en una planta, el sistema está aislado del ambiente circundante mediante el uso de estructuras sólidas y herméticas, junto con el uso de una fuente de iluminación LED que sustituye a la luz solar y equipo electrónico-mecánico junto con software especializado que permite controlar el sistema totalmente, además, este sistema usa anaqueles para cultivar de manera vertical, con lo cual, se logra tener una producción continua anual, cultivos libres de plagas y enfermedades y un aumento de producción basado en el número de niveles que se puedan utilizar (Kozai y Niu, 2016). Con esta técnica de cultivo puede ser una alternativa para aminorar los efectos del estrés salino en suelos que afectan la productividad de distintos cultivos (Clarenc-Aarland *et al.*, 2020), disminuir el uso y la resistencia de pesticidas (Alvarez-Carvajal *et al.*, 2020) y una forma de producir plantas para consumo libres de contaminación con metales pesados (Márquez-Reyes *et al.*, 2020).

La luz genera tres señales, que tienen un efecto en el aparato fotosintético, en procesos bioquímicos dependientes de luz y fotorreceptores, estos en conjunto generan al final a través de una cascada de procesos fisiológicos, genéticos y bioquímicos, el crecimiento y desarrollo de la planta (Berkovich *et al.*, 2017). La planta aprovecha principalmente la luz dentro del intervalo del espectro electromagnético que

\*Autor para correspondencia: Jorge Enrique Mendoza Paredes  
Correo electrónico: jmendozaparedes@hotmail.com

Recibido: 31 de julio de 2020

Aceptado: 22 de enero de 2021

abarca desde los 400 a 700 nm llamada radiación fotosintéticamente activa (RFA) (Blankenship, 2014), sin embargo, estas absorben más activa y eficientemente la luz en las regiones del color azul (400-500 nm) y color rojo (600-700 nm), las cuales corresponden a los picos de máxima absorción de luz de los de los fotorreceptores (fitocromos, criptocromos, fototropinas y proteínas ZEITLUPE) y de los pigmentos fotosintéticos (clorofila a, b y carotenoides) que forman parte del aparato fotosintético (Huché-Thélier *et al.*, 2016). La tecnología de iluminación LED permite, dado sus espectros de emisión y pico de longitud de onda, coincidir con las regiones de luz azul y roja, con lo cual se estimula el proceso de fotosíntesis volviéndose más eficiente de manera global (Viršilė *et al.*, 2017).

Dada las dos diferentes regiones de luz azul y roja, debido su importancia bioquímica y energética, se pueden evaluar cuál es la mejor proporción de luz azul y roja, en la cual una especie tiene su mejor desarrollo en general, a partir de estos dos colores de luz (Berkovich *et al.*, 2017).

Debido a que el cilantro es una planta de porte pequeño, con ciclo corto de crecimiento y cuenta con diversos usos, propiedades y consumida en varias regiones del mundo, es un cultivo idóneo para cultivarse en agricultura vertical con iluminación LED (Kozai y Niu, 2016).

El cilantro tiene muy poca investigación en estas condiciones de crecimiento; Naznin *et al.* (2016) encontraron la mayor altura de planta con una relación de luz roja (R) y azul (A) R100:A0, el mayor número de hojas, peso fresco y seco con R10:A1 y la capacidad antioxidante con R5:A1. Nguyen *et al.* (2019), reportaron la mayor acumulación de biomasa de planta y contenido de agua en la hoja y el tallo a una temperatura de raíz de 25 °C y 300  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  con una combinación de luz (rojo+blanco+rojo lejano).

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de diferentes proporciones de luz LED roja y azul en variables del crecimiento, concentración de pigmentos fotosintéticos y contenido nutricional en la parte aérea de cilantro. Esta investigación podrá ampliar el conocimiento que se tiene del cultivo del cilantro en condiciones controladas de crecimiento con iluminación LED para su posibilidad de aplicación a nivel comercial en agricultura vertical en un futuro.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Producción de planta

Se utilizaron semillas de cilantro 'Gladiator' de Sakata Seed de México, las cuales se sembraron a una profundidad de 0.5 cm en turba rubia (Pro mix<sup>®</sup>, CAN) (pH de 5.5 y CE 0.75 en  $\text{dS m}^{-1}$ ) en contenedores de plástico rígido con un volumen de 500 mL (15 semillas por maceta). Una vez sembradas se colocaron en invernadero y fueron regadas con agua potable (pH 7.1 y CE 0.42  $\text{dS m}^{-1}$ ). La temperatura ambiental promedio fue: día 21.1 $\pm$ 0.1 °C/noche 14.2 $\pm$ 0.2 °C y la humedad relativa: día 62.1 $\pm$ 0.2 %/noche 83.3 $\pm$ 0.3 %, que se registró con un datalogger (Extech instruments<sup>®</sup> modelo RH10, USA). El periodo de emergencia duró 6 días después de la siembra y a los 9 días se colocaron en una cámara de crecimiento para iniciar los tratamientos con luz.

**Tabla 1.** Propiedades físicas de los tratamientos con diferentes proporciones de luz LED azul y roja aplicadas en cilantro 'Gladiator' cultivado bajo condiciones controladas.

**Table 1.** Physical properties of treatments with different blue and red LED light ratios applied on coriander 'Gladiator' grown under controlled conditions.

	Tratamientos				
	A0	A37.7	A57.7	A74.2	A100
PrA	A0 %	A37.7 %	A57.7 %	A74.2 %	A100 %
PrR	R100 %	R62.3 %	R42.3 %	R25.8 %	R0 %
Dtot	308.9 $\pm$ 8.7a <sup>x</sup>	309.5 $\pm$ 7.9a	305.3 $\pm$ 6.0a	308.8 $\pm$ 5.4a	305.7 $\pm$ 6.3a
LID	16.7 $\pm$ 0.5a	16.7 $\pm$ 0.4a	16.5 $\pm$ 0.3a	16.7 $\pm$ 0.3a	16.5 $\pm$ 0.3a
$\lambda$ A	-	457 $\pm$ 0b	457 $\pm$ 0a	457 $\pm$ 0b	457 $\pm$ 0b
$\lambda$ A	-	421 $\pm$ 0a	418 $\pm$ 0b	416 $\pm$ 0c	414 $\pm$ 0d
$\lambda$ A	-	510 $\pm$ 1d	516 $\pm$ 0c	518 $\pm$ 0b	521 $\pm$ 0a
%DA	-	37.7 $\pm$ 0.9d	57.7 $\pm$ 0.6c	74.2 $\pm$ 0.6b	100.0 $\pm$ 0.0a
$\lambda$ R	636 $\pm$ 0b	635 $\pm$ 0c	637 $\pm$ 0a	636 $\pm$ 0b	-
$\lambda$ R	594 $\pm$ 0c	594 $\pm$ 0c	597 $\pm$ 0b	599 $\pm$ 0a	-
$\lambda$ R	674 $\pm$ 0a	671 $\pm$ 0b	670 $\pm$ 0c	665 $\pm$ 0d	-
%DR	100.0 $\pm$ 0.0a	62.3 $\pm$ 0.9b	42.3 $\pm$ 0.6c	25.8 $\pm$ 0.6d	-

<sup>x</sup>Medias  $\pm$  DE con letras iguales en las filas son estadísticamente iguales (Tukey,  $P \leq 0.05$ ). A= Luz LED azul; R= Luz LED roja; PrA= Proporción azul; PrR= Proporción rojo; Dtot= Densidad de flujo de fotones fotosintéticos total de tratamiento ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ); LID= Luz integral diaria ( $\text{mol m}^{-2} \text{d}^{-1}$ );  $\lambda$ A= Pico de longitud de onda (nm) color azul;  $\lambda$ A= Intervalo de longitud de onda (nm) color azul; % DA= Porcentaje de densidad de flujo de fotones fotosintéticos de luz azul (%);  $\lambda$ R= Pico de longitud de onda (nm) color rojo;  $\lambda$ R= Intervalo de longitud de onda color rojo (nm); % DR= Porcentaje de densidad de flujo de fotones fotosintéticos de luz roja (%).

### Cámara y gabinetes de crecimiento

Se adaptó una cámara de crecimiento con medidas interiores de 2.76 m x 2.76 m x 1.90 m (ancho, largo y altura), las modificaciones internas de la cámara de crecimiento se basó en el diseño de Katagiri *et al.* (2015), con las cuales se logró regular la temperatura ambiental y la humedad relativa a través de un aire acondicionado portátil (LG<sup>®</sup> modelo LP1017WSR 10200 BTU, KOR) y un deshumidificador (Whirlpool<sup>®</sup> modelo WAD200 5Q 20L/24 h, USA), los que se colocaron dentro de la cámara de crecimiento. Se diseñaron cinco gabinetes de crecimiento con la finalidad de mantener aislados los tratamientos de luz. Éstos se construyeron a partir de un anaquel metálico (0.3 m de ancho x 0.85 m de largo x 1.00 m de altura), al cual se le añadieron paredes de placas de unicele de 2 cm de grosor forradas con papel aluminio, con la finalidad de tener un máximo de reflexión de la luz en su interior.

### Tratamientos con diferentes proporciones de luz LED roja y azul

Las luminarias que se utilizaron fueron hechas a mano, compuestas por perfiles de aluminio de 5 cm x 85 cm (ancho x largo) en donde se anclaron los focos LED (Longniu<sup>®</sup> modelo GR-DB015 4 watts, CHN). Las luminarias fueron colocadas debajo de la parte superior de cada uno de los gabinetes de crecimiento. Se utilizaron dos perfiles por tratamiento (12 focos LED por perfil), los diferentes tratamientos de luz

se describen en el Cuadro 1. La densidad de flujo de fotones fotosintéticos (DFFF) ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y las propiedades físicas del espectro electromagnético de los tratamientos se midió con un espectroradiómetro (Apogee instruments® modelo SS-110, EUA) tomándose 124 mediciones del área de crecimiento de cada una de las unidades experimentales ( $66 \text{ cm} \times 20 \text{ cm} = 1320 \text{ cm}^2$ ) (Cuadro 1).

Se realizó un análisis estadístico de las variables físicas de los tratamientos (Cuadro 1) para asegurar que las intensidades de luz entre tratamientos LED fueran iguales, las proporciones de luz azul y roja fueran diferentes, además de verificar el pico de longitud de onda (nm) e intervalo de la luz LED presente en los tratamientos. Se estableció un fotoperiodo para todos los tratamientos de luz de 15 h por día durante 48 días después de la siembra.

#### Condiciones de crecimiento en la cámara de crecimiento

A los siete días después de iniciar los tratamientos con luz, se ralearon las plantas para dejar tres plantas por contenedor. Los contenedores se regaron diariamente con 200 mL con la solución nutritiva de Hoagland (Hoagland y Arnon, 1950) al 50% de concentración de los macronutrientes con pH de 5.8 y CE de  $1.33 \text{ dS m}^{-1}$ , los cuales se abastecieron con la mezcla comercial Tradecorp® AZ ( $0.065 \text{ g L}^{-1}$ ). La temperatura ambiental promedio fue: día  $24.2 \pm 0.1$  °C/noche  $22.7 \pm 0.1$  °C y la humedad relativa promedio: día  $62.1 \pm 0.2$  %/noche  $83.3 \pm 0.3$  %, se registró cada minuto la temperatura ambiental y la humedad relativa con el promedio de tres datalogger (Extech instruments® modelo RH10, USA), ubicados a nivel de copa de planta dentro de tres gabinetes seleccionados. La temperatura promedio de la solución nutritiva se midió con un termómetro infrarrojo (Extech instruments® modelo 42530, USA) y tuvo un valor de  $21.8 \pm 0.1$  °C y la concentración promedio de  $\text{CO}_2$  se midió en 4 momentos del día (7 am, 12 pm, 17 pm, 22 pm) con medidor portátil  $\text{CO}_2$  ambiental (Extech instruments® modelo CO250, USA) y fue de  $378 \pm 53$  ppm.

#### Variables de crecimiento de planta

Después de 48 días con los tratamientos de luz LED las plantas se cosecharon y se determinó de la parte aérea: la altura de planta (cm), peso fresco ( $\text{g planta}^{-1}$ ) con una balanza de precisión (Ohaus® Scout Pro, USA), número de hojas (planta) y el área foliar ( $\text{cm}^2 \text{ planta}^{-1}$ ) con un integrador de área foliar (LICOR®, modelo LI-3100, USA). Posteriormente, la parte aérea se secó en una estufa de aire forzado (BINDER® modelo FED 115, DEU) por 48 horas a 65 °C y se registró el peso seco ( $\text{g planta}^{-1}$ ) con una balanza de precisión (Ohaus® Scout Pro, USA). A partir de estos datos se calculó el índice de área foliar con base en la fórmula [área foliar ( $\text{cm}^2$ )/área de cultivo ( $\text{cm}^2$ )]. En cada una de las variables medidas se utilizaron cinco repeticiones por tratamiento.

#### Concentración de pigmentos fotosintéticos

Las concentraciones de clorofila a, b y total ( $\text{mg g}^{-1}$  de peso fresco), proporción de clorofila a/b y concentración

de carotenoides ( $\text{mg g}^{-1}$  de peso fresco) se determinaron mediante la metodología descrita por la AOAC (1980). Estas variables se determinaron en hojas frescas al momento de la cosecha. Se utilizaron tres repeticiones por tratamiento.

#### Concentración nutrimental en la parte aérea

Se determinaron K, P, S, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn y Cu en un espectrofotómetro de Emisión Atómica de Plasma por Inducción Acoplada (ICP-AES) (VARIAN modelo Liberty II, USA). La concentración de N se determinó con el método micro-Kjeldahl (Alcántar y Sandoval, 1999). Se utilizaron tres repeticiones por tratamiento.

