

Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura

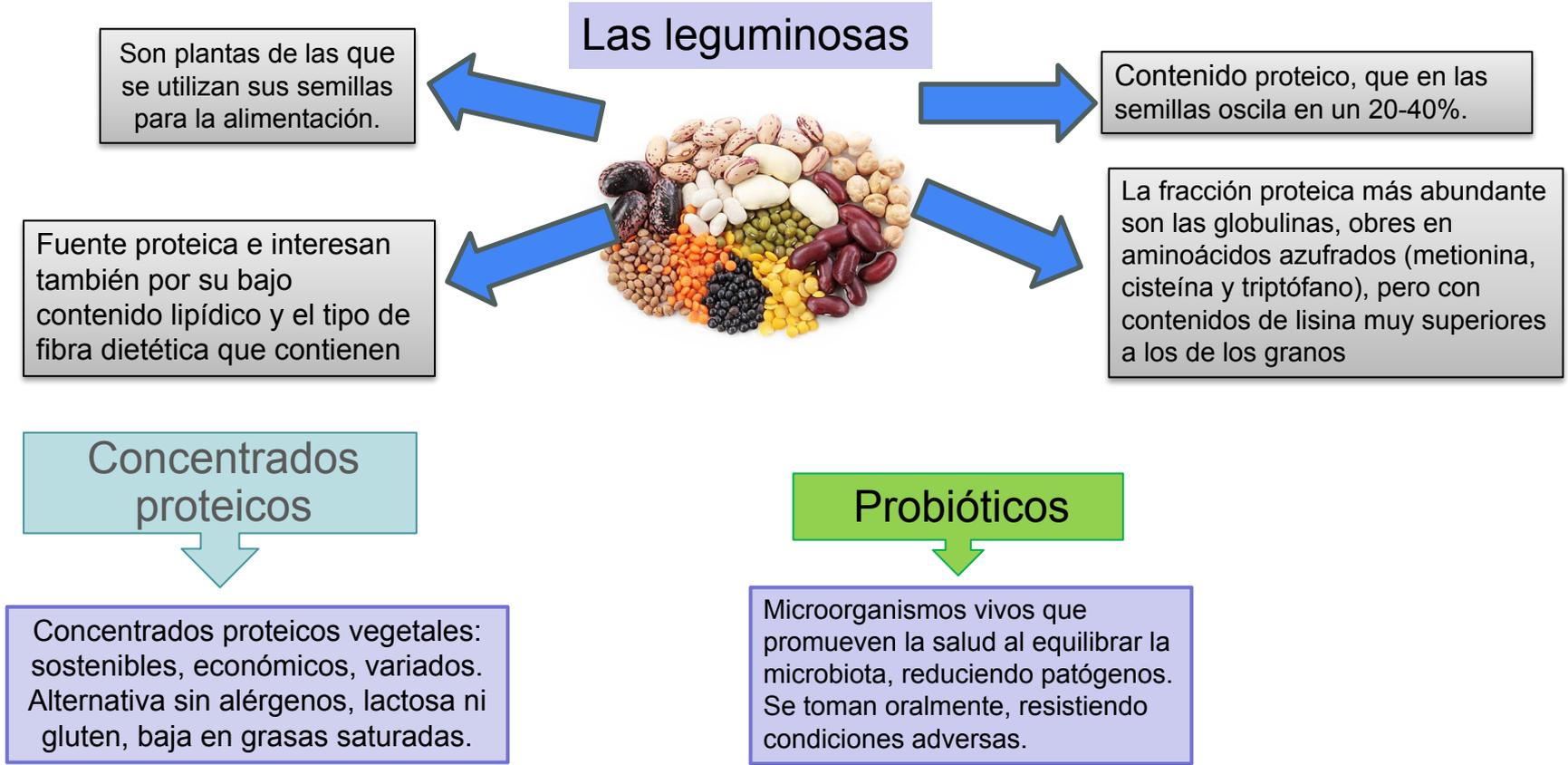
Trabajo de Integración Curricular, previo a la obtención del título de Ingeniería en Biotecnología.

Evaluación del proceso óptimo para la obtención de concentrados proteicos de distintas leguminosas mediante la incorporación de distintas bacterias ácidos lácticas como alimento probiótico.

Autor: Damaris Polethe Jimenez Chamba

Tutor: PhD. Sungey Naynee Sánchez Llaguno

Introducción



OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el proceso óptimo para la obtención de concentrados proteicos de distintas leguminosas, mediante la incorporación de bacterias ácido lácticas como alimento probiótico.

Objetivos específicos

Determinar el proceso óptimo para la obtención de concentrados proteicos a partir de soja amarilla y fréjol canario a escala de laboratorio.

