

# Evaluación de la adición de germinados de alfalfa (*Medicago sativa*) al suero de leche para obtener una bebida biofortificada con zinc

Tipás Viteri, Rommel Sebastián

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera Agropecuaria

Trabajo de integración curricular, previo a la obtención del título de Ingeniero

Agropecuario

Ing. Vargas Arboleda, Martha Cecilia, Mgtr.

09 de septiembre del 2023





## Desnutrición

Deficiencia de micronutrientes afecta el crecimiento y desarrollo durante la infancia  
Romero et al. (2020)

Suplementación con zinc en neonatos, niños e infantes, Ministerio de Salud Pública del Ecuador (2018)

Plan intersectorial de alimentación y nutrición Ecuador 2018-2025

## Germinados biofortificados

Cultivos biofortificados con hierro, zinc y vitamina A, Perera & Noronha (2015)

Fortificación de germinados para mejorar el contenido de zinc y su biodisponibilidad en los alimentos, Salvatierra (2022)

## Suero de leche

Suero de leche como alternativa para desarrollar bebidas fortificadas

La eliminación inadecuada y el desconocimiento de sus beneficios impide el desarrollo de nuevos alimentos (Cisneros, 2022)

## **General**

Evaluar el efecto de la adición de germinados de alfalfa (*Medicago sativa*) al suero de leche para obtener una bebida biofortificada con zinc

## **Específico**

- Obtener el germinado de alfalfa biofortificado mediante impregnación de zinc (0  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 75  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$ ) en la semilla para su implementación biológica.
- Liofilizar y pulverizar los germinados para elaborar la bebida biofortificada.
- Determinar la vida útil del producto mediante pruebas de estantería y evolución organoléptica.
- Determinar la cantidad de zinc residual en el producto terminado.

## Biofortificación

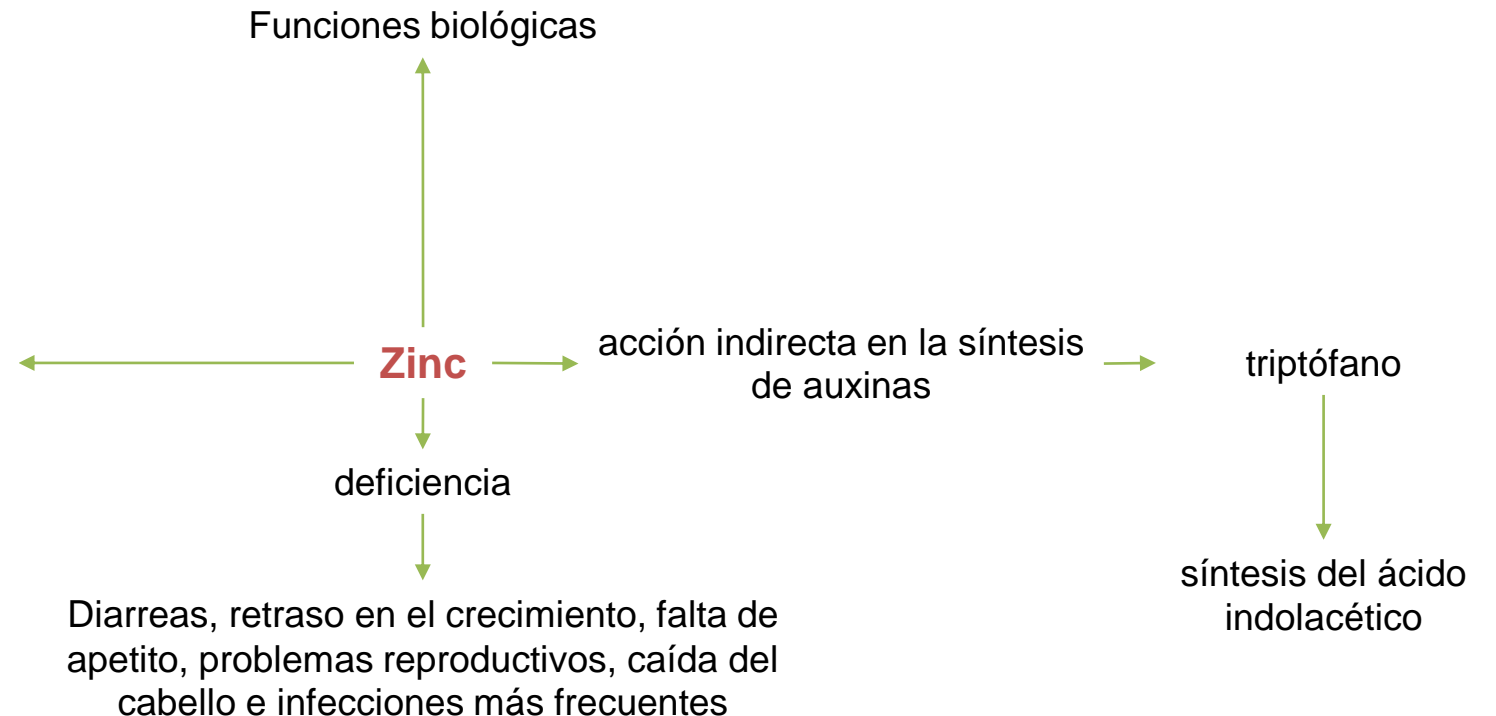
- Procesos convencionales
- Técnicas de ingeniería genética
- Prácticas agronómicas