#### Diseño experimental y análisis estadístico

El experimento se estableció en un diseño completamente al azar, una repetición estuvo constituida por un contenedor con tres plantas. Los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y a la prueba de comparación de medias de Tukey ( $P < 0.05$ ) y a un análisis de ajuste a regresión polinomial de tercer grado mediante el programa SAS V9.0 (SAS Institute, 2002).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

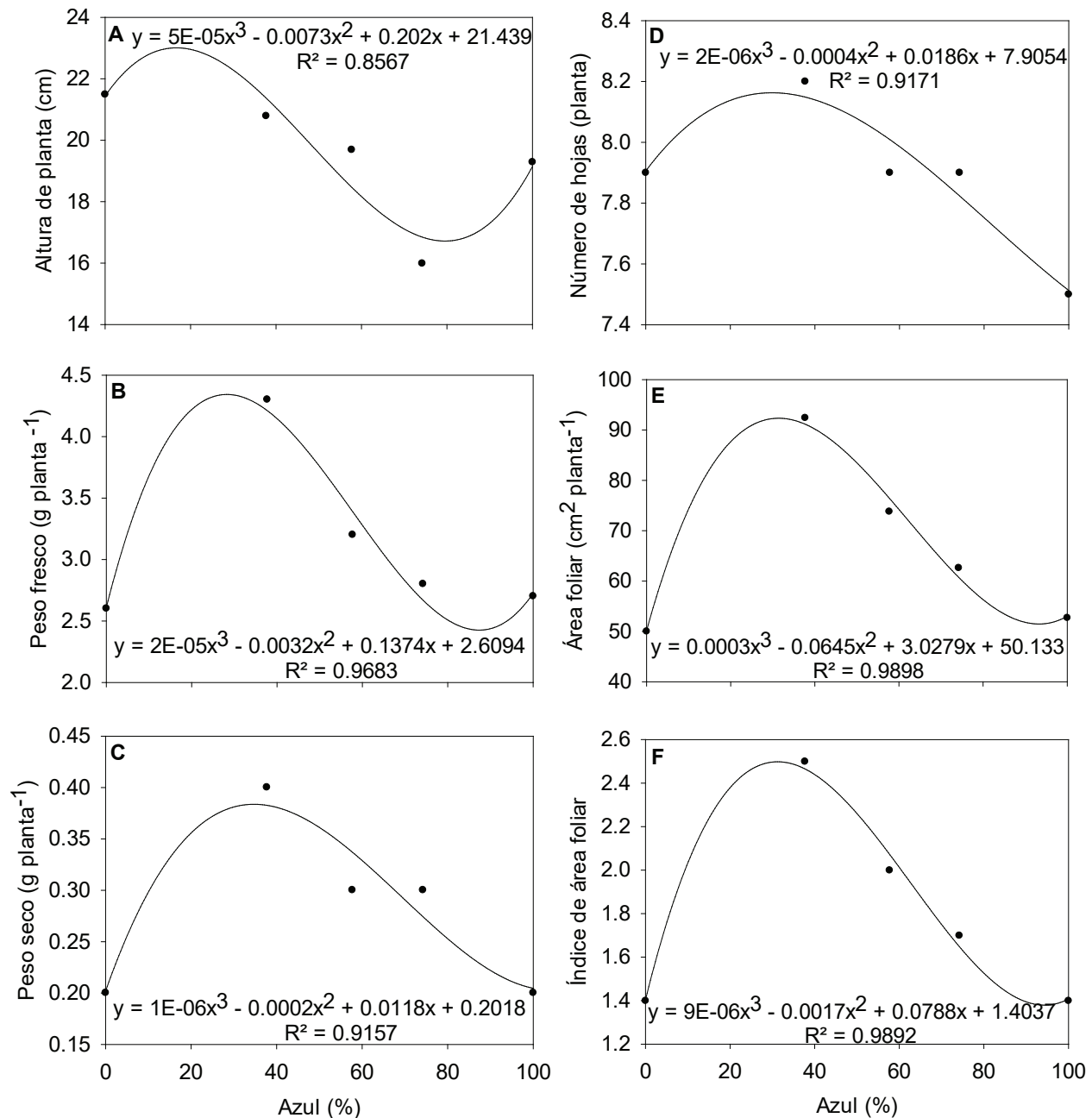
#### Variables de crecimiento

Todos los parámetros de crecimiento evaluados se ajustaron a una regresión polinomial de tercer grado. La altura de planta fue mayor en tratamiento A0:R100, pero al incrementarse la proporción de luz azul se presentó una disminución constante hasta llegar a un valor mínimo con el tratamiento A74.2:R25.8 (Figura 1A). El peso fresco y seco de la parte aérea, área foliar e índice de área foliar mostraron un incremento conforme la proporción de luz azul aumentó a partir del tratamiento A0:R100 hasta llegar a los valores máximos con el tratamiento A37.7:R62.3; posteriormente, existió una disminución constante conforme la proporción de luz azul aumentó hasta llegar al 100 %: con luz azul al 0 % y 100 % se presentó el menor crecimiento (Figuras 1B, C, E y F).

El número de hojas por planta presentó un incremento a partir del tratamiento A0:R100 hasta llegar al tratamiento A37.7:R62.3, posteriormente conforme la proporción de luz azul aumentó, el número de hojas disminuyó (Figura 1D).

Los resultados que registraron Yoneda *et al.* (2017) en plantas de stevia, tuvieron un comportamiento similar con lo obtenido en altura de planta de cilantro de nuestro experimento. El comportamiento de los resultados que se obtuvieron en peso fresco, peso seco y número de hojas de planta de cilantro coincidió con lo reportado por Chang *et al.* (2018) en plántulas de colza, además, los resultados que registraron Hernández *et al.* (2016) en plántulas de tomate, tuvieron un comportamiento similar con lo obtenido en peso seco y número de hojas de planta de cilantro en nuestro experimento.

Hernández y Kubota (2016) reportaron que el comportamiento de la altura, peso fresco, peso seco y área foliar de plántula de pepino, se ajustó a una regresión lineal, en donde existió una reducción de estas variables conforme existió un



**Figura 1.** Efecto de la proporción de luz LED azul y roja en el crecimiento de cilantro 'Gladiator' cultivado bajo condiciones controladas con cinco diferentes tratamientos de luz LED: 0 % azul:100 % roja; 37.7 % azul:62.3 % roja; 57.7 % azul:42.3 % roja; 74.2 % azul:25.8 % roja; 100 % azul:0 % roja. La línea continua representa el ajuste de los resultados a una regresión polinomial de tercer grado.

**Figure 1.** Effect of the blue and red LED light ratio on growth of coriander 'Gladiator' grown under controlled conditions with five different LED light treatments: 0 % blue:100 % red; 37.7 % blue:62.3 % red; 57.7 % blue:42.3 % red; 74.2 % blue:25.8 % red; 100 % blue:0 % red. The solid line represents the fit of the results to a third-degree polynomial regression.

mayor porcentaje de luz azul respecto al rojo en los tratamientos, por otro lado, también encontraron que diferentes proporciones de luz azul y roja no generaron efectos en el número de hojas en plántulas de pepino. Clavijo-Herrera *et al.* (2018) observaron que el comportamiento de los resultados de peso seco y área foliar de plantas de lechuga, se ajustaron a una regresión polinomial de segundo orden, en donde se registró una disminución del peso seco de plántula y un aumento en el área foliar conforme existió un mayor

porcentaje de luz azul respecto al rojo en los tratamientos, donde se llegó, a un mínimo y a un máximo de valores de las variables evaluadas respectivamente, con un 60 % de luz azul respecto al rojo y en donde a partir de ese punto, se volvió constante los resultados de las variables evaluadas, conforme la proporción de luz azul siguió su aumento; por otra parte, también encontraron que los resultados de número de hojas, se ajustaron a una regresión lineal, en donde a mayor proporción de luz azul respecto al rojo, se obtuvo menor



número de hojas. Wollaeger y Runkle (2015) obtuvieron la mayor altura de plántula de tomate con un tratamiento de luz azul y roja A0:R100, sin embargo, el resto de tratamientos que evaluaron con diferentes porcentajes de luz azul (6, 13, 25, 50, 100 %) respecto al rojo, fueron menores y estadísticamente iguales entre ellos, también encontraron que el mayor peso fresco en plántulas de salvia y el área foliar de plántulas de impatiens y salvia, se ubicó en un tratamiento de luz azul y roja A0:R100, y conforme el porcentaje de luz azul respecto al rojo aumentó, el peso fresco y el área foliar disminuyó. Por otra parte, Agarwal *et al.* (2018) obtuvieron la mayor altura de planta de espinaca con un tratamiento de luz azul y roja A50:R50 y reportaron una disminución de altura, a partir de este tratamiento, conforme las proporciones de luz azul respecto al rojo aumentaron y/o disminuyeron en los tratamientos restantes, y se registró que las plantas que tuvieron un tratamiento A0:R100 y A100:R0 presentaron la menor altura. Hong *et al.* (2015) evaluaron diferentes proporciones de luz azul y roja en plántulas de crisantemo y encontraron un comportamiento en donde el mayor peso fresco y seco se ubicó en el tratamiento A0:R100, y conforme el porcentaje de luz azul respecto al rojo aumentó, el peso fresco y seco disminuyó. Por otro lado, Verma *et al.* (2018) evaluaron en plantas de *Digitalis purpurea* diferentes proporciones de luz azul y roja y obtuvieron el mayor número de hojas y área foliar con un tratamiento A20:R80, en donde en el resto de tratamientos evaluados (A0:R100, A50:R50, A80:R20 y A100:R0) tuvieron el menor número de hojas y área foliar. Yoneda *et al.* (2017) encontraron en plantas de stevia, una disminución del área foliar conforme la proporción de luz azul aumentó respecto a la roja. Por otra parte, Hernández *et al.* (2016) reportaron en plántulas de tomate la mayor área foliar con las combinaciones de luz azul y roja: A10:R90, A30:R70, A50:R50 y A75:R25, y de manera contraria la menor área foliar con los tratamientos A0:R100 y A100:R0.

Wollaeger y Runkle (2015) evaluaron tratamientos con diferentes proporciones de luz azul y roja, en los cuales encontraron que no se generaron efectos en la altura de plántulas de petunia, en el peso fresco de plántulas de tomate, en peso seco de plántulas de impatiens y petunia, en el número de hojas en plántulas de impatiens, salvia, tomate y petunia, y en el área foliar de plántulas de tomate. De manera similar, Hosseini *et al.* (2019) no encontraron efectos con diferentes tratamientos de luz azul y roja en el número de hojas en plantas de albahaca verde.

El comportamiento de los resultados obtenidos en este experimento, están basados en que la luz es la base del crecimiento, desarrollo y productividad de una planta, la cual, a través del aparato fotosintético, procesos bioquímicos dependientes de luz y diversos fotoreceptores, activan la expresión de genes de cloroplastos y núcleo, lo que genera la síntesis de compuestos y hormonas que en conjunto controlan el proceso completo de desarrollo de la planta (Berkovich *et al.*, 2017). Por otra parte, se ha reportado que la luz roja tiende a promover en plantas la elongación del tallo, disminuye el número de hojas y aumenta la biomasa

de la parte aérea, sin embargo, se ha observado que la luz azul puede tener la capacidad de aumentar o disminuir la longitud de la parte aérea de las plantas, área foliar y peso seco de la parte aérea, dependiendo de la especie y características del tratamiento de luz (Demotes-Mainard *et al.*, 2016). Adicionalmente, la luz azul y roja también pueden inducir respuestas antagónicas entre estos en ciertos parámetros de crecimiento (Berkovich *et al.*, 2017; Demotes-Mainard *et al.*, 2016; Huché-Thélier *et al.*, 2016).

Los resultados que se mencionaron de las anteriores investigaciones, se observó una diversidad de efectos que ejercen diferentes proporciones de luz azul y roja sobre las variables de crecimiento en diferentes especies de plantas, pero se encontró que muchos de los parámetros que se evaluaron tuvieron un tendencia de incrementar sus resultados conforme se aumentó el porcentaje de luz roja frente a la azul, esto puede deberse en parte, a que la luz roja es considerada como la longitud de onda más eficiente para la fotosíntesis en comparación con la luz azul, ya que la luz roja (600-700 nm) tiene una eficiencia cuántica mayor que la luz azul (400-500 nm) (McCree, 1972).

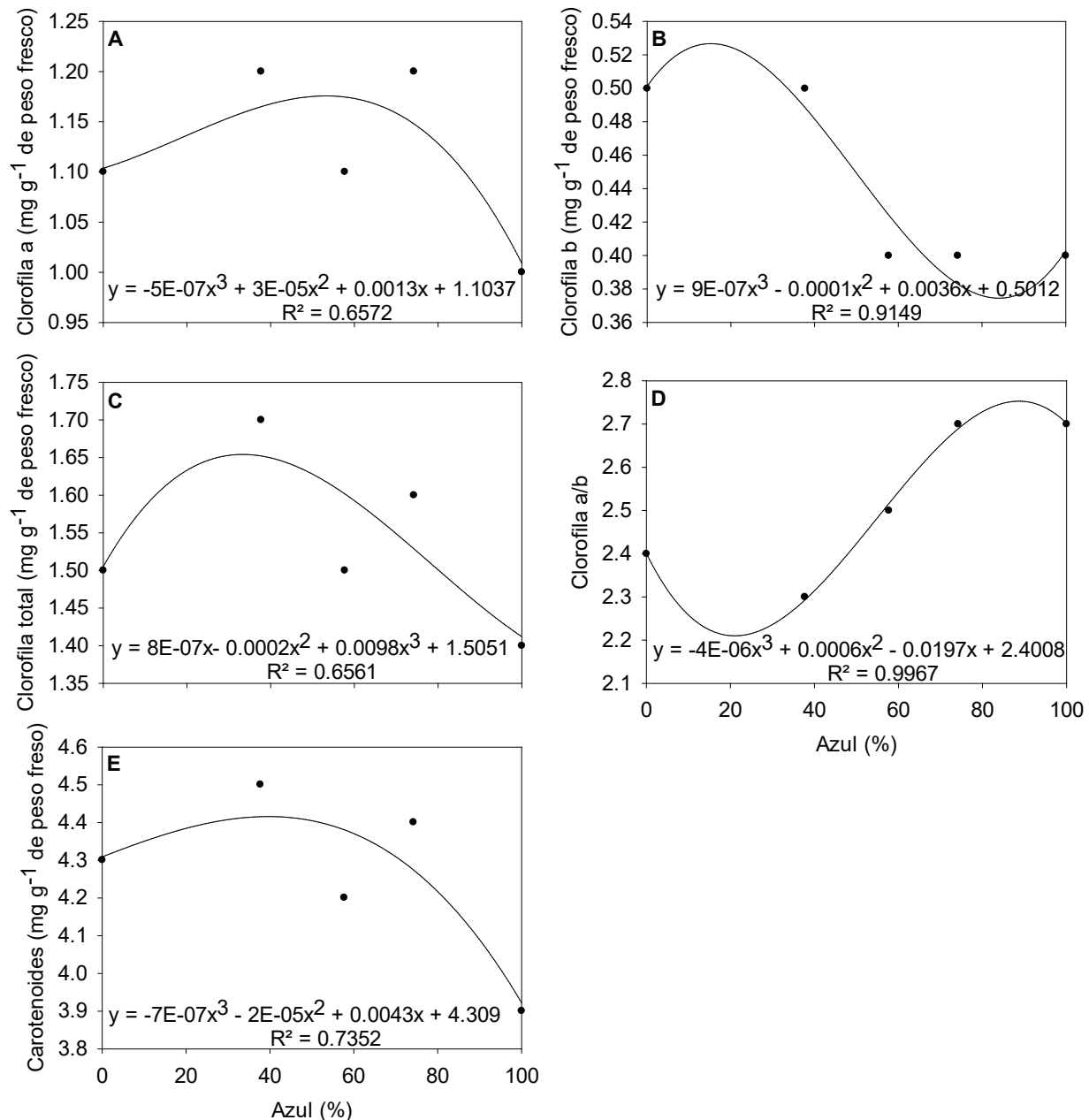
En nuestros resultados, lo anterior no se cumplió tal cual de esta manera, ya que los mayores valores se obtuvieron con un tratamiento de luz A37.7:R62.3, lo que puede deberse a característica inherente de la variedad y especie, que necesita tener un cierto porcentaje de luz azul para poder alcanzar los mejores rendimientos en crecimiento, debido a que para llevarse a cabo de manera más óptima el desarrollo de una planta es necesario tener tanto, por el aparato fotosintético y como por el sistema de fotoreceptores, la presencia de luz azul y roja (Pocock, 2015), ya que son las longitudes donde los pigmentos fotosintéticos tienen su punto máximo de absorción (clorofila a 662 nm, clorofila b 642 nm, carotenoides 450 nm y 480 nm) (Blankenship, 2014) y los fotoreceptores (fitocromo: 350-800 nm, máxima absorción 660 y 730 nm; criptocromo: 350-520 nm, máxima absorción 365 nm, 445 nm; fototropina y proteínas ZEITLUPE: máxima absorción 450 nm) (Huché-Thélier *et al.*, 2016).

Dadas las diferentes proporciones de luz azul y roja a las cuales las plantas fueron sometidas, estas poseen un alto grado de plasticidad en el proceso de aclimatación bajo diferentes condiciones de luz de su sistema de fotoreceptores, aparato fotosintético y procesos bioquímicos (Pocock, 2015).

Los resultados obtenidos en las variables de crecimiento en plantas de cilantro, al compararse con otros autores y con otros cultivos, reafirman que la composición espectral de la luz, así como la intensidad y el fotoperiodo, tienen un fuerte efecto de regulación en la morfogénesis de la planta, estado hormonal, ontogénesis y metabolismo secundario, así como la especie y el cultivar, lo que hace imposible proponer una recomendación universal para usar un parámetro de iluminación específico para cierto cultivo, lo cual coincide con lo señalado por Berkovich *et al.* (2017).