Obtener concentrados proteicos de soja amarilla y fréjol canario mediante dos métodos de extracción: uso de agua ajustada al punto isoeléctrico de las proteínas y uso de solución hidroalcohólica.

Analizar la incorporación de distintas bacterias ácido-lácticas (*Limosilactobacillus reuteri* y *Lactiplantibacillus plantarum*) en los concentrados proteicos de soja amarilla y fréjol canario como alimento probiótico.

Evaluar las propiedades bioquímicas y microbiológicas de los concentrados proteicos.



HIPÓTESIS

Hipótesis Nula

Ho: Los dos tipos de **leguminosas** soja (*Glycine max*) y **frijol canario** (*Phaseolus vulgaris*) no influyen en los análisis bromatológicos del alimento probiótico.

Ho: Los métodos de extracción por **agua ajustada al punto isoeléctrico** y **solución hidroalcohólica** no influyen en los análisis bromatológicos del alimento probiótico.

Ho: Los dos tipos de bacterias ácido lácticas ***Limosilactobacillus reuteri*** y ***Lactiplantibacillus plantarum*** no influyen en los análisis bromatológicos del alimento probiótico.

Ho: La interacción entre **los tipos de leguminosas** y los **métodos** de extracción proteica no influyen en los análisis bromatológicos del alimento probiótico.

Ho: La interacción entre **los tipos de leguminosas** y la aplicación de bacterias **ácido lácticas** no influyen en los análisis bromatológicos del alimento probiótico.

Ho: La interacción entre los **métodos de extracción proteica** y la aplicación de **bacterias ácido lácticas** no influyen en los análisis bromatológicos del alimento probiótico.

Ho: La interacción entre los tipos de **leguminosas**, los **métodos** de extracción y la aplicación de **bacterias ácido lácticas** no influyen en los análisis bromatológicos del alimento probiótico.

Hipótesis Alternativa

Ho: Los dos tipos de **leguminosas** soja (*Glycine max*) y **frejol canario** (*Phaseolus vulgaris*) influyen en los análisis bromatológicos del alimento probiótico.

Ho: Los métodos de extracción por **ajuste de agua de punto isoeléctrico** y **solución hidroalcohólica** influyen en los análisis bromatológicos del alimento probiótico.

Ho: Los dos tipos de bacterias ácido lácticas ***Limosilactobacillus reuteri*** y ***Lactiplantibacillus plantarum*** influyen en los análisis bromatológicos del alimento probiótico.

Ho: La interacción entre **los tipos de leguminosas** y los **métodos** de extracción proteica influyen en los análisis bromatológicos del alimento probiótico.

Ho: La interacción entre **los tipos de leguminosas** y la aplicación de bacterias **ácido lácticas** influyen en los análisis bromatológicos del alimento probiótico.

Ho: La interacción entre los **métodos de extracción proteica** y la aplicación de **bacterias ácido lácticas** influyen en los análisis bromatológicos del alimento probiótico.

Ho: La interacción entre los tipos de **leguminosas**, los **métodos** de extracción y la aplicación de **bacterias ácido lácticas** influyen en los análisis bromatológicos del alimento probiótico.