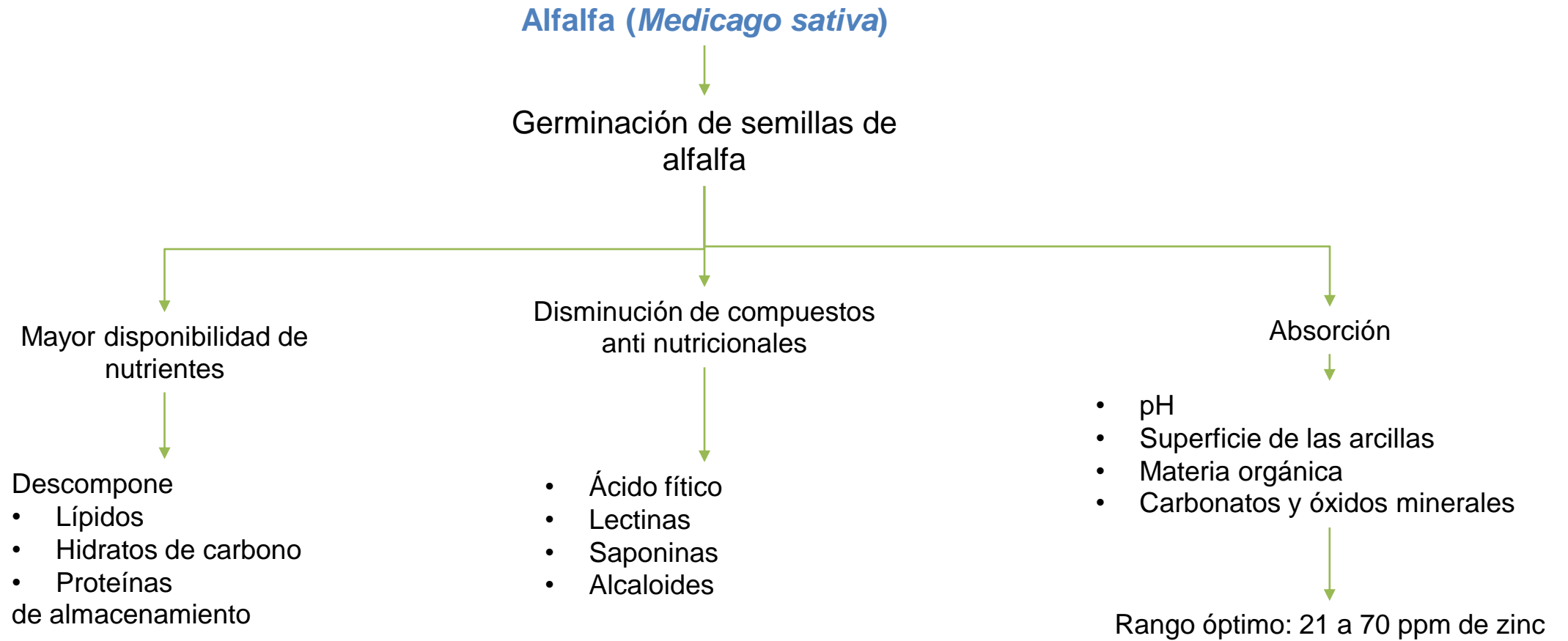
mejorar las características agronómicas

Cantidad diaria recomendada de zinc por edad

Etapa de vida	Cantidad recomendada
Del nacimiento hasta los 6 meses	2 mg
Bebés de 7 a 12 meses	3 mg
Niños de 1 a 3 años	3 mg
Niños de 4 a 8 años	5 mg
Niños de 9 a 13 años	8 mg
Adolescentes varones de 14 a 18 años	11 mg
Niñas adolescentes de 14 a 18 años	9 mg
Hombres adultos	11 mg
Mujeres adultas	8 mg
Adolescentes embarazadas	12 mg
Adultas embarazadas	11 mg
Adolescentes que amamantan	13 mg
Mujeres que amamantan	12 mg