#### Concentración de pigmentos fotosintéticos

Existió un incremento en la de concentración clorofila



**Figura 2.** Efecto de la proporción de luz LED azul y roja en la concentración de pigmentos fotosintéticos en hojas de cilantro 'Gladiator' cultivado bajo condiciones controladas con cinco diferentes tratamientos de luz LED: 0 % azul:100 % roja; 37.7 % azul:62.3 % roja; 57.7 % azul:42.3 % roja; 74.2 % azul:25.8 % roja; 100 % azul:0 % roja. La línea continua representa el ajuste de los resultados a una regresión polinomial de tercer grado.

**Figure 2.** Effect of the blue and red LED light ratio on photosynthetic pigments concentration in coriander leaves 'Gladiator' grown under controlled conditions with five different LED light treatments: 0 % blue:100 % red; 37.7 % blue:62.3 % red; 57.7 % blue:42.3 % red; 74.2 % blue:25.8 % red; 100 % blue:0 % red. The solid line represents the fit of the results to a third-degree polynomial regression.

a, total y carotenoides (Figuras 2A, 2C y 2E) a partir del tratamiento A0:R100 conforme la proporción de luz azul aumentó, hasta llegar a una máxima concentración en el tratamiento A37.7:R62.3; para el caso de la clorofila a, también lo fue con el tratamiento A74.2:R25.8.

La mayor concentración de clorofila b se detectó con el tratamiento A0:R100, así como en el tratamiento A37.7:R62.3 (Figura 2B), mientras que la relación clorofila a/b mostró un comportamiento opuesto (Figura 2D).

Los resultados de concentración de clorofila a, b y total

que registraron Hosseini *et al.* (2019) en plantas de albahaca verde, tuvieron un comportamiento similar en lo obtenido con los resultados de la presente investigación en plantas de cilantro, de manera similar, esto también se cumplió con los resultados de la concentración de clorofila total en plantas de espinaca que obtuvieron Agarwal *et al.* (2018). Hernández y Kubota (2016) reportaron que la concentración de clorofila total en plántula de pepino se ajustó a una regresión lineal, en donde a mayor porcentaje de luz azul respecto al rojo, se obtuvo mayor concentración de clorofila total. Hong *et al.*

(2015) encontraron un comportamiento diferente en plántulas de crisantemo, en el cual los tratamientos de luz azul y roja A67:R33 y A100:R0, presentaron la mayor concentración de clorofila a y b, donde posteriormente existió a partir de estos una disminución conforme la proporción de luz azul respecto al rojo disminuyó en el resto de tratamientos.

Verma *et al.* (2018) observaron en plantas de *Digitalis purpurea* un comportamiento diferente en concentración de clorofila a y carotenoides, en donde la menor concentración de clorofila a se obtuvo por igual en los tratamientos A20:R80, A50:R50 y A80:R20, y a partir de estos tres tratamientos conforme la proporción de luz azul respecto al rojo aumentó y/o disminuyó en el resto de tratamientos que evaluaron, la concentración de clorofila a se incrementó; por otro lado, la mayor concentración de carotenoides se presentó en los tratamientos A80:R0 y A100:R0, y conforme la proporción de luz azul respecto al rojo disminuyó en el resto de tratamientos, la concentración de carotenoides disminuyó. Agarwal *et al.* (2018) encontraron en plantas de espinaca un comportamiento diferente en la concentración de carotenoides, ya que la mayor concentración se observó en un tratamiento con luz azul y roja A0:R100, en el cual, conforme la proporción de luz azul respecto al rojo aumentó en el resto de tratamientos, se generó una disminución de la concentración de carotenoides. Shengxin *et al.* (2016) obtuvieron un comportamiento diferente en la concentración de clorofila total, clorofila a/b y carotenoides en plántulas de colza, ya que la mayor concentración de clorofila total y carotenoides se ubicó en un tratamiento de luz azul y roja A75:R25, y a partir de este tratamiento se presentó una disminución en la concentración de clorofila total conforme la proporción de luz azul respecto a la roja aumentó y/o disminuyó en el resto de tratamientos, mientras que la relación de clorofila a/b de los tratamientos con luz azul y roja A25:R75, A50:R50, A75:R25 y A100:R0 presentaron la mayor relación de clorofila a/b, mientras que A0:R100 la menor relación. Hogewoning *et al.* (2010) encontraron en plántulas de pepino, que diferentes proporciones de luz azul y roja no generaron ningún efecto en la concentración de clorofila total en plántulas.

Los anteriores resultados se pueden explicar debido a que las plantas tienden a adaptar el contenido de clorofila al espectro de luz incidente; además, cuando está presente la luz azul con otras longitudes de onda, la clorofila total tiende a aumentar conforme la proporción de luz azul aumenta (Huché-Thélier *et al.*, 2016). Adicionalmente, la relación clorofila a/b se incrementa independientemente de la especie, tanto con tratamientos monocromáticos azules, como con tratamientos donde existió un aumento de la proporción de luz azul (Huché-Thélier *et al.*, 2016). Los carotenoides son pigmentos accesorios para absorber y transferir energía de la luz incidente (Blankenship, 2014), y tienden a aumentar en presencia de luz roja y disminuir con luz azul (Kubota, 2016), debido a que a través de estas dos longitudes de onda se induce la expresión de genes involucrados en la ruta de síntesis de carotenoides (Gupta y Pradhan, 2017).

### Concentración nutrimental en la parte aérea

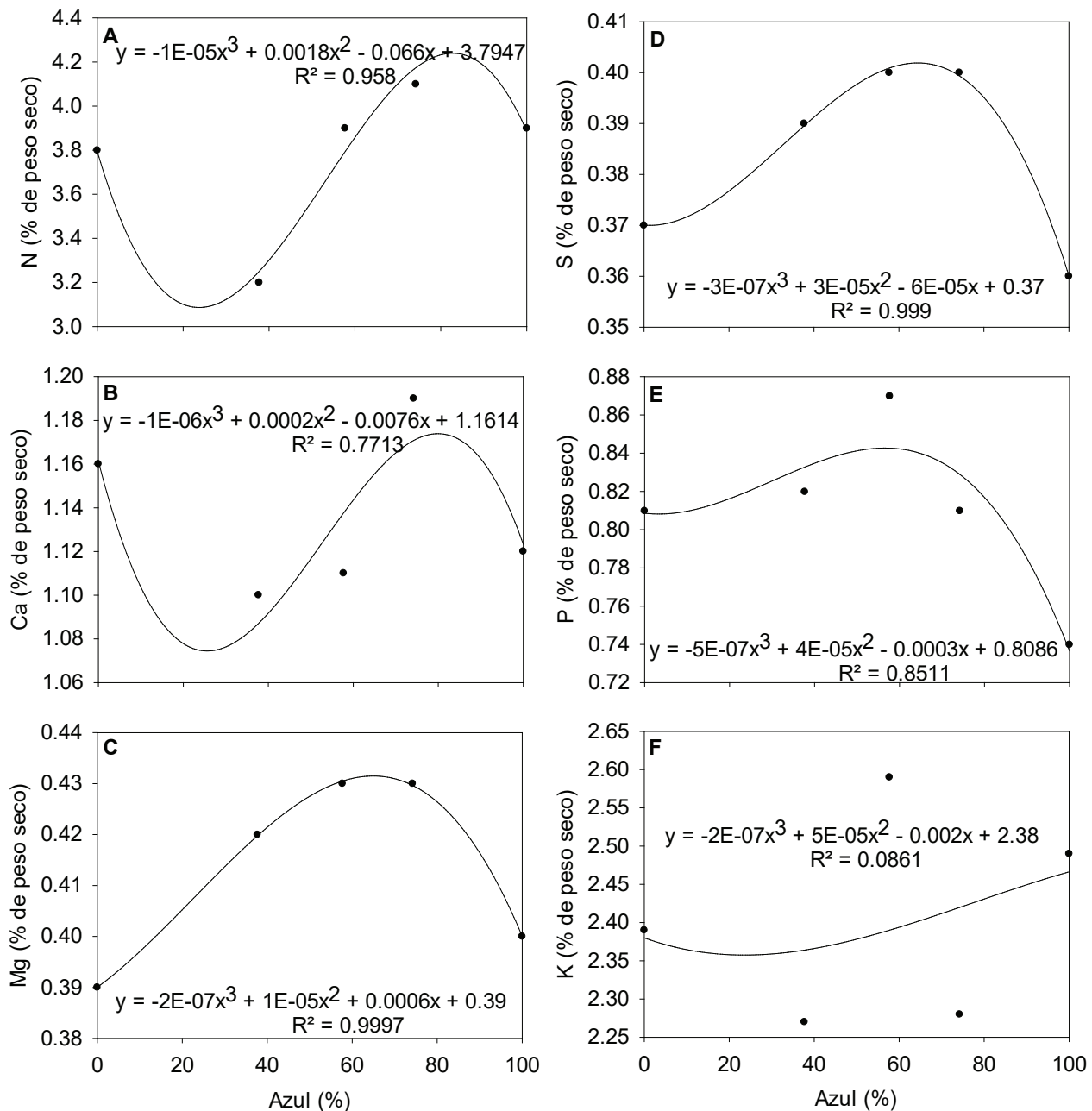
La concentración nutrimental se ajustó a una regresión polinomial de tercer grado para macronutrientos y micronutrientos. En el caso del N y Ca (Figuras 3A y 3B), estos disminuyeron a partir del tratamiento A0:R100 conforme la proporción de luz azul aumentó hasta llegar a alcanzar la concentración mínima con el tratamiento A37.7:R62.3, posteriormente existió un aumento en la concentración conforme la proporción de luz azul aumentó y se llegó a una concentración máxima en ambos elementos con el tratamiento A74.2:R25.8.

Por otro lado, la concentración de Mg y S (Figuras 3C y 3D) aumentaron a partir del tratamiento A0:R100 conforme la proporción de luz azul aumentó, hasta llegar en los tratamientos A57.7:R42.3 y A74.2:R25.8 en los que se registró la mayor concentración de ambos elementos; posteriormente disminuyó la concentración a partir del tratamiento A74.2:R25.8 hasta llegar al tratamiento A100:R0.

La concentración de P (Figura 3E) aumentó a partir del tratamiento A0:R100 conforme la proporción de luz azul incrementó, hasta llegar al tratamiento A57.7:R42.3, en el cual se registró su máxima concentración, posteriormente existió una disminución de la concentración conforme la proporción de luz azul aumento hasta llegar al tratamiento A100:R0 donde se encontró la mínima concentración de P.

La concentración de K fue independiente de los tratamientos ya que no se ajustó los resultados a ningún otro modelo de regresión (Figura 3F). Verma *et al.* (2018) investigaron en *Digitalis purpurea* y encontraron que con una proporción de luz azul y roja de A80:R20, se presentó una mayor acumulación tanto de macronutrientos (P, S, Ca, Mg) como de micronutrientos (Fe, Mn, Zn, B, Cu). Lo anterior, coincidió con los resultados de S, Ca, Mg de la presente investigación.

La máxima concentración de Fe (Figura 4A) se registró en los tratamientos A0:R100 y A37.7:R62.3, a partir de los cuales existió una disminución conforme la proporción de luz aumentó hasta llegar al tratamiento A100:R0, en el que se registró la menor concentración. La máxima concentración de Zn (Figura 4B) se registró en el tratamiento A0:R100, donde posteriormente existió una disminución de concentración conforme la proporción de luz aumentó hasta llegar al tratamiento A100:R0 donde se obtuvo la mínima concentración de Zn. La concentración de Cu en la parte aérea de cilantro (Figura 4C), tuvo un incremento a partir del tratamiento A0:R100 conforme la proporción de luz azul aumentó hasta llegar a un máximo de concentración en el tratamiento A57.7:R42.3, posteriormente existió una disminución de la concentración conforme la proporción de luz azul incrementó. El Mn (Figura 4D) registro su máxima concentración en el tratamiento A0:R100, posteriormente se registró una disminución de concentración conforme la proporción de luz azul aumentó. Pennisi *et al.* (2019) usaron los tratamientos de luz roja y azul LED A19:R75, A23:R70, A30:R62, A44:R46, A58:R30 en albahaca y hallaron una tendencia clara donde el tratamiento A23:R70 fue el que permitió la mayor concentración de N, P, K, Ca, Mg y Fe; los resultados mencionados



**Figura 3.** Efecto de la proporción de luz LED azul y roja en la concentración de macronutrientos en cilantro 'Gladiator' cultivado bajo condiciones controladas con cinco diferentes tratamientos de luz LED: 0 % azul:100 % roja; 37.7 % azul:62.3 % roja; 57.7 % azul:42.3 % roja; 74.2 % azul:25.8 % roja; 100 % azul:0 % roja. La línea continua representa el ajuste de los resultados a una regresión polinomial de tercer grado.

**Figure 3.** Effect of the blue and red LED light ratio on macronutrient concentration in coriander 'Gladiator' grown under controlled conditions with five different LED light treatments: 0 % blue:100 % red; 37.7 % blue:62.3 % red; 57.7 % blue:42.3 % red; 74.2 % blue:25.8 % red; 100 % blue:0 % red. The solid line represents the fit of the results to a third-degree polynomial regression.

anteriormente que encontraron Pennisi *et al.* (2019) se aproximaron un poco respecto a la concentración máxima de Fe que obtuvimos en nuestro experimento que se registró con el tratamiento A0:R100. Sakuraba y Yanagisawa (2018) mencionan que en *Arabidopsis* los mecanismos asociados a la absorción y asimilación del N en los tejidos es mediada por los fotorreceptores, fitocromos (A y B) asociados a luz roja y los criptocromos asociados a luz azul que se encuentran ubicados en la hoja, los cuales a su vez activan al promotor

de transcripción HY5 (LONG HYPOCOTYL 5). Posteriormente este promotor se une y activa los genes codificadores de proteínas transportadoras de nitrato en raíz (familia NRT1 y NRT2) y de amonio (familia AMT1 y AMT2) y para la fase de asimilación del nitrato, el promotor HY5 cumple la función de activación y regulación de la expresión de los genes nitrato reductasa 2 (NIA2) y nitrato reductasa 1 (NIR1) que codifican para las enzimas nitrato reductasa y nitrato reductasa respectivamente (Gangappa y Botto, 2016)



La asimilación del amonio en aminoácidos se lleva a cabo por las enzimas glutamina sintetasa (GS) y glutamato sintetasa (GOGAT) (Hawkesford *et al.*, 2012). Miao *et al.* (2019) encontraron que la luz azul promovió la actividad de las enzimas GS y GOGAT, además se incrementó la absorción de nitrato y por consiguiente la concentración de N en planta. Se ha comprobado que la asimilación de nitrato y la biosíntesis de aminoácidos se incrementa con luz azul (Berkovich *et al.*, 2017). Por otra parte, García-Caparrós *et al.* (2019) mencionan que la actividad de la enzima NR se incrementó en presencia de luz azul y también favoreció la acumulación de N en planta. Lo antes mencionado, coincidió con los resultados en concentración de N, ya que a mayor proporción de luz azul se incrementó la concentración en planta (Figura 3).

La luz roja se ha asociado con la absorción y con el aumento en la concentración de P en *Arabidopsis*, debido al mecanismo asociado con el fotorreceptor fitocromo B en hoja, el cual media el proceso regulatorio de absorción y uso de P a través de dos vías de señalización y regulación, siendo la primera la vía-fitocromo B-HY5 y la segunda la vía-fitocromo B-PIFs (PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR), en donde en conjunto inducen en raíz la expresión del gen transportador de fosfato PHT1;1 (INORGANIC PHOSPHATE TRANSPORTER) y el gen PHL1 (HOMEODOMAIN-LIKE SUPERFAMILY PROTEIN) el cual también tiene la función de inducir la expresión del gen PHT1;1 (Sakuraba *et al.*, 2018).

En los resultados que se obtuvieron de P en planta de cilantro (Figura 3) coincidió con lo mencionado por Sakuraba *et al.* (2018), ya que las plantas que recibieron solo luz azul presentaron una disminución de este nutrimento en comparación con las plantas que recibieron luz roja.