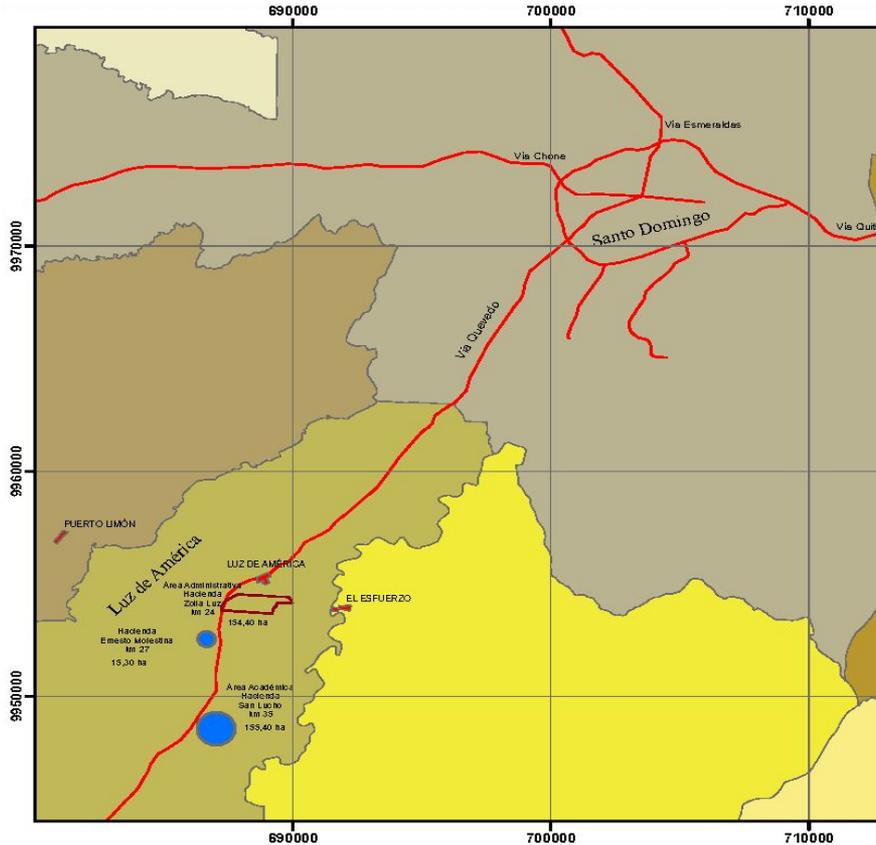


METODOLOGÍA

Ubicación del Área de Investigación

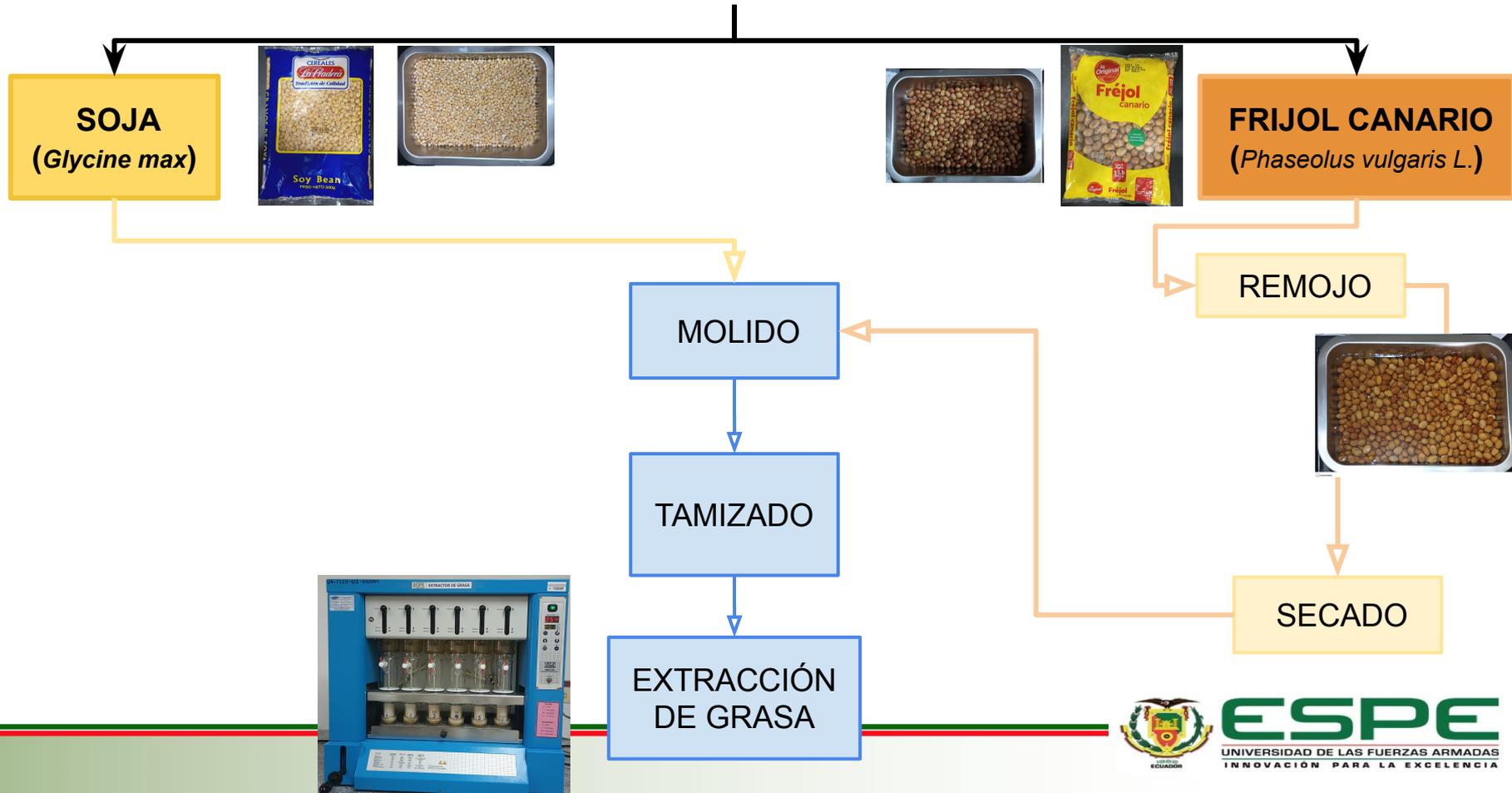
El trabajo de investigación se desarrolló en el Laboratorio de Bromatología y Bociencias del Campus IASA II de la Universidad de las Fuerzas Armadas “ESPE”,

Extensión Santo Domingo de los Tsáchilas, localizada en la Parroquia Luz de América, Hacienda Zoila Luz, vía Quevedo km. 24 margen izquierdo.