*Nota.* Las cantidades recomendadas se encuentran en miligramos/día. Tomado de (Instituto Nacional de Salud, 2022).





## Suero de leche

Producto lácteo que se obtiene separando el cuajo de la leche

- Residuos de las industrias
- Suministro de recursos en la obtención de suplementos alimenticios
- Alta calidad nutricional y beneficios como suplemento nutricional
- Productos lácteos como bebidas fermentadas y quesos

- Valor nutricional,
- Emulsificante,
- Gelificante,
- Mejora propiedades organolépticas,
- Mejora consistencia y cohesividad

Composición del suero de quesería dulce y ácido

Ítem	Composición	
	Suero dulce	Suero ácido
pH	>6.7	<5.6
Sólidos totales	6.40	6.4
Agua	93.60	93.5
Grasa	0.05	0.04
Proteína	0.55	0.55
NNP	0.18	0.18
Lactosa	4.80	4.40
Cenizas (sales minerales)	0.50	0.80
Calcio	0.04	0.12
Sodio	0.05	0.05
Potasio	0.16	0.16
Ácido láctico	0.40	0.40

Nota. NNP: Nitrógeno no proteico. Tomado de (Reascos & Salazar, 2021)

## Fase germinados

Laboratorio de fisiología vegetal y principios activos



*Distribución aleatorizada del experimento durante la primera fase*

T2: 50 $\mu\text{M}$ Zn	T4: 100 $\mu\text{M}$ Zn	T0: 0 $\mu\text{M}$ Zn	T3: 75 $\mu\text{M}$ Zn	T0: 0 $\mu\text{M}$ Zn
T1: 25 $\mu\text{M}$ Zn	T3: 75 $\mu\text{M}$ Zn	T2: 50 $\mu\text{M}$ Zn	T4: 100 $\mu\text{M}$ Zn	T2: 50 $\mu\text{M}$ Zn
T0: 0 $\mu\text{M}$ Zn	T4: 100 $\mu\text{M}$ Zn	T0: 0 $\mu\text{M}$ Zn	T1: 25 $\mu\text{M}$ Zn	T3: 75 $\mu\text{M}$ Zn
T1: 25 $\mu\text{M}$ Zn	T2: 50 $\mu\text{M}$ Zn	T3: 75 $\mu\text{M}$ Zn	T1: 25 $\mu\text{M}$ Zn	T4: 100 $\mu\text{M}$ Zn

$$Y_{ij} = \mu + Z_i + E_{ij}$$

Análisis de la Varianza ( ANOVA )

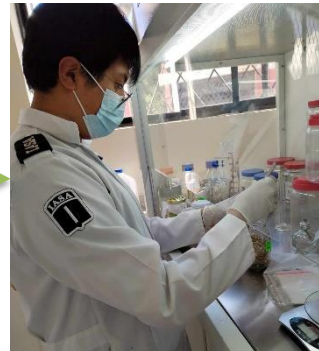
LSD de Fisher



500 gramos de semillas de alfalfa orgánica



Hipoclorito de sodio al 0.5% durante 7 minutos



Impregnación con 5 concentraciones de Zn

20 °C durante 7 días, total oscuridad



Ácido fítico. 2 g, 50 ml HCL 2%



Agitador incubador New Brunswick Scientific, 3 horas, 22 °C, 125 rpm

Filtración papel Whatman n1 2,5 ml tiocianato de amonio al 3% 27 ml de agua destilada.