En plántulas de *Arabidopsis* la luz azul promueve la acumulación de K debido a una mayor actividad en el transporte de membrana asociados a los canales iónicos de K ubicados en las células guarda de los estomas (García-Caparrós *et al.*, 2019). El comportamiento del K en el experimento no siguió una tendencia clara, lo que puede deberse a un comportamiento propio de la especie, ya que fue el único macronutriente que no se ajustó a la regresión polinomial de tercer grado. El mecanismo de absorción y asimilación de S (sulfato), se induce primero a través de una señal generada a nivel de fotorreceptores al recibir luz, la cual activa al promotor de transcripción HY5, el cual se une a determinados promotores de genes con lo cual se induce la síntesis y se aumenta la actividad del gen que codifica para la proteína transportadora de sulfato SULTR1;2 (SULFATE TRANSPORTER 1;2) y de los genes APR1 (ADENOSINE 5' PHOSPHOSULPHATE REDUCTASE 1) y APR2 (ADENOSINE 5' PHOSPHOSULPHATE REDUCTASE 2) asociados con los mecanismos de asimilación (Gangappa y Botto, 2016; Sakuraba y Yanagisawa, 2018).

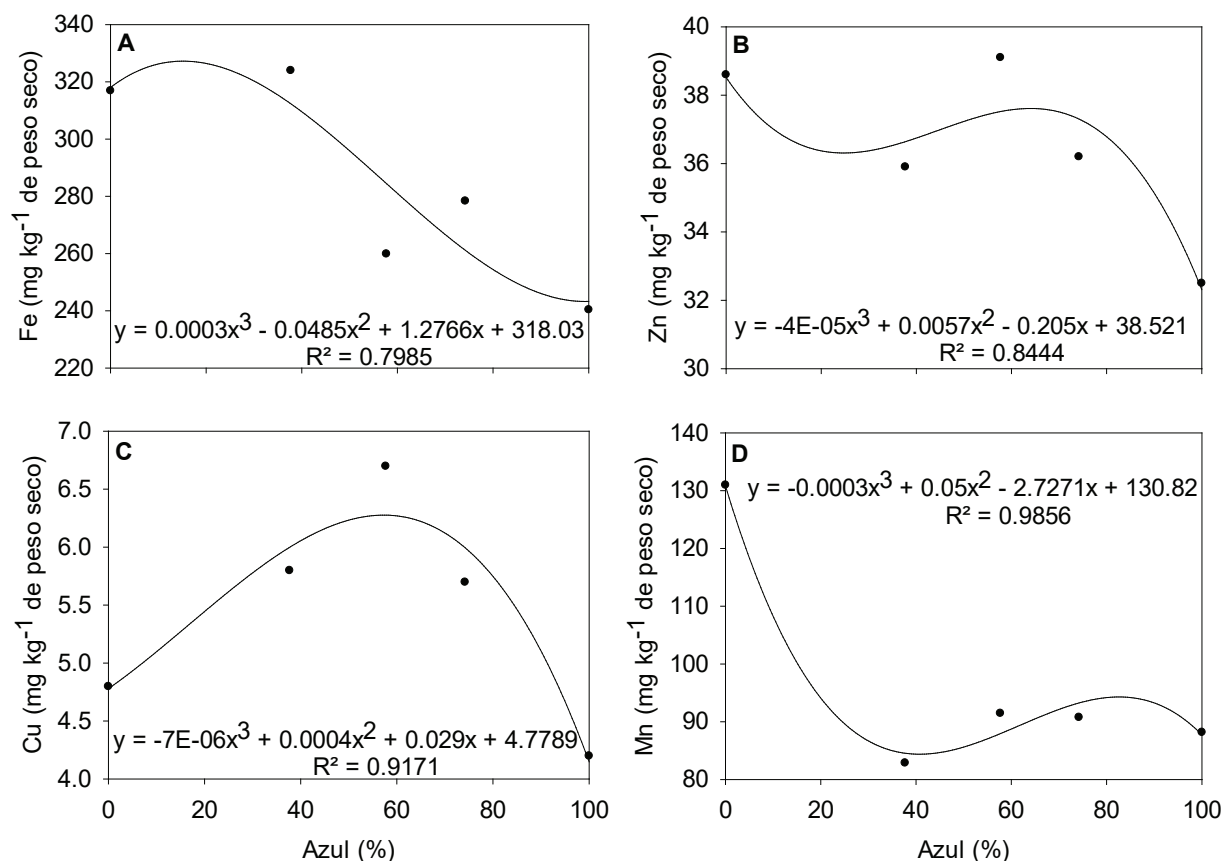
El S forma parte de proteínas a través de los aminoácidos metionina y cisteína que poseen S en su estructura, forma parte también de la molécula glutatión, que es un antioxidante que protege a las células de especies reactivas de oxígeno, así como de otras moléculas involucradas en la defensa como glucosinolatos y tioredoxinas (Hawkesford *et al.*, 2012).

En plantas de cilantro la mayor absorción de sulfato y posible asimilación en proteínas o moléculas asociadas al S fue mayor en plantas de cilantro que recibieron al mismo tiempo luz azul y roja (Figura 3). La luz azul induce en plantas de *Arabidopsis* la actividad de los transportadores de Ca (Kopsell *et al.*, 2014) y también causa variaciones en el transporte iónico de membrana, asociado a Ca, en las células guarda de estomas (Kopsell y Sams, 2013), con lo cual puede inducir mayor acumulación en tejido.

El comportamiento de la concentración de Ca en plantas de cilantro coincidió con lo mencionado con los anteriores autores, sin embargo, en esta especie es necesario de un 25.8 % de luz roja para obtener una máxima concentración en tejido (Figura 3). La concentración de Cu en cloroplastos, que es el orgánulo donde existe la mayor concentración, se modula mediante el mecanismo asociado con el promotor de transcripción HY5, el cual previamente se activa a través de una cascada de señalización intercelular generada por los fotorreceptores que son activados por el tipo de longitud de onda asociado a éstos, posteriormente el promotor HY5 cumple la función de interactuar físicamente con el factor de transcripción SPL7 (SQUAMOSA PROMOTER-BINDING PROTEIN-LIKE 7), los en conjunto activan el gen MIR408 (microRNA408) que es requerido para regular la expresión de los genes PETE1 (PLASTOCYANIN 1) y PETE2 (PLASTOCYANIN 2) los cuales son los encargados de la síntesis de proteína plastocianina en cloroplasto y que contiene Cu en su estructura (Gangappa y Botto, 2016; Sakuraba y Yanagisawa, 2018).

En plantas de cilantro existió una posible mayor concentración Cu relacionado a la proteína plastocianina, cuando los tratamientos tuvieron una aproximación de una proporción de luz azul y roja  $\approx$  1:1, la cual se registró en las plantas que recibieron 57.7 % de luz azul (Figura 4). Miao *et al.* (2019) mencionan que existe una mayor concentración de Zn y Mn en la presencia de luz roja. Este comportamiento se observó en Zn, ya que las plantas con tratamientos que tuvieron luz roja fueron mayores a las plantas que solo recibieron luz azul. De manera similar, el Mn presentó una evidente mayor concentración en planta bajo la presencia de solo luz roja respecto al resto de tratamientos (Figura 4).

De manera general la concentración de nutrimentos en plantas puede verse afectada a través de procesos fisiológicos como apertura estomática, transpiración, biomasa acumulada, y tasa de crecimiento (Metallo *et al.*, 2018). Se ha asociado que la luz roja promueve la acumulación de micronutrimentos en tejido Miao *et al.* (2019). Por otro lado, la luz azul se ha corroborado que puede aumentar de manera general la concentración de macronutrimentos y micronutrimentos dependiendo de la especie y la etapa de crecimiento, a través de una mayor apertura estomática, un incremento en la permeabilidad de los canales iónicos asociados a la absorción de nutrimentos y junto con un aumento en la tasa de transpiración (Brazaitytė *et al.*, 2018; Craver *et al.*, 2018; Gerovac *et al.*, 2016). Se requiere de mayor investigación para conocer más sobre los mecanismos y vías de señalización involucrados en la absorción y asimilación de nutrimentos bajo el efecto de diferentes tipos de longitud de onda (Amoozgar *et al.*, 2017; Miao *et al.*, 2019).



**Figura 4.** Efecto de la proporción de luz LED azul y roja en la concentración de micronutrientes en cilantro 'Gladiator' cultivado bajo condiciones controladas con cinco diferentes tratamientos de luz LED: 0 % azul:100 % roja; 37.7 % azul:62.3 % roja; 57.7 % azul:42.3 % roja; 74.2 % azul:25.8 % roja; 100 % azul:0 % roja. La línea continua representa el ajuste de los resultados a una regresión polinomial de tercer grado.

**Figure 4.** Effect of the blue and red LED light ratio on micronutrient concentration in coriander 'Gladiator' grown under controlled conditions with five different LED light treatments: 0 % blue:100 % red; 37.7 % blue:62.3 % red; 57.7 % blue:42.3 % red; 74.2 % blue:25.8 % red; 100 % blue:0 % red. The solid line represents the fit of the results to a third-degree polynomial regression.

## CONCLUSIONES

La relación de luz azul y roja A37.7:R62.3 promovió el crecimiento y concentración de pigmentos fotosintéticos, mientras que una proporción de luz azul y roja A57.7:R42.3 promovió la concentración nutrimental en la parte aérea de cilantro. Lo anterior permite deducir que, para una posible producción comercial de cilantro, en condiciones de ambiente controlado, la mejor relación de luz azul y roja es A37.7:R62.3 ya que se promueve el crecimiento y por lo tanto el rendimiento comercial.

## REFERENCIAS

- Amoozgar, A., Mohammadi, A. y Sabzalian, M.R. 2017. Impact of light-emitting diode irradiation on the photosynthesis, phytochemical composition and mineral element content of lettuce cv. Grizzly. *Photosynthetica*. 55: 85-95. <https://doi.org/10.1007/s11099-016-0216-8>.
- Alcántar, G. y Sandoval, M. 1999. Manual de análisis químico de tejido vegetal. Publicación especial 10. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, A. C. Estado de México, México.
- Alvarez-Carvajal, F., Gonzalez-Soto, T., Armenta-Calderón, A.D., Méndez-Ibarra, R., Esquer-Miranda, E., Juárez, J. y Encinas-Basurto, D. 2020. Silver nanoparticles coated with chitosan against *Fusarium oxysporum* causing the tomato wilt. *Biotecnia*. 22(3): 73-80. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v22i3.952>.
- Agarwal, A., Gupta, S.D., Barman, M. y Mitra, A. 2018. Photosynthetic apparatus plays a central role in photosensitive physiological acclimations affecting spinach (*Spinacia oleracea* L.) growth in response to blue and red photon flux ratios. *Environmental and Experimental Botany*. 156: 170-182. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.09.009>.
- AOAC. 1980. Official methods of analysis. 12th ed. Association of Official Analytical Chemistry. Washington, D.C.
- Clarenc-Aarland, R., Castellanos-Hernández, O.A., Rodríguez-Sahagún, A. y Acevedo-Hernández, G.J. 2020. Efecto del estrés salino sobre la morfología y fitoquímica de orégano mexicano (*Lippia graveolens* Kunth) cultivado *in vitro*. *Biotecnia*. 22(3): 131-137. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v22i3.1223>.
- Craver, J.K., Boldt, J.K. y Lopez, R.G. 2018. Radiation intensity and quality from sole-source light-emitting diodes affect seedling quality and subsequent flowering of long-day bedding plant species. *HortScience*, 53(10): 1407-1415. <https://dx.doi.org/10.21273/HORTSCI13228-18>.

- Berkovich, Y.A., Konovalova, I.O., Smolyanina, S.O., Erokhin, A.N., Avercheva, O.V., Bassarskaya, E.M., Kochetova, G.V., Zhigalova, T.V., Yakovleva, O.S. y Tarakanov, I.G. 2017. LED crop illumination inside space greenhouses. REACH - Reviews in Human Space Exploration. 6: 11-24. <http://dx.doi.org/10.1016/j.reach.2017.06.001>.
- Blankenship, R.E. 2014. Molecular mechanisms of photosynthesis. 2nd ed. Wiley Blackwell. New Delhi, India.
- Brazaitytė, A., Vaštakaitė, V., Viršilė, A., Jankauskienė, J., Samuolienė, G., Sakalauskienė, S., Novičkovas, A., Miliauskienė, J. y Duchovskis, P. 2018. Changes in mineral element content of microgreens cultivated under different lighting conditions in a greenhouse. Acta Horticulturae. 1227. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2018.1227.64>.
- Chang, S., Pu, C., Guan, R., Pu, M. y Xu, Z. 2018. Transcriptional and translational responses of rapeseed leaves to red and blue lights at the rosette stage. Journal of Zhejiang University-SCIENCE B. 19: 581-595. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1700408>.
- Clavijo-Herrera, J., van Santen, E. y Gómez, C. 2018. Growth, Water-Use Efficiency, Stomatal Conductance, and Nitrogen Uptake of Two Lettuce Cultivars Grown under Different Percentages of Blue and Red Light. Horticulturae. 4(3): 16. <https://doi.org/10.3390/horticulturae4030016>.
- Demotes-Mainard, S., Pérona, T., Corotb, A., Bertheloot, J., Gourrierec, J.L., Pelleschi-Travierb, S., Crespel, L., Morel, P., Huché-Thélier, L., Boumaza, R., Vian, A., Guérin, V., Leduc, N. y Sakr, S. 2016. Plant responses to red and far-red lights, applications in horticulture. Environmental and Experimental Botany. 121: 4-21. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.05.010>.
- Gangappa, S.N. y Botto, J.F. 2016. The multifaceted roles of *hy5* in plant growth and development. Molecular Plant. 9: 1353-1365. <https://dx.doi.org/10.1016/j.molp.2016.07.002>
- García-Caparrós, P., Almansa, E.M., Chica, R.M. y Lao, M.T. 2019. Effects of artificial light treatments on growth, mineral composition, physiology, and pigment concentration in *Dieffenbachia maculate* "Compacta" plants. Sustainability. 11: 2867. <https://dx.doi.org/10.3390/su11102867>.
- Gerovac, J.R., Craver, J.K., Boldt, J.K. y Lopez, R.G. 2016. Light intensity and quality from sole-source light-emitting diodes impact growth, morphology, and nutrient content of Brassica microgreens. HortScience. 51(5): 497-503. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.51.5.497>.
- Gupta, S. D. y Pradhan, S. 2017. Regulation of gene expression by LED lighting. En: Light Emitting Diodes for Agriculture. S. D. Gupta (ed.), pp 237-258. Springer Nature Singapore, Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-5807-3\\_10](https://doi.org/10.1007/978-981-10-5807-3_10).
- Hawkesford, M., Horst, W., Kichey, T., Lambers, H., Schjoerring, J., Moller, I. S. y White, P. 2012. Functions of macronutrients. En: Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants. P. Marschner (ed.), pp 135-189. Academic Press, USA. <https://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384905-2.00006-6>.
- Hernández, R., Eguchib, T., Devecic, M. y Kubota, C. 2016. Tomato seedling physiological responses under different percentages of blue and red photon flux ratios using LEDs and cool white fluorescent lamps. Scientia Horticulturae. 213: 270-280. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2016.11.005>.
- Hernández, R. y Kubota, C. 2016. Physiological responses of cucumber seedlings under different blue and red photon flux ratios using LEDs. Environmental and Experimental Botany. 121: 66-74. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.04.001>.
- Hoagland, D.R. y Arnon, D.I. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. Circular 347. California Agricultural Experiment Station. California, USA.
- Hogewoning, S.W., Trouwborst, G., Maljaars, H., Poorter, H., van leperen, W. y Harbinson, J. 2010. Blue light dose-responses of leaf photosynthesis, morphology, and chemical composition of *Cucumis sativus* grown under different combinations of red and blue light. Journal of Experimental Botany. 61(11): 3107-3117. <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/erq132>.
- Hong, Y., Huang, H. y Dai, S. 2015. An in vivo study of the best light emitting diode (LED) systems for cut chrysanthemums. Open Life Sciences. 10: 310-321. <https://doi.org/10.1515/biol-2015-0031>.
- Hosseini, A., Mehrjerdi, M.Z., Aliniaiefard, S. y Seif, M. 2019. Photosynthetic and growth responses of green and purple basil plants under different spectral compositions. Physiology and Molecular Biology of Plants. 25: 741-752. <https://doi.org/10.1007/s12298-019-00647-7>.
- Huché-Thélier, L., Crespel, L., Gourrierec, J.L., Morel, P., Sakr, S. y Leduc, N. 2016. Light signaling and plant responses to blue and UV radiations—Perspectives for applications in horticulture. Environmental and Experimental Botany. 121: 22-38. <https://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.06.009>.
- Katagiri, F., Canelon-Suarez, D., Griffin, K., Petersen, J., Meyer, R.K. y Siegle, M. 2015. Design and construction of an inexpensive homemade plant growth chamber. PLoS ONE. 10(5): e0126826. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126826>.
- Kopsell, D. A. y Sams, C. E. 2013. Increases in shoot tissue pigments, glucosinolates, and mineral elements in sprouting broccoli after exposure to short-duration blue light from light emitting diodes. Journal of the American Society for Horticultural Science. 138(1): 31-37. <https://doi.org/10.21273/JASHS.138.1.31>.
- Kopsell, D. A., Sams, C. E., Barickman, T. C. y Morrow, R. C. 2014. Sprouting broccoli accumulate higher concentrations of nutritionally important metabolites under narrow-band light-emitting diode lighting. Journal of the American Society for Horticultural Science. 139(4): 469-477. <https://doi.org/10.21273/JASHS.139.4.469>.
- Kozai, T. y Niu, G. 2016. Role of the plant factory with artificial lighting (PFAL) in urban areas. En: Plant factory: An indoor vertical farming system for efficient quality food production. T. Kozai, G. Niu y M. Takagaki (ed.), pp 115-128. Academic Press, USA. <https://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-801775-3.00002-0>.
- Kubota, C. 2016. Growth, development, transpiration and translocation as affected by abiotic environmental factors. En: Plant factory: An indoor vertical farming system for efficient quality food production. T. Kozai, G. Niu y M. Takagaki (ed.), pp 151-164. Academic Press, USA. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-801775-3.00010-X>.
- Laribi, B., Kouki, K., M'Hamdi, M. y Bettaieba, T. 2015. Coriander (*Coriandrum sativum* L.) and its bioactive constituents. Fitoterapia. 103: 9-26. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2015.03.012>.
- Mahendra, P. y Bisht, S. 2011. *Coriandrum sativum*: A daily use spice with great medicinal effect. Pharmacognosy Journal. 3(21): 84-88. <http://dx.doi.org/10.5530/pj.2011.21.16>.