METODOLOGÍA

MUESTRAS VEGETALES

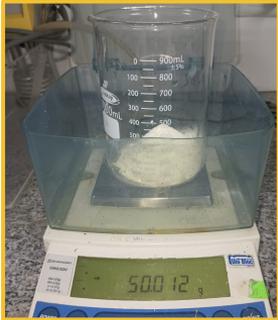


AJUSTE DE AGUA PUNTO ISOELÉCTRICO

Relación
harina/agua

Agitación

Centrifugar



pH:8
30 min



30 min
9000 rpm

AJUSTE DE AGUA PUNTO ISOELÉCTRICO



Precipitado

Relación
harina/agua
a



1:8 (p/v)



Agitación



pH:8
30 min

Centrifugar



30 min
9000 rpm

Sobrenadante 1

Sobrenadante 2



METODOLOGÍA

AJUSTE DE AGUA PUNTO ISOELÉCTRICO

SOJA

Sobrenadante 1

1

Sobrenadante 2

2

Agitación

Centrifugar

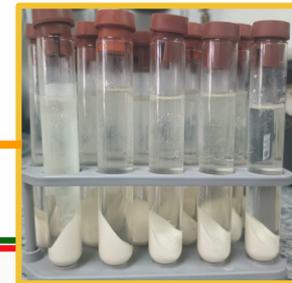
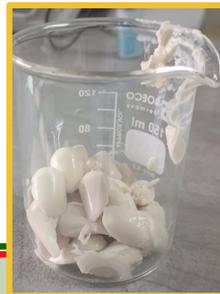