Titulación con ácido férrico a 1.95 mg/ml.

$$\text{Fitato de fósforo} \left( \frac{\text{mg}}{100 \text{ g}} \right) = \text{Valor de titulación} \cdot 1.95$$

$$\text{Fitato} \left( \frac{\text{mg}}{100 \text{ g}} \right) = \text{Fitato de fósforo} \cdot 3.55$$



Porcentaje de germinación y desarrollo radicular



12 a 18 horas a -25 °C, Presión de vacío, humedad final al 3%,





## Fase bebida

Planta de procesamiento de alimentos



*Distribución aleatorizada del experimento durante la segunda fase*

T3		T4		T0		T1		T2	Bloque 1
T2		T0		T1		T3		T4	Bloque 2
T0		T3		T2		T4		T1	Bloque 3
T3		T1		T4		T0		T2	Boque 4

$$Y_{ij} = \mu + Z_i + D_j + E_{ij}$$

Análisis de la Varianza ( ANOVA )

Prueba no paramétrica de Friedman

## Ingredientes para la elaboración de una bebida biofortificada con zinc

Componentes	Cantidad
Suero de leche	40 ml
Pulpa de piña	26.7 ml
Liofilizado de germinados de alfalfa	2 g
Azúcar	6 g
Vainilla	0.05 ml

*Nota.* La tabla muestra las cantidades para preparar 70 ml de la bebida



0, 2, 7 y 21 días  
 •pH  
 •Sólidos solubles totales  
 •Separación de los componentes (sinéresis)



Evaluación de la apariencia, aroma, textura y sabor a los 2, 7 y 21 días



Deshidratación en estufa



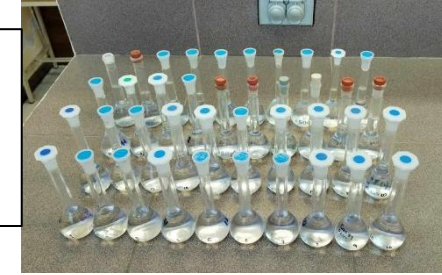
3 gramos, 600 °C, 4 horas

**Biodisponibilidad de Zinc**

$$AF: Zn = \frac{mol AF}{mol Zn}$$

## Zinc

10 ml de agua destilada y 2 ml ácido clorhídrico, ebullición



Filtración papel Whatman 50ml

HI 3854 Test Kit de Zinc HANNA Instruments



20 ml de la muestra + Reactivo zincona



Se añade cianuro para formar complejo con el zinc

Cyclohexanona para liberar Zn

580 nm

$$Zn \left( \frac{mg}{l} \right) = 174.82(Absorbancia)^{3.3075}$$

$$R^2 = 0.9999$$

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Medias  $\pm$  D.E. del porcentaje de germinación y longitud de radícula de semillas de alfalfa tratadas con diferentes concentraciones de zinc

Tratamiento	Germinación (%)	Longitud radícula (cm)
T0: 0 $\mu$ M Zn	95.50 $\pm$ 1.90 a	3.49 $\pm$ 1.07 a
T1: 25 $\mu$ M Zn	96.25 $\pm$ 0.87 a	4.63 $\pm$ 0.17 a b
T2: 50 $\mu$ M Zn	96.25 $\pm$ 0.91 a	5.71 $\pm$ 0.41 b c
T3: 75 $\mu$ M Zn	97.00 $\pm$ 1.85 a	6.98 $\pm$ 0.09 c
T4: 100 $\mu$ M Zn	95.75 $\pm$ 1.02 a	7.34 $\pm$ 0.91 c

Nota. Medias con una letra común no son significativamente diferentes (LSD Fisher;  $\alpha=0.05$ ).

Germinación 83.50% con 30 minutos en remojo; 20 °C; 10 días  
Ochoa (2019)

Germinación de 100% sin remojo previo, en cajas Petri con 5 ml de agua; 19 °C; 15 días  
Gonzales et al. (2011)

Longitud radicular de 3.99  $\pm$  0,65 a 40 ppm Zn; día 5  
Salvatierra (2022)

El ácido indol-3-acético interviene en la elongación, la división celular, la diferenciación de tejidos, las respuestas a la luz y gravedad.  
Vega et al. (2016)

Promedios  $\pm$  DE del contenido de zinc en bebidas con germinados liofilizados de alfalfa tratados con diferentes niveles de zinc

Tratamiento	Zinc residual (mg/l)
T0: 0 $\mu$ M Zn	0.56 $\pm$ 0.11 a
T1: 25 $\mu$ M Zn	0.61 $\pm$ 0.07 a
T2: 50 $\mu$ M Zn	0.95 $\pm$ 0.18 a
T3: 75 $\mu$ M Zn	2.45 $\pm$ 0.47 b
T4: 100 $\mu$ M Zn	2.52 $\pm$ 0.11 b

Nota. Medias con una letra común no son significativamente diferentes (LSD Fisher;  $\alpha=0.05$ ).