- Márquez-Reyes, J.M., Valdés-González, A., García-Gómez, C., Rodríguez-Fuentes, H., Gamboa- Delgado, J. y Luna-Olvera, H. 2020. Evaluación de los efectos sinérgicos de cromo y plomo durante el proceso de fitorremediación con berro (*Nasturtium officinale*) en un humedal artificial. *Biotecnia*. 22(2): 171-178. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v22i2.1259>.
- McCree, K.J. 1972. The action spectrum, absorptance and quantum yield of photosynthesis in crop plants. *Agricultural Meteorology*. 9: 191-216. [https://doi.org/10.1016/0002-1571\(71\)90022-7](https://doi.org/10.1016/0002-1571(71)90022-7).
- Metallo, R. M., Kopsell, D. A., Sams, C. E. y Bumgarner, N. R. 2018. Influence of blue/red vs. white LED light treatments on biomass, shoot morphology, and quality parameters of hydroponically grown kale. *Scientia Horticulturae*. 235: 189-197. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.02.061>
- Miao, Y., Chen, Q., Qu, M., Gao, L. y Hou, L. 2019. Blue light alleviates 'red light syndrome' by regulating chloroplast ultrastructure, photosynthetic traits and nutrient accumulation in cucumber. *Scientia Horticulturae*. 257: 108680. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108680>
- Naznin, M.T., Lefsrud, M., Gravel, V., & Hao, X. (2016). Different ratios of red and blue LED light effects on coriander productivity and antioxidant properties. *Acta Horticulturae*. 1134: 223-230. <https://dx.doi.org/10.17660/ActaHortic.2016.1134.30>
- Nguyen, D. T. P., Lu, N., Kagawa N. y Takagaki, M. 2019. Optimization of photosynthetic photon flux density and root-zone temperature for enhancing secondary metabolite accumulation and production of coriander in plant factory. *Agronomy*. 9(5): 224. <https://doi.org/10.3390/agronomy9050224>.
- Pennisi, G., Blasioli, S., Cellini, A., Maia, L., Crepaldi, A., Braschi, I., Spinelli, F., Nicola, S., Fernandez, J.A., Stanghellini, C., Marcellis, L.F.M., Orsini, F. y Gianquinto, G. 2019. Unraveling the role of red:blue LED lights on resource use efficiency and nutritional properties of indoor grown sweet basil. *Frontiers in Plant Science*. 10: 305. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00305>
- Pocock, T. 2015. Light-emitting diodes and the modulation of specialty crops: light sensing and signaling networks in plants. *HortScience*. 50(9): 1281-1284. <https://dx.doi.org/10.21273/HORTSCI.50.9.1281>.
- Prachayasittikul, V., Prachayasittikul, S., Ruchirawat, S. y Prachayasittikul, V. 2018. Coriander (*Coriandrum sativum*): A promising functional food toward the well-being. *Food Research International*. 105: 305-323. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.11.019>.
- Sakuraba, Y., Kanno, S., Mabuchi, A., Monda, K., Iba, K. y Yanagisawa, S. 2018. A phytochrome-B-mediated regulatory mechanism of phosphorus acquisition. *Nature plants*. 4: 1089-1101. <https://dx.doi.org/10.1038/s41477-018-0294-7>.
- Sakuraba, Y. y Yanagisawa, S. 2018. Light signalling-induced regulation of nutrient acquisition and utilisation in plants. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 83: 123-132. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.12.014>.
- SAS Institute (2002) SAS System for Windows Computer Program. Software Version 9.0. Cary, North Carolina, USA.
- Shengxin, C., Chunxia, L., Xuyang, Y., Song, C., Xuelei, J., Xiaoying, L., Zhigang, X. y Rongzhan, G. 2016. Morphological, photosynthetic, and physiological responses of rapeseed leaf to different combinations of red and blue lights at the rosette stage. *Frontiers in Plant Science*. 7: 1144. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01144>.
- Verma, S.K., Gantait, S., Jeong, B.R. y Hwang, S.J. 2018. Enhanced growth and cardenolides production in *Digitalis purpurea* under the influence of different LED exposures in the plant factory. *Nature Scientific Reports*. 8: 18009. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36113-9>.
- Wei, J-N., Liu, Z-H., Zhao, Y-P., Zhao, L-L., Xue, T-K. y Lan, Q-K. 2019. Phytochemical and bioactive profile of *Coriandrum sativum* L. *Food Chemistry*. 286: 260-267. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.171>.
- Yoneda, Y., Nakashima, H., Miyasaka, J., Ohdoi, K. y Shimizu, H. 2017. Impact of blue, red, and far-red light treatments on gene expression and steviol glycoside accumulation in *Stevia rebaudiana*. *Phytochemistry*. 137: 57-65. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.02.002>.
- Viršilė, A., Olle M. y Duchovskis, P. 2017. LED Lighting in Horticulture. En: *Light Emitting Diodes for Agriculture*. S.D. Gupta (ed.), pp 113-147. Springer Nature Singapore, Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-5807-3\\_7](https://doi.org/10.1007/978-981-10-5807-3_7).
- Wollaeger, H.M. y Runkle, E.S. 2015. Growth and acclimation of impatiens, salvia, petunia, and tomato seedlings to blue and red light. *HortScience*. 50(4): 522-529. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.50.4.522>.





## Efecto de la poda en la producción de biomasa y proteína en *Moringa oleifera* Lam. en la zona centro de Veracruz

Pruning effect on biomass and protein production in *Moringa oleifera* Lam. in the central area of Veracruz

Rafael Ruiz-Hernández<sup>1</sup>, Arturo Pérez-Vázquez<sup>1\*</sup>, Cesareo Landeros-Sánchez<sup>1</sup>, Ofelia Andrea Valdes Rodríguez<sup>2</sup>, Katia Angélica Figueroa-Rodríguez<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Colegio de Postgraduados, Campus Veracruz. Carretera federal Xalapa-Veracruz km 88.5, CP 91700 México.

<sup>2</sup> El Colegio de Veracruz. Carrillo Puerto No. 26, zona centro. CP 91000. Xalapa, Veracruz, México.

<sup>3</sup> Colegio de Postgraduados, Campus Córdoba. Carretera Federal Córdoba-Veracruz, Km 348, Congregación Manuel León Amatlán de los Reyes, Veracruz, C.P. 94500. México.

### RESUMEN

*Moringa oleifera* es una especie con gran importancia alimenticia humana y animal. El objetivo fue determinar el efecto de la poda sobre la producción de biomasa y contenido proteico en moringa. Plantas de tres años de edad fueron seleccionadas de acuerdo a la similitud entre altura y diámetro basal. El diseño experimental fue en bloques completamente al azar con tres tratamientos y cuatro repeticiones. Los tratamientos fueron podas de tallo a 0.75 (T1), 1.00 (T2) y 1.50 m (T3) de altura. Se midieron variables de longitud de brotes, número de brotes, número de hojas y producción de biomasa a los cuatro meses. Paralelamente se determinó el contenido de humedad, ceniza y proteína en hojas. Se encontraron diferencias estadísticas (Tukey,  $p < 0.05$ ) en el crecimiento y supervivencia de los brotes, siendo los tratamientos 1.00 m y 0.75 m de mayor altura para la primera y segunda poda. El T3 presentó 83.31% de humedad, 16.85 % de proteína y 12.3 % de ceniza en la primera poda. No se encontraron diferencias estadísticas (Tukey,  $p > 0.05$ ) en la producción de biomasa, ni tampoco en el contenido de proteína en hojas. Se concluye que, moringa tolera podas a baja altura. La práctica de las podas incrementa la producción de biomasa y facilitan la cosecha en moringa.

**Palabras clave:** producción, cosecha.

### SUMMARY

*Moringa oleifera* is a species with great nutritional importance. The objective of this work was to determine the effect of pruning in moringa biomass production and protein content. Three-year-old plants were selected according to the similarity between height and basal diameter. The experimental design consisted on three treatments and four repetitions. The treatments were pruned at 0.75 (T1), 1.00 (T2) and 1.50 m (T3) in height. The variables measured were shoot length, number of shoots, number of leaves and biomass production at four months. In parallel, moisture, ash and protein content in leaves were determined. Statistical differences (Tukey,  $p < 0.05$ ) were found in the shoots growth and survival, being the treatments 1.00 m and 0.75 m of greater

height for the first and second pruning. The T3 presented 83.31 % humidity, 16.85 % protein and 12.3 % ash in the first pruning. No statistical differences (Tukey,  $p > 0.05$ ) were found in biomass production, nor in leaf protein content. It is concluded that moringa is tolerant to pruning at low height. Pruning, as agricultural practice, increases biomass production and facilitates harvesting in moringa.

**Keywords:** Moringa, production, harvest.

### INTRODUCCIÓN

Ante los retos actuales de la seguridad alimentaria, pérdida de la fertilidad de suelos y cambio climático, se busca que mediante la agricultura se pueda mitigar el hambre y la desnutrición que sufre la humanidad (FAO, 2017). Una alternativa que puede contribuir a esta noble tarea es el cultivo de moringa (*Moringa oleifera* Lam.), un árbol multipropósito originario del Noroeste de la India que se ha distribuido en la mayoría de las zonas tropicales y subtropicales del mundo y que se introdujo a América Latina en el año de 1920 (Olson y Fahey, 2011).

Moringa presenta una diversidad de usos, entre ellos: industrial, floculante, bioabsorbente, agrícola, medicinal y alimenticio, siendo estos dos últimos los de mayor interés mundial (Anwar, 2007; Madera-Santana *et al.*, 2019). Las hojas contienen prácticamente todos los aminoácidos esenciales, carbohidratos, carotenos, vitaminas, calcio, hierro, magnesio, fósforo, potasio, zinc, proteínas, grasas y ácidos grasos (Chelliah *et al.*, 2017). Éstas se utilizan en la alimentación tanto humana como animal promoviendo muchos beneficios productivos y un mejor estado nutricional (Kakengi *et al.*, 2007).

Pocas plantas en el mundo se comparan con el perfil nutricional de moringa, además presenta un rápido crecimiento, alta producción de biomasa, supervivencia en climas adversos, alta tolerancia a la sequía, crece adecuadamente en precipitaciones de 500 a 1,500 mm, suelos francos o delgados, con poca cantidad de nutrientes y con intervalo de pH de 4.5-8.0 (Adedapo *et al.*, 2009). Es una planta que puede producir una alta cantidad de biomasa (fresca y seca) aún a altas densidades de siembra (Reyes *et al.*, 2006). Sin

\*Autor para correspondencia: Arturo Pérez Vázquez  
Correo electrónico: parturo@colpos.mx

Recibido: 11 de octubre de 2020

Aceptado: 7 de marzo de 2021

embargo, la respuesta a podas cuando el diámetro del tallo es pequeño (5-10 mm) limita la producción de ramas (Foidl *et al.*, 2011). Moringa se puede utilizar como una opción sostenible y económicamente viable para la producción de alimentos, reforestación, producción de forraje o cultivo agrícola resistente al cambio climático (Reyes *et al.*, 2006; Gandji *et al.*, 2018). También puede usarse como un recurso clave en la alimentación para combatir la desnutrición, obesidad y patologías asociadas a la carencia de vitaminas (Orona *et al.*, 2015; Rodiles-López *et al.*, 2019). El uso de moringa con fines nutricionales puede contribuir a la seguridad alimentaria y nutricional de la población, principalmente en comunidades rurales donde el acceso a alimentos y su calidad nutricional es inadecuado (Mudyiwa *et al.*, 2013; Aguilar-Jiménez *et al.*, 2019).

En el sureste de México existen hoy día una gran cantidad de unidades de producción comercial de moringa, las cuales desconocen las mejores prácticas de manejo agronómico como la mejor altura de poda, frecuencia de corte y densidad de siembra para obtener una mayor cantidad y calidad en la producción de biomasa. Se sabe, que el rendimiento de biomasa fresca y seca en moringa esta determinado por las condiciones edafoclimáticas y prácticas de manejo del cultivo (Ramos *et al.*, 2015). Moringa responde muy bien a podas con una alta capacidad de rebrote y permite tener varias cosechas de hoja al año. Pero a medida que la planta envejece disminuye su producción (Palada y Chang, 2003). Una de las estrategias para aumentar su producción de biomasa es la poda (Ledeza *et al.*, 2018).

La poda de tallo promueve la ramificación, aumenta el rendimiento y en alturas adecuadas facilita la cosecha. Cabe mencionar que existe poca información sobre el efecto de la poda en la producción de biomasa y contenido de proteína. Por ello, se requiere de investigaciones que determinen la altura óptima de corte para que la planta logre una producción de biomasa sin poner en riesgo la supervivencia del cultivo. Por tanto, el objetivo fue determinar el efecto de la poda sobre la producción de biomasa y contenido de proteína en moringa en la zona centro del estado de Veracruz. Bajo la hipótesis de que la producción de biomasa y contenido de proteína de moringa esta en función con la altura de poda.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Área de estudio y material biológico

La unidad experimental se estableció en los terrenos del Colegio de Postgraduados, Campus Veracruz, localizado en el municipio de Manlio Fabio Altamirano (19° 16' 00" LN, 96° 16' 32" LO; 16 msnm). La zona esta caracterizada por tener un clima trópico subhúmedo con lluvias en verano durante cuatro meses, del mes de junio a septiembre. Durante el experimento se registraron datos climáticos. El promedio de temperatura máxima fue de 31 °C ( $\pm 1.94$ ) y mínima de 22 °C ( $\pm 1.21$ ); la humedad relativa de 82% ( $\pm 2.11$ ) y una precipitación acumulada de 293 mm y la anual de ese año de 771.2 mm. Se realizó un perfil de suelo a una profundidad de 1.27 m para identificar las capas del suelo y describir las

características de cada capa. El suelo se caracteriza ser poco profundo y pedregoso. Se realizó el análisis de suelo a cada capa del perfil y se determinó el color, % de materia orgánica, pedregosidad, textura, densidad aparente, biodiversidad, conductividad eléctrica ( $\mu\text{S}$ ), pH, amoníaco ( $\text{NH}_3\text{-N}$ ), P, K, y nitrato ( $\text{NO}_3\text{-N}$ ), bajo la NOM-021-SEMARNAT-2000 (SEMARNAT, 2002).