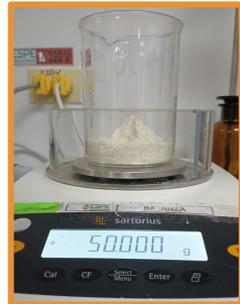
pH:4,5
30 min



30 min
9000 rpm

Pasta proteica





pH:8
30 min

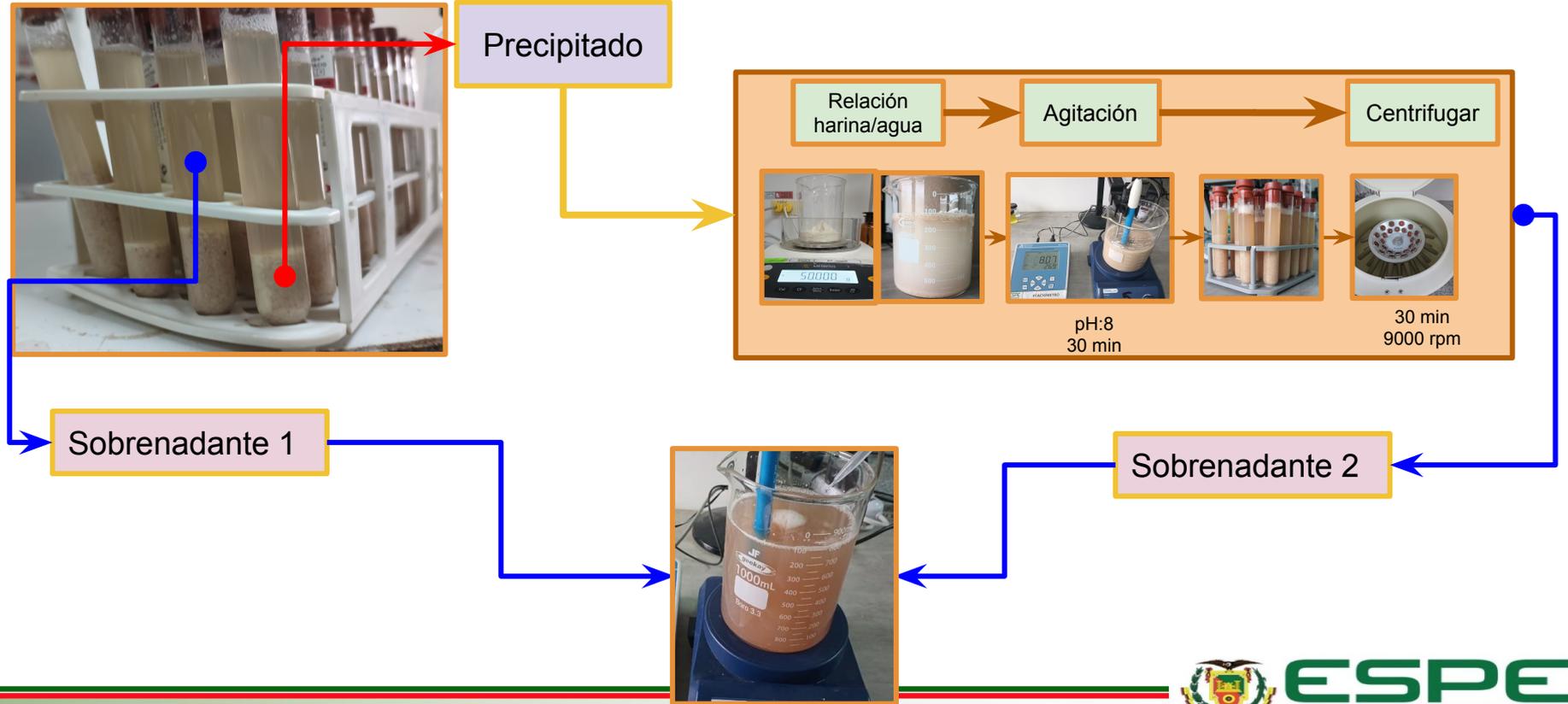


30 min
9000 rpm

METODOLOGÍA

AJUSTE DE AGUA PUNTO ISOELÉCTRICO

FRIJOL
CANARIO



METODOLOGÍA

AJUSTE DE AGUA PUNTO ISOELÉCTRICO

FRIJOL
CANARIO

Sobrenadante 1

Sobrenadante 2

Agitación

Centrifugar



pH:4,5
30 min



30 min
9000 rpm

Pasta
proteica



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

METODOLOGÍA

SOLUCION HIDROALCOHOLICA

Relación
harina/agua

Agitación

pH:4,5
1 hora

Centrifugar

20 min
9000 rpm

Pasta
proteica

FRIJOL CANARIO
(*Phaseolus vulgaris L.*)



SOJA
(*Glycine max*)



METODOLOGÍA

Preparación de los medio de cultivo.

Medio de cultivo



Autoclavar



Inocular



Estufa



Determinación de UFC/ml



*Lactiplantibacillus
plantarum*
1,47E+12



Determinación de UFC/ml



*Limosilactobacillus
reuteri*
1,47E+12

METODOLOGÍA

Liofilizado de los concentrados proteicos



Solución Bacteriana

Limosilactobacillus reuteri
1,47E+12



Soja+Ajuste del agua al punto isoelectrico

Soja+Solución hidroalcohólica

Frijol canario+Ajuste del agua al punto isoelectrico

Frijol canario+Solución hidroalcohólica



Solución Bacteriana

Lactiplantibacillus plantarum
1,47E+12



Soja+Ajuste del agua al punto isoelectrico

Soja+Solución hidroalcohólica

Frijol canario+Ajuste del agua al punto isoelectrico

Frijol canario+Solución hidroalcohólica



METODOLOGÍA

Análisis de las muestras

Proteína

NTE INEN 0519



Humedad

NTE INEN
518:1981



Ceniza

NTE INEN
520:2012



Acidez
titulable

NTE INEN
521:2013



pH

NTE INEN
526:2012



Microbiológico

Petrifilm™ para
Recuento de
Enterobacterias (EB)

Petrifilm™ para
Recuento de
Aerobios (RAC)

Petrifilm™ para
Recuento de
Coliformes (CC)



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

METODOLOGÍA

Factores y niveles a evaluar en el estudio de los métodos de obtención de concentrados proteicos a partir de leguminosas implementando bacterias ácido lácticas.

Factores de estudio	Simbología	Niveles
Factor A: Leguminosas	a0	Soja
	a1	Frijol canaria
Factor B: Métodos	b0	Punto Isoeléctrico
	b1	Solucion Hidroalcoholica
Factor C: Bacterias ácido lácticas	c0	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>
	c1	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>



METODOLOGÍA

Tratamientos a comparar en el estudio de los métodos de obtención de concentrados proteicos a partir de leguminosas implementando bacterias ácido lácticas.