Alimento fortificado al menos 20% del valor diario recomendado  
Norma INEN 1334-2-2:2011

Contenido de zinc en 240 ml = 0.6 mg Zn

Niños de 1 a 3 años necesitan 3 mg Zn/día  
NIH (2022)

Resultados del cálculo de la relación molar AF:Zn en germinado liofilizados de alfalfa, tratados con diferentes niveles de zinc

Tratamiento	Fitato (mg/100g)	Zinc (mg/L)	mM AF	mM Zn	Relación AF:Zn	Biodisponibilidad de Zn
T0: 0 $\mu$ M Zn	2.769	0.560	0.055	0.009	6.331	30%
T1: 25 $\mu$ M Zn	2.077	0.610	0.041	0.009	4.359	>50%
T2: 50 $\mu$ M Zn	2.077	0.950	0.041	0.015	2.799	>50%
T3: 75 $\mu$ M Zn	2.769	2.450	0.055	0.038	1.447	>50%
T4: 100 $\mu$ M Zn	1.385	2.520	0.027	0.039	0.703	>50%

Zinc al 0, 10, 20, 30 y 40 ppm obtuvieron biodisponibilidad >50% en germinados

Salvatierra (2022)

La disponibilidad de absorción de los fortificantes de zinc varía cuando son añadidos a diferentes alimentos

Ruel (2007)

Medias  $\pm$  DE de los grados Brix y pH de bebidas con germinados liofilizados de alfalfa tratados con diferentes niveles de zinc

Tratamiento	Grados Brix	pH
T0: 0 $\mu$ M Zn	19.53 $\pm$ 1.14 a	5.35 $\pm$ 0.35 a
T1: 25 $\mu$ M Zn	18.53 $\pm$ 1.01 a	5.26 $\pm$ 0.34 a
T2: 50 $\mu$ M Zn	19.25 $\pm$ 2.14 a	5.24 $\pm$ 0.34 a
T3: 75 $\mu$ M Zn	19.53 $\pm$ 0.71 a	5.30 $\pm$ 0.31 a
T4: 100 $\mu$ M Zn	18.68 $\pm$ 0.54 a	5.21 $\pm$ 0.31 a

Los grados Brix es inversamente proporcional a la acidez del producto

Morales (2016)

38 grados Brix y pH entre 4.5 y 4.7 genera mayor aceptación por parte del consumidor

Morales (2016)

Conforme aumenta el dulzor y disminuye el pH, la aceptabilidad crece, y la percepción de sabores extraños disminuye

Quimbita & Rodríguez (2008)

Nota. Medias con una letra común no son significativamente diferentes (LSD Fisher;  $\alpha=0.05$ ).

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Medias de separación de las bebidas con germinados de alfalfa tratados con diferentes niveles

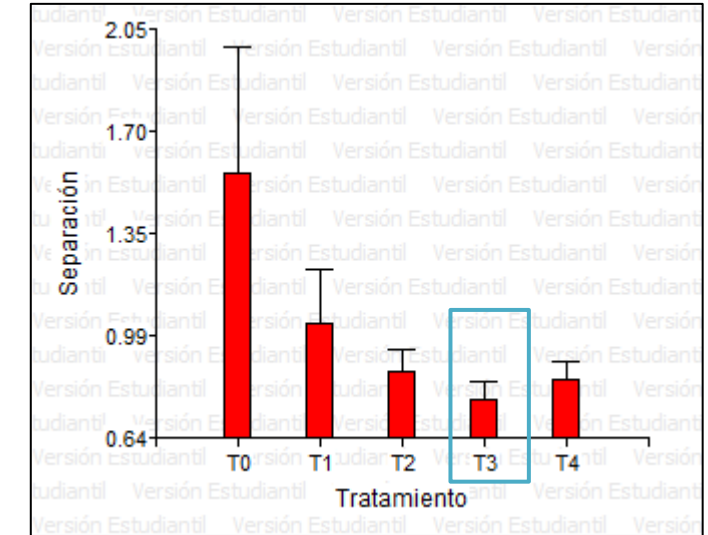
de zinc

$\mu\text{M Zn}$	Suma (Ranks)	Media (Ranks)
75	3.00	1.00 a
100	7.50	2.50 b
50	8.00	2.67 b c
25	11.50	3.83 d
0	15.00	5.00 e