Las semillas de moringa fueron sembradas en octubre del 2012, cuyo peso promedio fluctuaba en 268.9 ( $\pm 42.9$ ) mg. Para julio del 2015, los árboles del cultivo tenían una edad de 3 años.

### Tratamientos y Diseño experimental

El diseño fue de bloques completamente al azar con tres bloques, tres tratamientos y cuatro repeticiones por bloque (Tabla 1). Los tratamientos se determinaron seleccionando aquellas plantas que tuvieran altura y diámetro del tallo similar. La altura promedio de las plantas fue de 6.41 ( $\pm 0.22$ ) m y un diámetro promedio del tallo de 13.78 ( $\pm 1.69$ ) cm. La distancia entre filas fue de 4 m y 2 m entre plantas. La poda se realizó con serrotes a los tratamientos de altura de 0.75, 1.00, 1.50 m. La primera poda se realizó el día 27 de julio y la cosecha el 28 de septiembre (63 días después de la poda), y la segunda cosecha el 28 de noviembre (61 días después de la poda).

**Tabla 1.** Tratamientos de altura de poda en el cultivo de *M. oleifera*.  
**Table 1.** Pruning height treatments in the cultivation of *M. oleifera*.

Tratamiento	Altura de poda respecto al suelo
T1	0.75 m
T2	1.00 m
T3	1.50 m

### Manejo del experimento y variables registradas

Diariamente se monitoreaba las plantas para evitar que fueran perjudicadas por algún agente externos como plagas o enfermedades. Las plantas no recibieron riego ni abono durante la experimentación.

Cada siete días se registraron las variables: altura, número de ramas y hojas de los brotes. Con ayuda de un flexómetro se midió la longitud de los rebrotes. Se realizaron dos muestreos con periodos de 63 y 61 días para conocer la producción de biomasa fracción gruesa (brotes) y fracción fina (hojas). Se determinó la tasa de crecimiento promedio en los tratamientos. El contenido de materia seca se determinó deshidratando el tallo y las hojas (fracción fina y gruesa) en una estufa de aire forzado a una temperatura de 60 °C durante 48 h. Se utilizaron hojas deshidratadas previamente molidas para determinar la cantidad de humedad, ceniza y proteína. Para la determinación del contenido de proteína se utilizó el Método de Kjeldahl (AOAC, 1984) y para el contenido de ceniza se utilizó el método establecido en la NMX-F-066-S-1978 (DOF, 1961).

### Análisis estadístico

Para determinar diferencias estadísticas entre las diferentes alturas de poda se realizaron análisis de varianza con la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ) por cada variable registrada. El análisis estadístico y las correlaciones se realizaron con el programa InfoStat versión 2016. Se estimó el promedio de los tratamientos contemplando el diseño experimental.

## RESULTADOS

### Perfil del suelo

En la capa superior del suelo (0 - 0.25 m) se encontró la mayor cantidad de materia orgánica y un suelo más ligero, y a mayor profundidad se identificó mayor compactación (Tabla 2).

**Tabla 2.** Características fisicoquímicas del perfil de suelo en el área experimental donde se establecieron las plantas de *M. oleifera*.

**Table 2.** Physicochemical characteristics of the soil profile in the experimental area where the *M. oleifera* plants were established.

Profundidad (cm)	Carácter	Descripción
0 - 25	Color	Amarillo grisáceo en húmedo
	Materia orgánica	2.5%
	Raíces	Gruesas medianas
	Pedregosidad	Tamaño pequeño
	Textura	Franco arcillosa
	Densidad aparente	Buena 1.2 - 1.27
	Biodiversidad	Hormigas y microfauna
	Observaciones	Presencia de manchas moteadas
25.1 - 53	Color	Café cobrizo en húmedo
	Materia orgánica	Mínima cantidad de M.O
	Raíces	Tope de desarrollo radicular por la presencia de piedra
	Pedregosidad	Abundante con capas laminares con segmentos duros
	Textura	Franco-arcilloarenosa
	Densidad aparente	1.3 - 1.4
53.1 - 87	Diámetro de piedra	Superior a los 8 cm
	Color	Amarillo grisáceo en húmedo
	Materia orgánica	Ausente
	Gravilla	Producto del desgaste del material rocoso de la capa superior
87.1 - 127	Moteados	Color amarillo y material laminar duro
	Color	Gris claro
	Materia orgánica	Ausente
	Roca madre	Sin presencia de piedra
	Raíces	Escasas raíces adventicias
	Pedregosidad	Material laminar compactado

### Análisis de suelo

El análisis de suelo arrojó que la capa superior (0 - 0.25 m) presentó mayores valores de conductividad eléctrica y materia orgánica en comparación con las capas de mayor profundidad. El valor de pH fue ligeramente ácido en la superficie y neutro a mayor profundidad, con un nivel medio de materia orgánica en los primeros 25 cm y menor contenido a mayor profundidad. El contenido de N fue 2.5 mg L<sup>-1</sup>, P 1 mg L<sup>-1</sup> y K 14 mg L<sup>-1</sup> en la capa superficial (Tabla 3). La textura franco arcillosa en la capa superficial y arenosa-franca a una profundidad mayor a los 25 cm. Por tanto, puede ser ubicado como un suelo con buen drenaje y apto para el cultivo de moringa.

La primera y segunda poda se realizaron el día 27 de julio y 28 de septiembre, respectivamente. El efecto de la poda se reflejó en la aparición de los primeros rebrotes, a los 20 y 21 días después de la primera y segunda poda. La tasa de crecimiento relativo (TCR) tuvo un decremento respecto a la altura de poda. La TCR para las alturas 0.75, 1.00 y 1.50 m fueron de 1.30, 1.35 y 1.10 cm día<sup>-1</sup>, siendo el tratamiento de 1.00 m el de mayor crecimiento en la primera poda realizada a los 63 días. Durante los primeros 28 días, el tratamiento de 1.00 m mostró diferencias estadísticas ( $p < 0.05$ ) en el crecimiento de altura respecto a los otros tratamientos.

En la segunda poda, las TCR fueron de 1.80, 1.44 y 0.98 cm día<sup>-1</sup> para las alturas 0.75, 1.00 y 1.50 m. En este caso el tratamiento con mayor tasa de crecimiento fue a 0.75 m. Los tratamientos 0.75 y 1.00 m mostraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el crecimiento desde los 26 días después de la segunda poda, siendo similar al final del periodo de experimentación. La Figura 1 muestra las curvas de crecimiento promedio de los tratamientos durante dos periodos (63 y 61) de poda y cosecha. En el primer periodo, el mayor crecimiento correspondió al tratamiento de 1.00 m y en el segundo periodo fue el tratamiento de 0.75 m.

### Número de hojas

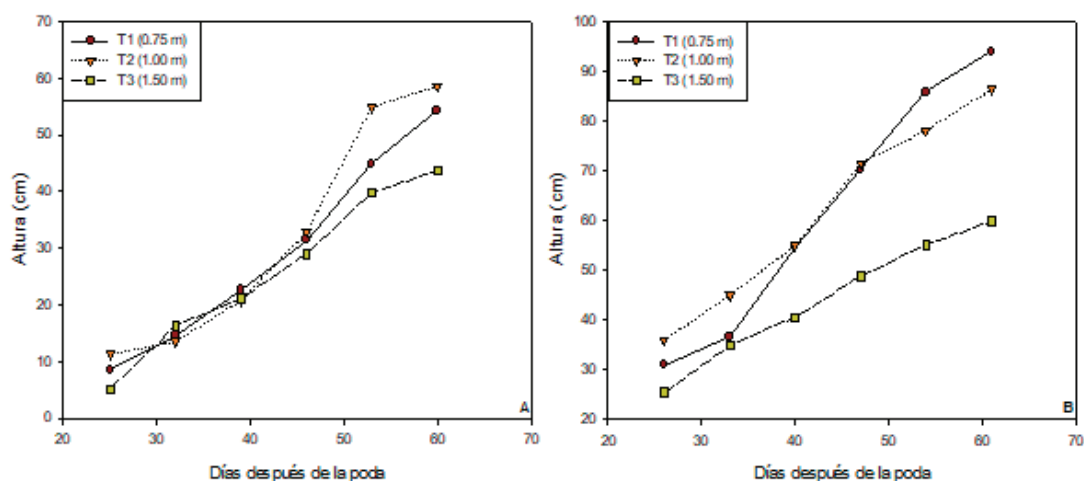
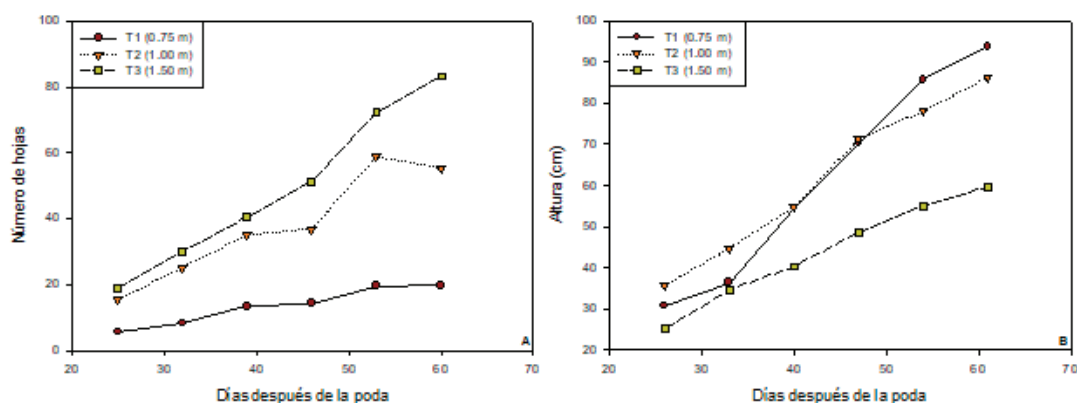
En el primer periodo existió una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en el número de hojas entre T1 (0.75 m) respecto a los otros tratamientos; para el día 60, la altura de T3 (1.50 m) fue la más productiva en el número de hojas. En el segundo periodo, durante los primeros 26 días después de la poda no se encontró diferencias significativas entre tratamientos; el incremento de hojas para la altura 1.50 m fue evidente a partir del día 40 diferenciándose de los otros tratamientos. Mientras que la poda a 1.00 y 1.50 m presentaron un número de hojas similar. El T2 (1.00 m) fue el más productivo en el primer periodo y el T3 (1.50 m) en el segundo periodo (Figura 2).

### Producción de brotes

Los brotes emergieron a los 20 días después de la poda, pero no todos llegaron a desarrollarse por completo. En el primer periodo los tratamientos 1.00 y 1.50 m tuvieron cantidades similares de brotes durante los primeros 53 días, a partir de ahí se presentó un incremento significativo de brotes en el T3 (1.50 m) respecto a los otros tratamientos.

**Tabla 3.** Análisis de suelo a las diferentes profundidades del área de cultivo de *M. oleifera*.**Table 3.** Soil analysis at different depths of the *M. oleifera* cultivation area.

Profundidad (cm)	Textura	Conductividad eléctrica ( $\mu\text{S}$ )	pH	Materia orgánica (%)	Amoniaco $\text{NH}_3\text{-N}$ ( $\text{mg L}^{-1}$ )	P ( $\text{mg L}^{-1}$ )	K ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Nitrato ( $\text{NO}_3\text{-N}$ ) ( $\text{mg L}^{-1}$ )
0 – 25	Franco arcilloso	186.8	6.34	2.50	2.5	1	14	86
25.1 – 53	Arenoso Franco	145.0	6.87	0.48	2.0	1.5	24	12
53.1 – 87	Arenoso Franco	114.6	6.77	0.36	-	-	-	10
87.1 – 127	Franco arcilloso	218.1	6.91	0.30	-	-	-	-

**Figura 1.** Crecimiento promedio de brotes de *M. oleifera* a diferentes alturas de poda en dos periodos: A) Periodo 1: altura máxima T2: 58 cm; y B) Periodo 2: altura máxima T1: 93 cm.**Figure 1.** Average growth of *M. oleifera* shoots at different pruning heights at two periods: A) Period 1: maximum height T2: 58 cm; and B) Period 2: maximum height T1: 93 cm.**Figura 2.** Número de hojas de *M. oleifera* a diferentes alturas de poda en dos periodos de poda A) Periodo 1: tratamiento con mayor cantidad de hojas T3: 83 hojas, B) Periodo 2: tratamiento con mayor cantidad de hojas, T3: 115 hojas.**Figure 2.** Number of *M. oleifera* leaves at different pruning heights at two pruning periods A) Period 1: treatment with a greater quantity of leaves T3: 83 leaves, B) Period 2: treatment with a greater quantity of leaves, T3: 115 sheets.



En el segundo periodo se encontró una diferencia significativa entre el T3 respecto a los otros tratamientos (Figura 3). El número máximo de rebrotes correspondió a la altura de poda de 1.50 m con 10 brotes y el menor correspondió a 0.5 m con 4. La mayor desviación estándar (4.72) en la producción de rebrotes correspondió al 1.50 m, y la menor a 0.75 m (2.36). Aunque el mayor número de brotes correspondió a una altura de 1.50 m, esto se relacionó con la producción de biomasa, debido al tamaño de los rebrotes y hojas.

### Producción de biomasa

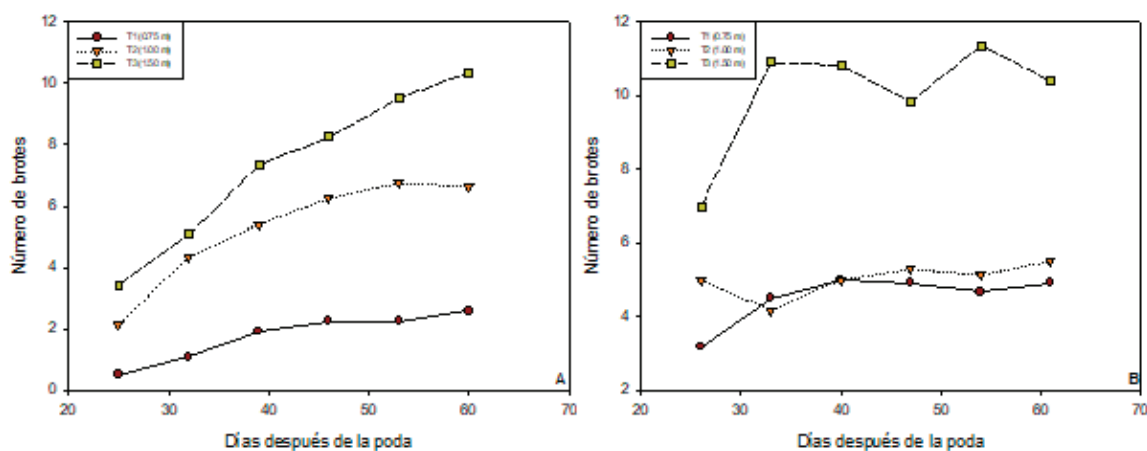
Respecto a la producción de biomasa no se encontraron diferencias estadísticas ( $p > 0.05$ ) en ambas cosechas. Se encontró una tendencia a que a una altura de poda de 1.00 m tuvo una mayor producción de biomasa (fracción gruesa y fina) para el primer periodo, dando un rendimiento equivalente a  $0.24 \text{ t ha}^{-1}$  de materia seca superior a los  $0.030$  y  $0.055 \text{ t ha}^{-1}$  para los  $0.75 \text{ m}$  y  $1.00 \text{ m}$ . En el segundo periodo, el T3 tuvo la mayor producción de biomasa fracción fina seca. El resultado demuestra que el T1 ( $0.75 \text{ m}$ ) tuvo una producción baja (Tabla 4).