Tratamientos	Simbología	Descripción
T1	a0 + b0 + c0	Soja + Punto isoeléctrico + <i>Limosilactobacillus reuteri</i>
T2	a0 + b0 + c1	Soja + Punto isoeléctrico + <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
T3	a0 + b1 + c0	Soja + Solución Hidroalcohólica + <i>Limosilactobacillus reuteri</i>
T4	a0 + b1 + c1	Soja+Solución hidroalcohólica+ <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
T5	a1 + b0 + c0	Frijol + Punto isoeléctrico + <i>Limosilactobacillus reuteri</i>
T6	a1 + b0 + c1	Frijol + Punto isoeléctrico + <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
T7	a1 + b1 + c0	Frijol + Solución hidroalcohólica + <i>Limosilactobacillus reuteri</i>
T8	a1 + b1 + c1	Frijol+Solución hidroalcohólica+ <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>



RESULTADOS

SOJA

FRIJOL CANARIO

Factor A: Leguminosas

Soja

Frijol

Proteína (%) 83,71A 72,16B

Humedad (%) 6,28A 6,28A

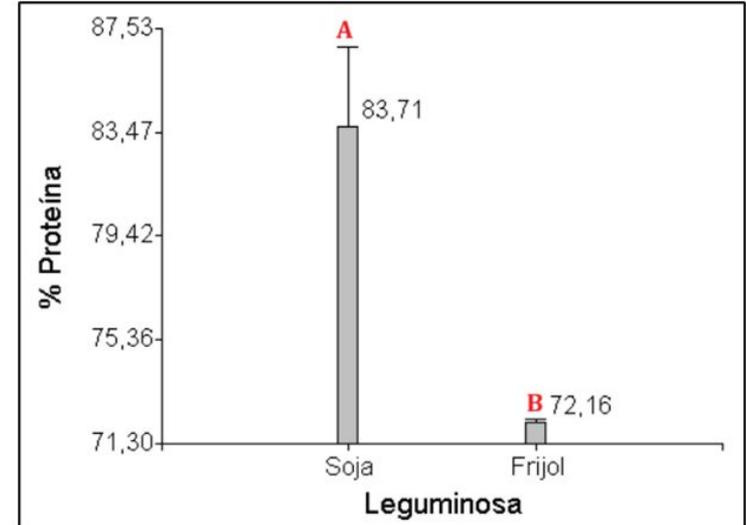
Cenizas (%) 3,38A 3,38A

Acidez titulable 0,41A 0,40A

(%)

pH 4,58A 4,57A

Factor A



Guamán J. et al., 2008; INIAP, 1994.

Nota. Nivel de significancia: $p < 0.05$.



RESULTADOS

**PUNTO
ISOELÉCTRICO**

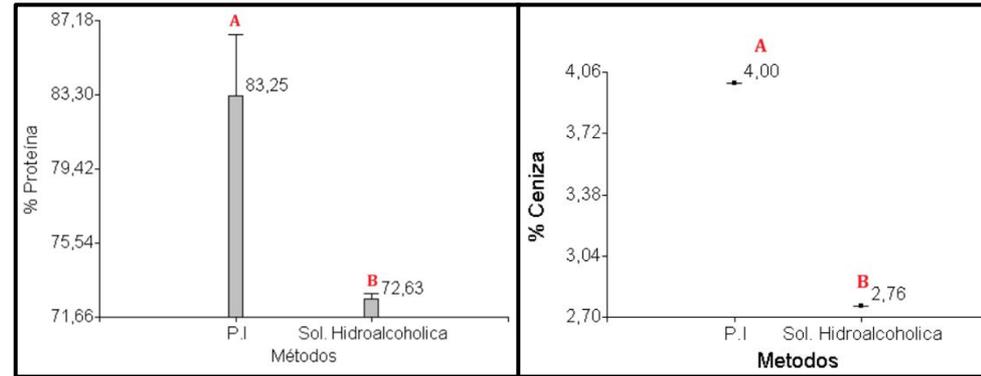
**SOLUCION
HIDROALCOHOLICA**

Factor B

Factor B: Métodos

	Agua Ajustada al Punto Isoeléctrico	Solución Hidroalcohólica
Proteína (%)	83,25A	72,63B
Humedad (%)	6,31A	6,25A
Cenizas (%)	4,00A	2,76B
Acidez titulable (%)	0,41A	0,40A
pH	4,58A	4,57A

Nota. Nivel de significancia: $p < 0.05$.



Jimenez, 2006, indica que se produce una extracción alcalina del polvo de leguminosa desangrada para luego ser sometida a precipitación en pH ácido, obteniendo un producto refinado.

Sustancias químicas básicas y ácidas es la presencia de residuos inorgánicos que quedaron después de la combustión de la materia orgánica indicado en el estudio de Márquez Siguas, 2014.