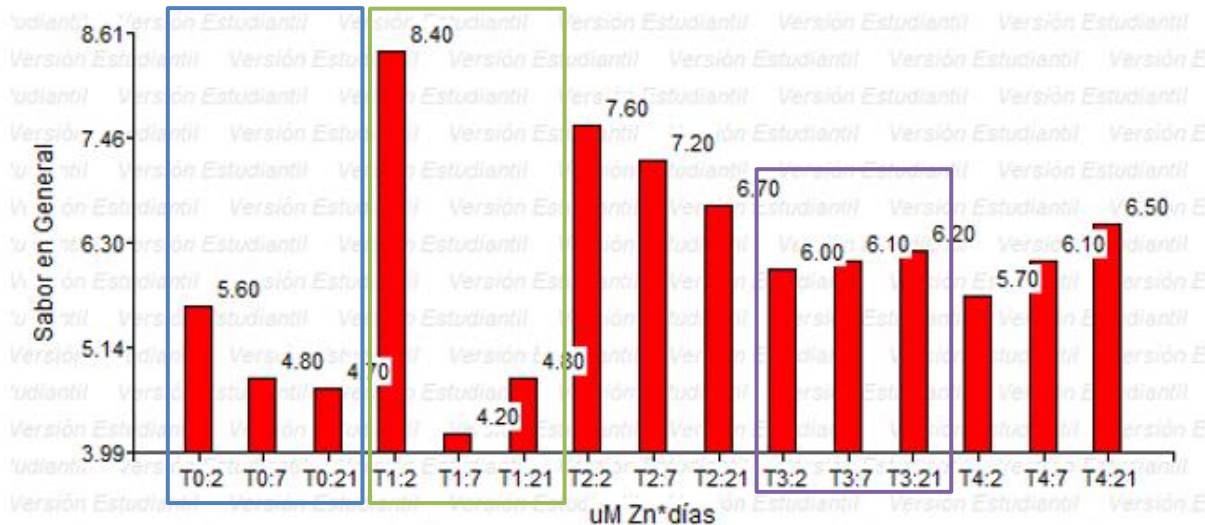
Nota. Medias con una letra común no son significativamente diferentes (Friedman;  $p < 0.05$ ).

Yogures fortificados con Zn 50M, obtuvo menor sinéresis en comparación al testigo Santillán & Vélez (2019)

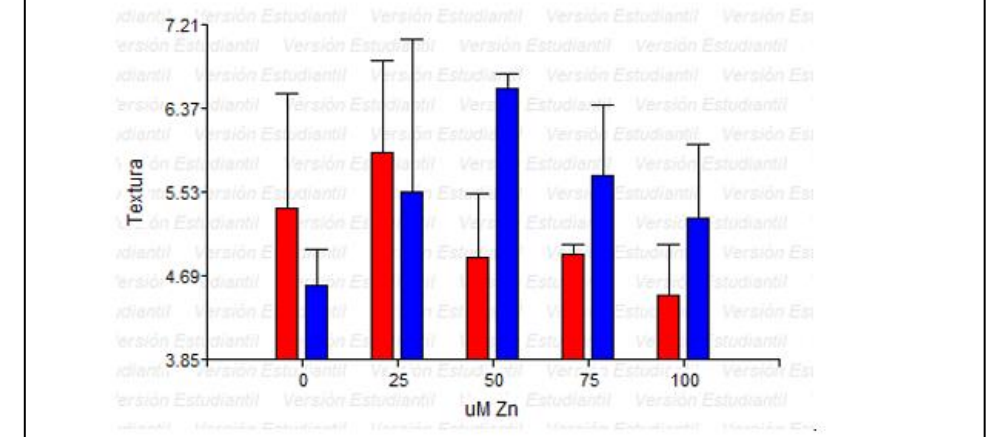
Defectos de calidad como: textura granulosa, sinéresis y consistencia variable, causan bajo consumo de bebidas con suero de leche. Acevedo et al. (2010)