### Análisis bromatológico

No se encontraron diferencias significativas respecto a la cantidad de humedad, proteína y ceniza contenida en las hojas en ambos periodos (Tabla 5). La cantidad de proteína y de ceniza en la primera cosecha fue de  $16.48\%$  y  $11.78\%$  y en la segunda, el contenido de proteína y de ceniza fue de  $18.52\%$  y el  $11.33\%$ . Los contenidos de humedad en la hoja fueron de  $79$  y  $76\%$  en la primera y segunda cosecha. Comparando entre cosechas, se encontró que los valores más altos, de proteína y ceniza y menor contenido de humedad en la segunda poda. La cantidad de humedad en la hoja estuvo influenciada por la precipitación de  $92.2 \text{ mm}$  inferior a los  $198.6 \text{ mm}$  registrados en el primer periodo.

En la primera poda, la correlación de la altura de poda con la cantidad de proteína ( $0.17$ ) y ceniza fue baja ( $0.45$ ). Se encontró una correlación positiva entre la altura del brote y el peso del tallo ( $0.79$ ) y hoja ( $0.70$ ). La altura de poda tuvo una correlación de  $0.47$  con la TCR de la hoja (Tabla 6).

En la segunda poda, la correlación de la altura de poda con la cantidad de proteína ( $-0.27$ ) y ceniza fue negativa ( $-0.22$ ). Hubo una correlación positiva entre la altura de poda



**Figura 3.** Número de brotes de *M. oleifera* a diferentes alturas de poda en dos periodos de poda A) Periodo 1: 63 días B) Periodo 2: 61 días.

**Figure 3.** Number of shoots of *M. oleifera* at different pruning heights at two pruning periods A) Period 1: 63 days B) Period 2: 61 days.

**Tabla 4.** Producción de biomasa de *M. oleifera* a diferentes alturas de poda en dos periodos de poda.

**Table 4.** Biomass production of *M. oleifera* at different pruning heights in two pruning periods.

Poda	Tratamiento (altura de poda)	Biomasa F. F. (fresco) (g)	Biomasa F. G. (fresco) (g)	Biomasa F. F. (seco) (g)	Biomasa F. G. (seco) (g)
1ra	T1 (0.75 m)	130.53 <sup>a</sup>	133.50 <sup>a</sup>	22.99 <sup>a</sup>	23.27 <sup>a</sup>
	T2 (1.00 m)	314.30 <sup>a</sup>	315.97 <sup>a</sup>	75.63 <sup>a</sup>	74.75 <sup>a</sup>
	T3 (1.50 m)	270.70 <sup>a</sup>	225.51 <sup>a</sup>	41.81 <sup>a</sup>	39.17 <sup>a</sup>
2ra	T1 (0.75 m)	648.34 <sup>a</sup>	817.84 <sup>a</sup>	150.35 <sup>a</sup>	128.16 <sup>a</sup>
	T2 (1.00 m)	628.34 <sup>a</sup>	716.69 <sup>a</sup>	135.43 <sup>a</sup>	92.80 <sup>a</sup>
	T3 (1.50 m)	677.28 <sup>a</sup>	697.51 <sup>a</sup>	137.17 <sup>a</sup>	111.54 <sup>a</sup>

\*Valor promedio de tres repeticiones. FF (fracción fina); FG (fracción gruesa)

**Tabla 5.** Contenido de humedad, proteína y ceniza de *M. oleifera* a diferentes alturas de poda.  
**Table 5.** Moisture, protein and ash content of *M. oleifera* at different pruning heights.

Tratamiento	1ra poda			2ra poda		
	Humedad (%)	Proteína base seca (%)	Ceniza (%)	Humedad (%)	Proteína base seca (%)	Ceniza (%)
T1 (0.75 m)	76.83	16.37	10.6	75.62	18.6	11.3
T2 (1.00 m)	79.50	16.22	12.3	77.17	19.9	11.6
T3 (1.50 m)	83.81	16.85	12.3	77.44	17.7	11.0

**Tabla 6.** Correlaciones entre las variables registradas en la producción de biomasa de *M. oleifera* a diferentes alturas de poda de la primera cosecha.  
**Table 6.** Correlations between the recorded variables in the *M. oleifera* biomass production at different pruning heights of the first harvest.

	Tratamiento	Altura del brote	Ramas	Hojas	% Materia seca	% Ceniza	% Proteína	Peso F. hoja	Peso F. tallo	TCR HOJA	TCR TALLO
Tratamiento	1										
Altura del brote	-0.18	1									
Ramas	0.93	-0.07	1								
Hojas	0.88	0.23	0.95	1							
Materia seca	0.48	0.38	0.55	0.66	1						
% Ceniza	0.45	0.54	0.61	0.77	0.73	1					
% Proteína	0.17	0.30	0.15	0.22	-0.29	-0.16	1				
Peso F. hoja	0.24	0.70	0.44	0.62	0.54	0.73	0.26	1			
Peso F. tallo	0.14	0.79	0.31	0.54	0.49	0.73	0.23	0.98	1		
TCR* HOJA	0.47	0.57	0.66	0.81	0.68	0.92	0.04	0.9	0.86	1	
TCR TALLO	0.42	0.6	0.59	0.76	0.7	0.95	-0.05	0.88	0.88	0.99	1

y el número de ramas (0.81) y hoja (0.76). La altura de poda tuvo una correlación de -0.41 con la TCR de la hoja (Tabla 7).

En la Figura 4 se muestra la regresión de la altura con el peso de la hoja seca.

## DISCUSIÓN

Los árboles de moringa del experimento tenían 3 años de edad, con crecimiento monopódico, con una o dos ramas, en un suelo franco-arcilloso y sin fertilización. Debido a la compactación del suelo, el desarrollo de la raíz se vio limitado, alcanzando una profundidad de 60 cm y en algunos casos con bifurcación.

La poda es una práctica agronómica que incrementa la ramificación, la producción de hojas y facilita la cosecha (Leone *et al.*, 2015). La poda es importante para la producción de nuevos rebrotes eliminando la dominancia apical (Crosby y Craker, 2007). Esta práctica evita que las hojas y los frutos se produzcan en el tallo principal (Palada y Chang, 2003). Además, tiene un efecto positivo en el diámetro, número de inflorescencias, número y tamaño de los frutos debido al mayor desarrollo de dosel (Du Toit *et al.*, 2019). La utilización de la poda en épocas claves del año permite la producción de más flores y frutos fuera de temporada lo cual favorece a los productores (Sharmila *et al.*, 2018). Por ello, se recomienda realizar la poda cuando el árbol rebase 1 m de altura ó cuando el tallo sea demasiado grueso (Noamesi *et al.*, 2010). Para fomentar la ramificación se puede podar a 1 o 2 m de la altura

o recortar las ramas a 30 cm por arriba de un nudo (Palada y Chang, 2003). Montesinos (2010) sugiere podar a 20 cm del suelo para lograr mayor producción de biomasa y Lawal *et al.* (2015) mencionan que puede podarse de 0.40 a 1.50 m debido a la gran capacidad de producción de rebrotes (López *et al.*, 2012). En este estudio se encontró un rápido crecimiento y una alta supervivencia de los rebrotes. La capacidad de rebrote se debe a la traslocación de fotosintatos de la raíz a la parte superior del tallo, permitiendo el desarrollo de brotes, hojas y un incremento en el rendimiento de materia seca (Nouman *et al.*, 2013). Además, favorece el desarrollo de la raíz e incrementa la eficiencia de los agroquímicos como fertilizantes (Strik y Buller, 2005), puede rejuvenecerse la planta y mantenerla a una altura que permita la cosecha de hojas sin problemas o riesgos.

Las condiciones del clima, las cuales fueron propicias, permitieron obtener buenos resultados al realizar podas en periodos de 63 y 61 días. Se encontró que la altura óptima de poda es a 1.00 m de altura con un diámetro de tallo de 137.84 ( $\pm 16.92$ ) mm, logrando buena producción de biomasa en un periodo de 63 días. La producción de biomasa en moringa se vio afectada por el nivel de precipitación durante el periodo de experimentación, siendo un año con escasa precipitación respecto al promedio anual para la zona (1,100 mm). Padilla *et al.* (2017) sugieren que las podas deben realizarse en épocas de lluvias y no en verano (estiaje). Las podas en épocas cálidas ocasionan que los brotes sean más cortos y

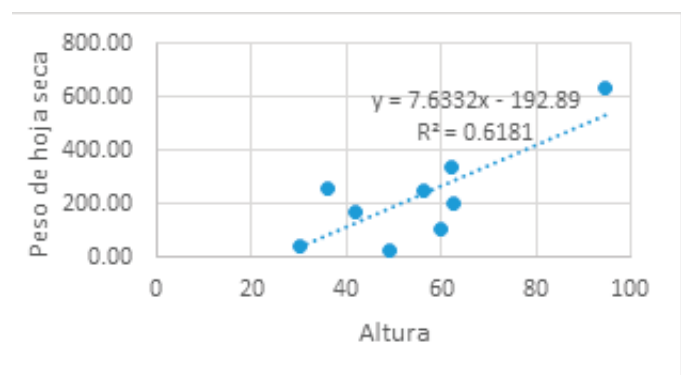
**Tabla 7.** Correlaciones entre las variables de la producción de biomasa de *M. oleifera* a diferentes alturas de poda de la segunda cosecha.  
**Table 7.** Correlations between the biomass production variables of *M. oleifera* at different pruning heights of the second harvest.

	Tratamiento	Altura del brote	Ramas	Hojas	% Materia seca	% Ceniza	% Proteína	Peso F. hoja	Peso F. tallo	TCR HOJA	TCR TALLO
Tratamiento	1										
Altura del brote	0.37	1									
Ramas	0.81	0.05	1								
Hojas	0.76	0.09	0.96	1							
% Materia seca	0.46	0.33	0.48	0.59	1						
% Ceniza	-0.22	3.60E-03	-0.14	-0.23	-0.7	1					
% Proteína	-0.27	-0.22	-0.56	-0.6	-0.52	0.38	1				
Peso F. hoja	0.04	-0.11	0.15	0.4	0.6	-0.65	-0.32	1			
Peso F. tallo	-0.1	0.03	0.04	0.31	0.57	-0.56	-0.38	0.96	1		
TCR* HOJA	-0.01	-0.05	0.09	0.34	0.6	-0.67	-0.35	0.99	0.97	1	
TCR TALLO	-0.13	0.14	-0.07	0.19	0.54	-0.59	-0.33	0.92	0.98	0.96	1

\*TCR: Tasa de crecimiento relativo

delgados, con una baja producción de biomasa (Mommer *et al.*, 2006). Esto se debe a que el incremento de temperatura influye en los patrones de precipitación y afecta el desarrollo de los cultivos (Varas y Herrera, 2019). Además, la frecuencia de corte (periodos superiores a los 40 días) permite que la planta acumule reservas y produzca rebrotes más vigorosos (Ojiako *et al.*, 2011). En este caso se encontró que la mayor producción de biomasa se obtuvo en la segunda cosecha y esto pudo deberse al efecto cicatrizante de la planta respecto a la poda inicial, lo cual no sucedió en la segunda cosecha. La producción de biomasa fresca estuvo afectada no solo por la altura de poda, sino también entre la primera y segunda cosecha. Este resultado coincide con lo indicado por Crosby y Craker (2007) quienes mencionan que la biomasa producida como resultado de la primera poda es baja debido a la recuperación del árbol y a la activación de los sistemas de rebrote. Después de la poda, la biomasa fracción gruesa tiende a ser más delgada y numerosa y puede ser utilizada como forraje.

Fonseca *et al.* (2015) señalan que la altura de poda y la frecuencia de corte tienen efectos crecientes y positivos en moringa, alcanzando los más altos rendimientos a la altura de 0.40 m (respecto al suelo) y con una frecuencia de corte de 60 días. En este caso el más alto rendimiento promedio obtenido correspondió a la altura de 1.50 m que fue equivalente a 592.48 Kg ha<sup>-1</sup> de biomasa fresca. Aunque la producción de biomasa a diferentes alturas de corte puede variar una a otra cosecha y puede no tener diferencias significativas al analizarse a través del tiempo (Padilla *et al.*, 2014). Zheng *et al.* (2016) indican que una mayor densidad de siembra (0.2 m x 0.2 m) en combinación con una altura de corte de (0.30 m) produjo el mayor rendimiento de materia fresca (8.43-76.41 t ha<sup>-1</sup>) y seca (1.66-12.85 t ha<sup>-1</sup>). Normalmente el desarrollo de moringa está asociado al tipo de clima, suelo, pH y prácticas de manejo agronómico. Estos factores determinan la altura, el diámetro del tallo y la producción de biomasa (Santiago y Bezerra, 2017). Por ello, al comparar el cultivo moringa



**Figura 4.** Regresión de la altura de poda con el peso seco de la hoja seca.  
**Figure 4.** Regression of pruning height versus dry leaf dry weight.

en diferentes localidades muestran grandes diferencias en los componentes del rendimiento. Moringa puede llegar a alcanzar rendimientos elevados en altas densidades de siembra y a diferentes frecuencias de corte (Mendieta *et al.*, 2013).

#### Valor bromatológico.

El contenido proteico en hojas a los 61 y 63 días entre tratamientos fue similar. Castillo *et al.* (2013) mencionan que la altura del corte tiene poco efecto en la composición química de las hojas y tallos de moringa. A diferencia de la poda, la frecuencia de corte logra concentrar mayor contenido de proteína encontrándose hasta un 22.8% de proteína en periodos de cosecha de 75 días (Reyes *et al.*, 2006) y de 23 a 27% de proteína cruda en hojas en periodos de corte de 100 días (González, 2013). El contenido de proteína en las hojas secas de moringa fue 16.85 %. Este valor es mayor que 10.74, 7.12 y 14.40% reportados por Valdez *et al.* (2015), Ayasan (2015) y Chucu y Chucu (2013) respectivamente. Sin embargo, este valor es menor que el 27.51 % reportado por Ajantha *et al.* (2018). Clement *et al.* (2017) y Hernandez-Torres *et al.* (2018) mencionan que las condiciones de deshidratado influyen en el contenido sensorial y nutricional (Alvarez-Parrilla *et al.*,

2019), siendo el deshidratado por radiación directa el más perjudicial en el contenido proteico. El contenido promedio de humedad en la hoja fue del 77.5% y 17.5% de proteína superior a lo reportado por Tapia *et al.* (2012) a una frecuencia de corte de 45 días. Bamishaiye *et al.* (2011) mencionan que los periodos de cosecha influyen en la acumulación de nutrientes en las hojas. De acuerdo con Nouman *et al.* (2013), el contenido de proteína cruda, minerales (K, Ca, Mg y P), clorofila,  $\beta$ -caroteno y contenido fenólico total en las hojas de moringa no se ve influenciado por la altura de poda. La estación de cosecha tiene en efecto en el contenido de proteína. Además, las hojas maduras logran almacenar una mayor cantidad de clorofila en comparación con las hojas de una planta recién podada (Du Toit *et al.*, 2019). El porcentaje de ceniza en las hojas de moringa fue de 12%, superior a 9.84% obtenido de un rendimiento de 4.51 t ha<sup>-1</sup> de materia seca con cortes de 45, 60 y 75 días (Reyes *et al.*, 2006). Dicho valor se encuentra dentro del rango 6.49 - 14.16% reportado por Sánchez *et al.* (2006). El contenido bromatológico en las hojas está influenciado por la densidad de siembra, periodo de establecimiento, frecuencia de corte, método de secado, variedad genética, fertilidad y tipo de suelo, variaciones ambientales y manejo agronómico (Asante *et al.*, 2014; Valdivié-Navarro *et al.*, 2019).