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

RESULTADOS

Limosilactobacillus reuteri

Lactiplantibacillus plantarum

Factor C: Bacterias ácido lácticas

L. reuteri *L. plantarum*

Proteína (%) 77,94A 77,94A

Humedad (%) 6,29A 6,27A

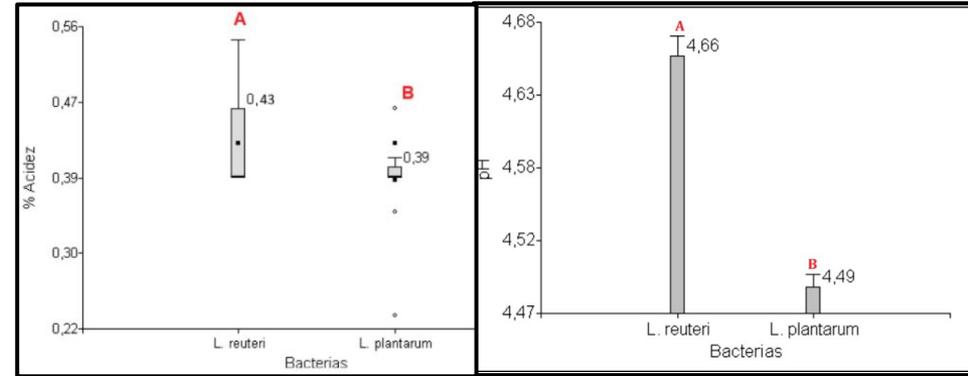
Cenizas (%) 3,38A 3,38A

Acidez titulable (%) 0,43A 0,39B

pH 4,66A 4,49B

Nota. Nivel de significancia: $p < 0.05$.

Factor C



Según Castro Crespo, 2020, las condiciones ácidas son importantes para la viabilidad y actividad de las bacterias probióticas, ya que ayudan a inhibir el crecimiento de bacterias no deseadas y a mantener la estabilidad del producto.

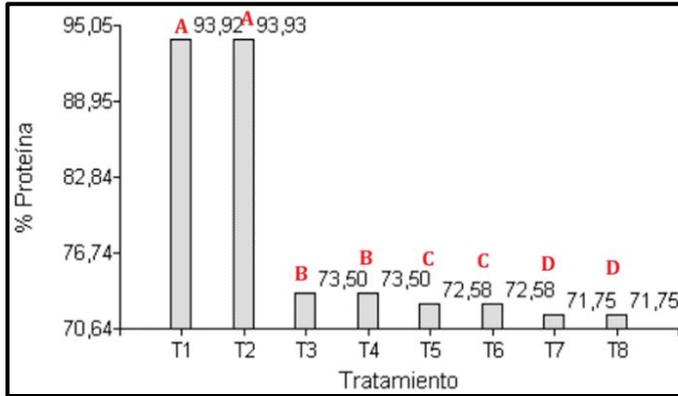
Indica que la capacidad de *L. reuteri* para crecer en un rango de pH más amplio (entre 5 y 7,5) podría contribuir a un aumento del pH en comparación con la bacteria *L. plantarum* más limitada en este aspecto. Estos resultados indican que ambos productos finales tienen un pH ácido, lo cual es típico de los productos fermentados con bacterias ácido lácticas, como *L. reuteri* y *L. plantarum*.



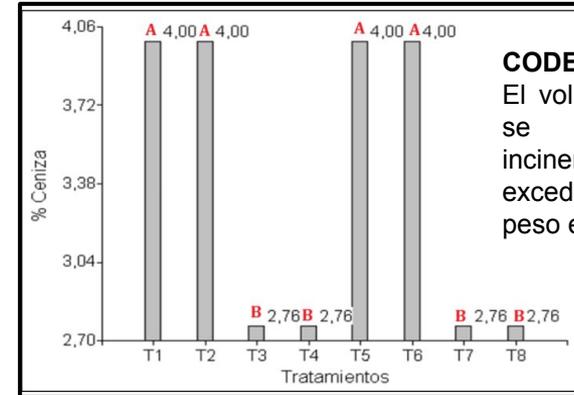
ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