Sabor en general de las bebidas al día 2, 7 y 21

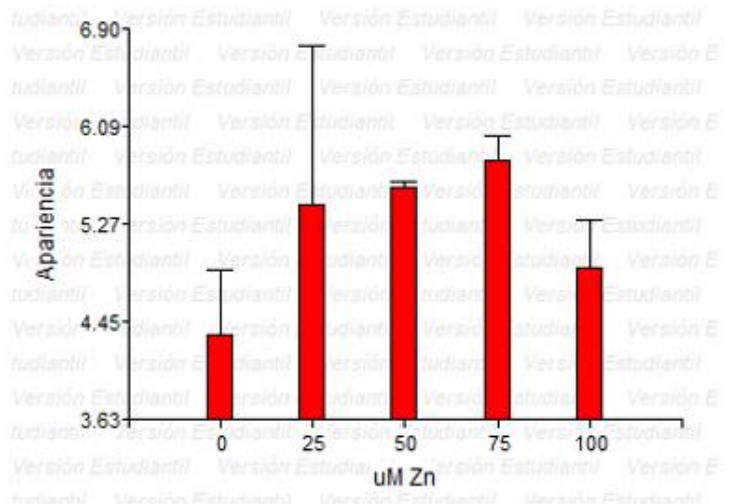


Grumosidad (rojo) y textura general (azul) de la bebida, evaluada a los 2, 7 y 21 días

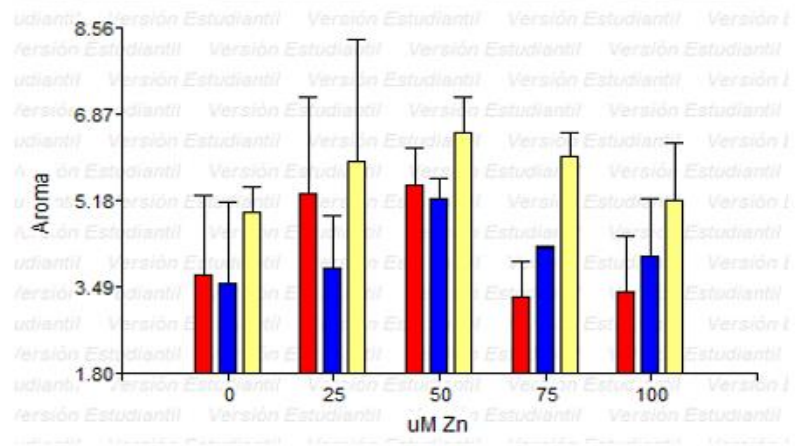


# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

*Apariencia promedio de las bebidas evaluadas a los 2, 7 y 21 días*

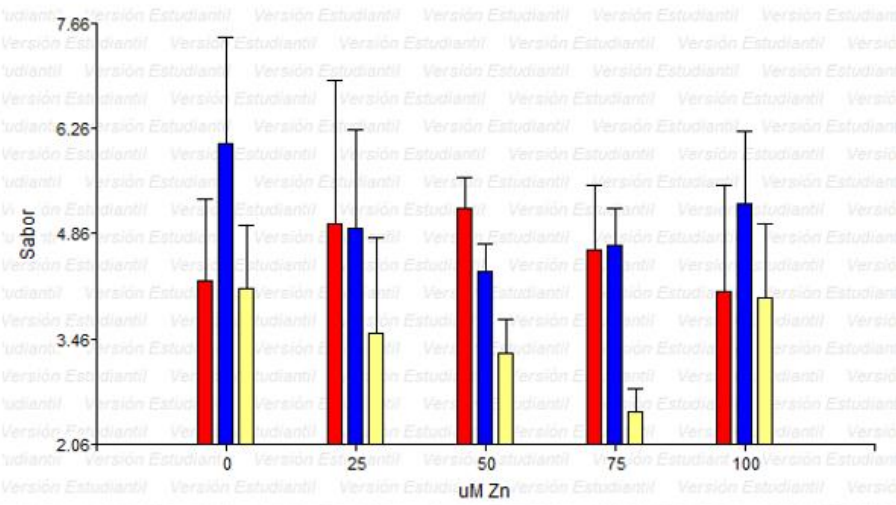


*Aroma general (amarillo), aroma a piña (rojo) y aroma a vainilla (azul) de la bebida, evaluada a los 2, 7 y 21 días*

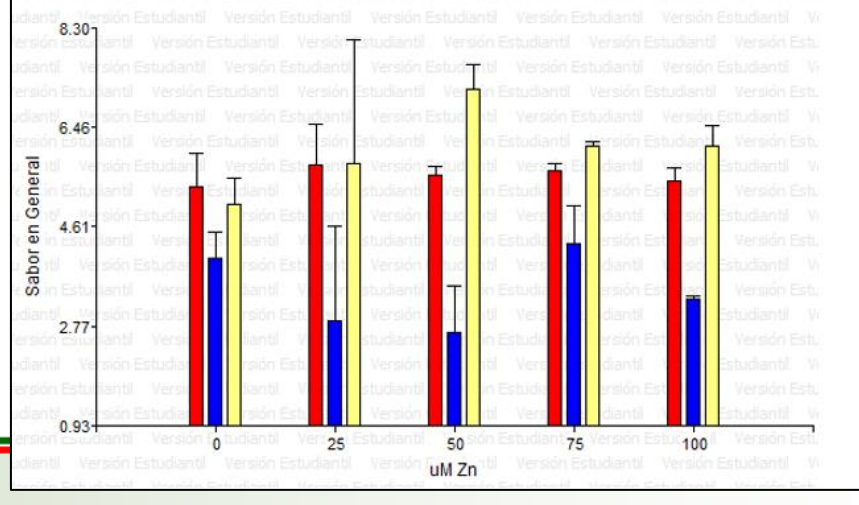


Diferencias organolépticas al cambiar el porcentaje de goma xantana utilizada, que permite texturizar y espesar los líquidos.  
Morales (2016)

*Sabor a piña (rojo), sabor a germinados (azul) y sabor a suero de leche (amarillo) promedio de la bebida, evaluada a los 2, 7 y 21 días*



*Nivel de azúcar (rojo), amargor (azul) y sabor en general (amarillo) evaluada a los 2, 7 y 21 días*



- Se obtuvo germinados de alfalfa fortificados con zinc, las semillas tratadas con 75 y 100  $\mu\text{M}$  de zinc obtuvieron mayor desarrollo de radícula debido a la síntesis de la auxina ácido indolacético, por la presencia del zinc.
- Se liofilizó y pulverizó a los germinados fortificados obtenidos para no perder las propiedades nutricionales ni organolépticas, para su implementación en la bebida
- Las pruebas de estantería determinaron una sinéresis menor de las bebidas realizadas con germinados tratados con 75  $\mu\text{M}$  de zinc. También se observó que las bebidas con el tratamiento 0 y 25  $\mu\text{M}$  de zinc, a partir del día 7 ya no resultaban agradables. En contra parte la bebida con mayor aceptación del sabor en general fue T2.
- La bebida que presentó mayor cantidad de zinc residual fueron las bebidas que utilizaron germinados tratados con 75 y 100  $\mu\text{M}$  de zinc, teniendo una cantidad de  $2.45 \pm 0.47$  y  $2.52 \pm 0.11$  mg/L de zinc, respectivamente. Se determinó la relación ácido fítico: zinc, donde se obtuvo una biodisponibilidad mayor al 50% para los tratamientos con 25, 50, 75 y 100  $\mu\text{M}$  Zn
- Al añadir germinados impregnados con 75 y 100  $\mu\text{M}$  de zinc al suero de leche, se obtuvo una bebida biofortificada con una cantidad de 2.45 y 2.52 mg/L de zinc, respectivamente, se obtuvo una disponibilidad mayor al 50% en ambos tratamientos, menor sinéresis para el tratamiento con 75  $\mu\text{M}$  Zn y una aceptabilidad media del producto final

- Promover el consumo de la bebida de piña a base de suero de leche y germinados liofilizados de alfalfa con una impregnación de zinc de 75  $\mu\text{M}$ , ya que fue la bebida que obtuvo mayor contenido de zinc residual, menor sinéresis, fue una bebida con evaluación organoléptica constante y una buena una biodisponibilidad de zinc.
- Para obtener un análisis de la biofortificación completa, se recomienda realizar estudios que complementen este, midiendo el grado de absorción de zinc en personas que consumen la bebida.
- Continuar con las pruebas de estantería para poder determinar la vida útil real del producto
- Añadir componentes que ayuden a la cohesividad de la bebida, con el fin de mejorar la consistencia y esta sea más agradable.





Ingeniera Martha Vargas

Ingeniero Pablo Landázuri

Ingeniero Gabriel Larrea

Señora Verónica Pachacama

Familia

Amigos