## CONCLUSIONES

Se concluye que moringa tiene gran tolerancia y responde bien a la poda. Por ello, normalmente se recomienda esta práctica agronómica que permite incrementar la ramificación y, por ende, aumentar la producción de hoja (follaje) y facilita la cosecha. El crecimiento de los brotes permitió una producción aceptable de hojas en periodos de 63 y 61 días, con una mayor producción en la segunda cosecha respecto a la primera después de la poda. Se recomienda realizar podas en moringa a una altura de 1.50 m para promover la producción de biomasa, a una frecuencia de corte superior a los 45 días para una mayor concentración de proteína.

## REFERENCIAS

- Adedapo, A.A., Mogbojuri, O.M. y Emikpe, B.O. 2009. Safety evaluations of the aqueous extract of the leaves of *Moringa oleifera* in rats. *Journal of Medicinal Plants Research*. 3(8): 586-591.
- Aguilar-Jiménez, A.N., Magaña-Magaña, M.Á. y Carminia-Contreras, L. 2019. Factores socioeconómicos asociados a la diversidad pecuaria del traspaso en comunidades mayas de Yucatán y Campeche. *Biotecnia*. 21 (3): 5-12.
- Ajantha, A., Kathirvelan, C., Purushothaman, M.R. y Visha, P. 2018. Study on Nutrients, Mineral and Vitamin Profile of *Moringa oleifera* Leaf Meal. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences (IJCMAS)*. 5: 2478-2481.
- Alvarez-Parrilla E., Contreras-Muñiz, F., Rodrigo-García, J., De la Rosa, L.A., García-Fajardo, J.A. y Núñez-Gastélum, J.A. 2019. Cinética de secado y efecto de la temperatura sobre las características físicas y compuestos fenólicos de chile jalapeño rojo (*Capsicum annuum* L.). *Biotecnia*. 21 (1): 139-147.
- Amaglo, N. 2006. How to Produce Moringa Leaves Efficiently?. Kwame Nkrumah University of Science and Technology, Ghana. Recuperado de [http://miracletrees.org/moringadoc/how\\_to\\_produce\\_moringa\\_leaves\\_efficiently.pdf](http://miracletrees.org/moringadoc/how_to_produce_moringa_leaves_efficiently.pdf).
- Anwar, F., Latif, S., Ashraf, M. y Gilani, A. H. 2007. *Moringa oleifera*: a food plant with multiple medicinal uses. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*. 21(1): 17-25.
- Asante, W.J., Nasare, I.L., Tom-Dery, D., Ochire-Boadu, K. y Kentil, K.B. 2014. Nutrient composition of *Moringa oleifera* leaves from two agro ecological zones in Ghana. *African Journal of Plant Science*. 8(1): 65-71.
- Association of Official Agricultural Chemists (AOAC). 1984. *Official Methods of Analysis*. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington, D.C., USA.
- Ayasan, T. 2015. Use of *Moringa oleifera* in poultry and ruminant nutrition. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*. 3(6): 425-429.
- Bamishaiye, E.I., Olayemi, F.F., Awagu E.F. y Bamshaiye, O.M. 2011. Proximate and phytochemical composition of *Moringa oleifera* leaves at three stages of maturation. *Advance Journal of Food Science and Technology*. 3(4): 233-237.
- Bosch, C.H., 2004. *Moringa oleifera* Lam. record from protabase. In: Grubben, G.J.H, Denton, O.A. (Eds.), PROTA (Plant Resources of Tropical Africa / Resources (Veg etales de L'Afrique Tropicale). Wageningen, Netherlands.
- Castillo, A., Castillo, C., Ramírez, J.B., Ávilas, L. y Cantos, R. 2013. Efecto de la densidad y frecuencia de la poda en el rendimiento y calidad de la *Moringa oleifera* Lam. XIII Congreso de la Asociación Latinoamericana de Producción Animal (ALPP) 87 p.
- Chelliah, R., Ramakrishnan, S. y Antony, U. 2017. Nutritional quality of *Moringa oleifera* for its bioactivity and antibacterial properties. *International Food Research Journal*. 24(2): 825-833.
- Clement, A., Olatunde, M., Patrick, O. y Joyce, O. 2017. Effect of drying temperature on nutritional content of *Moringa oleifera* leave. *World Journal of Food Science and Technology*. 1(3): 93-96.
- Diario Oficial de la Federación (DOF). 1961. NMX-F-066-S-1978. Determinación de cenizas en alimentos. México.
- Du Toit, E.S., Sithole, J. y Vorster, J. 2019. Pruning intensity influences growth, flower and fruit development of *Moringa oleifera* Lam. under sub-optimal growing conditions in Gauteng, South Africa. *South African Journal of Botany*. 1(47): 1-9.
- Ekhuemelo, D.O. y Udo, A.M. 2016. Investigation of variations in the fibre characteristics of *Moringa oleifera* (Lam) stem for pulp and paper production. *International Journal of Science and Technology* 5(1): 19-25.
- FAO. 2017. El trabajo de la FAO sobre el cambio climático. Conferencia de las Naciones Unidas sobre el cambio climático 2017. Recuperado de <http://www.fao.org/3/a-i8037s.pdf>
- Foidl, N., Mayorga, L., y Vásquez, W. 2011. Utilización del marango (*Moringa oleifera*) como forraje fresco para ganado. Recuperado de: [biomasa@ibw.com.nihttp://www.fao.org/ag/aga/AGAP/frg/AGROFOR1/Agrofor1.html](http://biomasa@ibw.com.nihttp://www.fao.org/ag/aga/AGAP/frg/AGROFOR1/Agrofor1.html).
- Fonseca, R.F., Molinet, A.S., Santiesteban, R.S., Anaya, K.T. y Torres, M.V. 2015. Efecto de combinaciones de altura y frecuencia



- de corte sobre el rendimiento de la Moringa (*Moringa oleifera* Lam.) en Granma. *Revista Granma Ciencia*. 19(2): 1-7.
- Gandji, K., Chadare, F.J., Idohou, R., Salako, V.K., Assogbadjo, A.E. y Kakaï, R.G. 2018. Status and utilisation of *Moringa oleifera* Lam: A review. *African Crop Science Journal*. 26(1): 137-156.
- Hernández-Torres Y., Castillo-Zamudio, R.I., Pérez-Vázquez A. y Salgado-Cervantes M.A. 2018. Efecto del tipo de secador sobre la calidad fisicoquímica de harina de Moringa (*Moringa oleifera* L.). *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 3: 423-429.
- Isah, A.D., Bello, A.G. y Zarumaye, S.A. 2014. Effects of cutting heights and interval of cutting on the yield of *Moringa oleifera* (horse raddish). *International Journal of Development and Sustainability*. 3(5): 1147-1151.
- Kakengi, A.M.V., Kaijage J.T., Sarwatt S.V., Mutayoba S.K., Shem M.N. y Fujihara T. 2007. Effect of *Moringa oleifera* leaf meal as a substitute for sunflower seed meal on performance of laying hens in Tanzania. *Livestock Research for Rural Development*. 19(8):446.
- Lawal, B.A., Olawepo, T.F., Asaolu, V.O., Akanbi, W.B., Jolaoso, M.A. y Ojo, A.M. 2015. Effect of Different Methods of Establishment on Growth and Biomass Yield of Moringa (*Moringa oleifera* Lam). *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*. 8(4): 650-653.
- Ledeá, J.L., Roselle, G., Benítez, D., Cruz, J.M., y Arias, R.C. 2018. Sprouting and development of *Moringa oleifera* Lam. plantlets, established with agamic seed. *Cuban Journal of Agricultural Science*. 52(1): 1-7.
- Leone, A., Spada, A., Battezzati, A., Schiraldi, A., Arstila, J. y Bertoli, S. 2015. Cultivation, genetic, ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of *Moringa oleifera* leaves: an overview. *International journal of molecular sciences*. 16(6): 12791-12835.
- Madera-Santana J.T., De Dios-Aguilar, M.A., Colín-Chávez, C., Mariscal-Amaro, L.A., Núñez-Colín, C.A., Veloz-García, R., Guzmán-Maldonado, S.H., Peña-Caballero, V., Grijalva-Verdugo, C.P. y Rodríguez-Núñez, J.R. 2019. Recubrimiento a base de quitosano y extracto acuoso de hoja de *Moringa oleifera* obtenido por UMAE y su efecto en las propiedades fisicoquímicas de fresa (*Fragaria x ananassa*). *Biotecnica*. 14: 33-43.
- Mendieta, A.B., Spörndly, E., Reyes, S.N., Salmerón, M.F. y Halling, M. 2013. Biomass production and chemical composition of *Moringa oleifera* under different planting densities and levels of nitrogen fertilization. *Agroforestry Systems*. 87(1): 81-92.
- Mommer, L., Lenssen, J., Huber, H., Visser, E. y De Kroon, H. 2006. Ecophysiological determinants of plant performance under flooding: a comparative study among seven plant families. *Journal of Ecology*. 94: 1117-1129.
- Montesinos, S. 2010. *Moringa oleifera*: un árbol promisorio para la ganadería. *Asociación Cubana de Producción Animal (acpa)*. 2: 50-53.
- Mudiyiwa, S.M., Gadzirayi, C.T., Mupangwa, J.F., Gotosa, J. y Nyamugure, T. 2013. Constraints and opportunities for cultivation of *Moringa oleifera* in the zimbabwean smallholder growers. *International Journal of Agricultural Research, Innovation and Technology*. 3(1): 12-19.
- Murrieta, M.J.R. 2014. Determinación de la altura óptima de poda del cultivo de moringa (*Moringa oleifera*) con fines de producción en la zona de Babahoyo. Tesis de grado para obtener el título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Técnica de Babahoyo. Ecuador. Recuperado de [http://rraae.org.ec/Record/0040\\_bfb9788e7aa7d4c461859f7e45766877](http://rraae.org.ec/Record/0040_bfb9788e7aa7d4c461859f7e45766877)
- Narváez, O.J.E. y Moreno, J.C.L. 2005. Evaluación de la producción de forraje de *Cnidioscolus aconitifolium* (Mill) L.M. Johnst, *Moringa oleifera* Lam. y *Leucaena leucocephala* Lam. de Wit, para banco proteico en Pacora, San Francisco Libre, Nicaragua. *Ciencia Animal* 1: 54-59. Recuperado de <http://repositorio.una.edu.ni/id/eprint/2278>
- Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000. Especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. estudios, muestreo y análisis. Disponible en: <http://www.ordenjuridico.gob.mx/Documentos/Federal/wo69255.pdf>.
- Nouman, W., Siddiqui, M.T., Basra, S.M.A., Farooq, H., Zubair, M. y Gull, T. 2013. Biomass production and nutritional quality of *Moringa oleifera* as a field crop. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. 37(4): 410-419.
- Ojiako, F.O., Adikuru, N.C. y Emenyonu, C.A. 2011. Critical issues in Investment, Production and Marketing of *Moringa oleifera* as an Industrial Agricultural raw material in Nigeria. *Journal of Agricultural Research and Development*. 10: 39-56.
- Olson, M.E. y Fahey, J.W. 2011. *Moringa oleifera*: un árbol multiusos para las zonas tropicales secas. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 82(4). 1071-1082.
- Orona, I.C., Olivares, E.S., Vázquez, C.V. y Gallegos, M.A.R. 2015. Cultivo de árbol de Moringa (*Moringa oleifera*) y sus usos potenciales. *Memoria de la XXVII Semana Internacional de Agronomía FAZ-UJED*. 1: 55-66.
- Padilla, C., Fraga, N., Scull, I., Tuero R. y Sarduy, L. 2014. Efecto de la altura de corte en indicadores de la producción de forraje de *Moringa oleifera* vc. Plain. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola* 48(4): 405-409.
- Padilla, C., Valenciaga, N., Crespo, G., González, D. y Rodríguez, I. 2017. Requerimientos agronómicos de *Moringa oleifera* Lam. en sistemas ganaderos. *Livestock Research for Rural Development*. 1: 1-20.
- Palada, M.C. y Chang, L.C. 2003. Suggested Cultural Practices for Moringa. *International Cooperators' Guide AVRDC*. AVRDC 1: 03-545.
- Ramos, T.O., Castillo, H.J. y Sandoval, G.J.J. 2015. Effect of cutting intervals and heights in forage productivity of *Moringa oleifera*. *Revista Bio Ciencias*, 3(3): 187-194.
- Reyes, N.S., Ledin, S. y Ledin, I. 2006. Biomass production and chemical composition of *Moringa oleifera* under different management regimes in Nicaragua. *Agroforestry Systems*. 66: 231-242.
- Rodiles-López, J.O., Arriaga-Martínez, L.P., Martínez-Flores, H.E., Zamora-Vega, R. y García-Martínez, R.M. 2019. Desarrollo de una tortilla adicionada con harinas de aguacate y nopal y su efecto en la reducción de colesterol, triglicéridos y glucosa en ratas. *Biotecnica*. 21(2): 71-77.
- Sánchez, N. R., Spörndly, E. y Ledin, I. 2006. Effect of feeding different levels of foliage of *Moringa oleifera* to creole dairy cows on intake, digestibility, milk production and composition. *Livestock Science*. 101(1-3): 24-31.
- Santiago, M.T.B. y Bezerra, N.E. 2017. Ecophysiology of *Moringa oleifera* Lam. in function of different rainfall conditions. *Revista Geama*. 3(4): 236-241.
- Santiesteban, R., Tamayo, E., Verdecia, P., Estrada, J., Diéguez, J., Molinet, D., Espinosa, S., Espinosa, A. y Cordovi, C.

2012. Influencia de la altura y la frecuencia de corte en el rendimiento de *Moringa oleifera*. I Taller Nacional de Moringa. Instituto de Ciencia Animal, Cuba.
- Sharmila-Bharathi, C., Pugalendhi, L. y Pushpanathan, K.R. 2018. Off season production of annual Moringa (*Moringa oleifera* Lam.) cv. PKM 1 through canopy management and chemical manipulation practices. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 1: 2218-2224.
- Strik, B. y Buller, G. 2005. The impact of early cropping on subsequent growth and yield of highbush blueberry in the establishment years at two planting densities is cultivar dependant. *HortScience*. 40(7): 1998-2001.
- Tapia, D., Borges, J.A., Barrios, M. y León, M. 2012. Fertilización foliar en moringa bajo condiciones de vivero. *INIA Divulga*. 1: 22-25.
- Valdés, R.O.A., Pérez, V.A., Palacios, W.O.M. y Ruiz, H.R. 2014. Potencial de la asociación *Moringa* y *Ricinus* en el subtrópico veracruzano. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 9: 1673-1686.
- Valdez-Solana, M.A., Mejía-García, V.Y., Téllez-Valencia, A., García-Arenas, G., Salas-Pacheco, J., Alba-Romero, J.J. y Sierra-Campos, E. 2015. Nutritional content and elemental and phytochemical analyses of *Moringa oleifera* grown in Mexico. *Journal of Chemistry*. 1: 1-10.
- Valdivié-Navarro, M., Martínez-Aguilar, Y., Mesa-Fleitas, O., Botello-León, A., Hurtado, C.B. y Velázquez-Martí, B. 2019. Review of *Moringa oleifera* as forage meal (leaves plus stems) intended for the feeding of non-ruminant animals. *Animal Feed Science and Technology*, 114338: 1-9.
- Varas, M. C. y Herrera M. S. 2019. Caracterización del período de crecimiento agroclimático del maíz (*Zea maíz*) en la provincia los Ríos. *Biotecnia*. 21(1): 54-59
- Zheng, Y., Zhang, Y. y Wu, J. 2016. Yield and quality of *Moringa oleifera* under different planting densities and cutting heights in southwest China. *Industrial Crops and Products*. 91: 88-96.