RESULTADOS

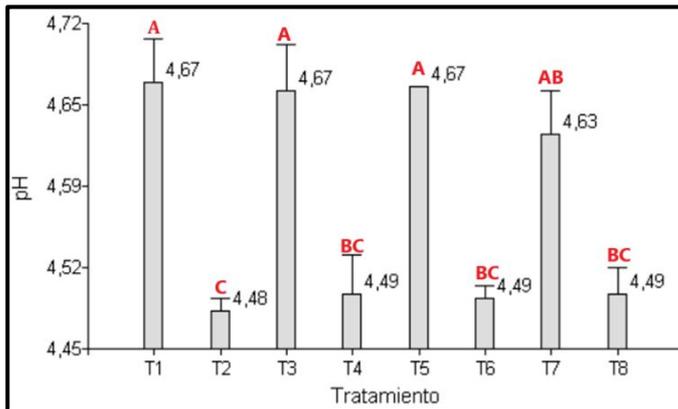
Interacción de los Factores ABC



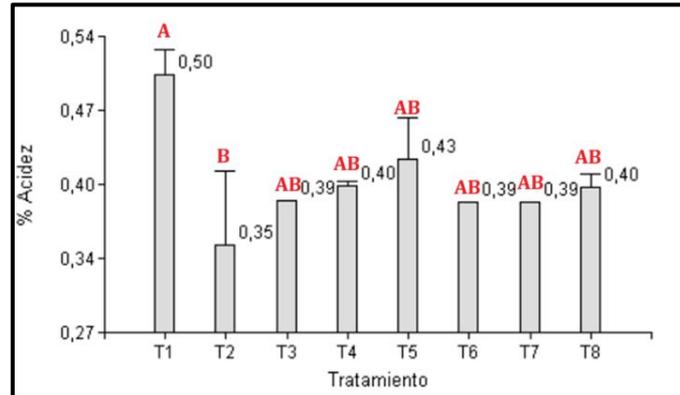
CODEX STAN 175-1989
(N 6,25) será:
– en HP, 50% o más, y menos del 65 por ciento
– en CP, 65% o más, y menos del 90 por ciento
– en AP, 90% o más



CODEX STAN 175-1989
El volumen de ceniza que se obtenga mediante incineración no deberá exceder del 8% referido al peso en seco.

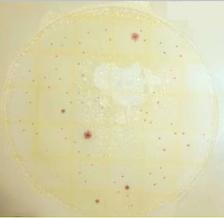


En relación a pH (4,48) y acidez titulable (0,35) son aceptados de acuerdo al estudio de Díaz, 2001 a las condiciones de un alimento probiótico.



RESULTADOS

Análisis microbiológico

Soja* Ajuste del Agua al Punto Isoeléctrico * <i>L. plantarum</i>		
Petrifilm™ para Recuento de Enterobacterias (EB)		AUSENTE
Petrifilm™ para Recuento de Aerobios (RAC)		1E+6
Petrifilm™ para Recuento de Coliformes (CC)		AUSENTE

El alimento debe contener un número igual o superior a 1×10^6 UFC/g de bacterias viables de origen probiótico en el producto final hasta el final de su vida útil (NTE INEN 1334-3, 2011).



CONCLUSIÓN

- En el contenido de proteína de la soja fue el que mejor resultados dio en el proceso de un producto proteico. Se concluye que el tipo de leguminosa influye en el concentrado proteico enriquecido con bacterias ácido lácticas como alimento probiótico.
- Los métodos de extracción por agua ajustada al punto isoelectrico presentó diferencias significativas en el contenido de proteína y cenizas en comparación con el método por solución hidroalcohólica. Se concluye que el tipo de método de extracción influye en el concentrado proteico enriquecido con bacterias ácido lácticas como alimento probiótico.
- Las bacterias ácido lácticas *L. reuteri* y *L. plantarum* para fines probióticos presentan un impacto en las características del producto final, como la acidez y el pH. Se concluye que los tipos de bacterias ácido lácticas influye en el concentrado proteico enriquecido con bacterias ácido lácticas como alimento probiótico.
- La interacción de los factores presentan diferencia significativa en variable proteína (%) en los tratamientos con soja y ajuste de agua al punto isoelectrico, tanto con *L. plantarum* como con *L. reuteri*, mostraron los mejores resultados. En cenizas (%) en los tratamientos de leguminosas con solución hidroalcohólica y ambas bacterias, presentó el menor contenido de cenizas. Se concluye que el tipo de leguminosa, los métodos de extracción y bacterias influyen en el concentrado proteico enriquecido con bacterias ácido lácticas como alimento probiótico.



RECOMENDACIONES

- Se recomienda utilizar la soja como material vegetal para la obtención de concentrados proteicos, ya que es una fuente rica en proteínas.
- El proceso de ajuste del agua al punto isoelectrico es recomendable para obtener concentrados proteicos con un alto contenido de proteínas y de calidad.
- Implantación de bacterias ácido lácticas con función probiótica en los alimentos para elevar su calidad nutricional y potencial beneficio para la salud.
- Incrementar variables evaluar las propiedades funcionales de los concentrados proteicos, como la capacidad de emulsificación, la capacidad de retención de agua y la capacidad espumante. Estas pruebas garantizan que los concentrados proteicos tengan un desempeño adecuado en aplicaciones alimentarias, lo que puede ser crucial para su aceptación en el mercado y su éxito como producto alimenticio funcional.

GRACIAS !



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA