



Vol. 55, No. 1 – enero - abril - 2021

Utilización de variables cuantitativas para evaluar la resistencia a la enfermedad roya parda, de la caña de azúcar

Use of quantitative variables in the evaluation of resistance to sugarcane brown rust disease

Joaquín Montalván-Delgado, Isabel Alfonso-Terry, Eida Rodríguez-Lema, Ivía Pouza Sierra, Yoslen Fernández-Gálvez, Isabel Torres-Varela y Eloy Valdés-González

Interacción genotipo x ambiente en caña de azúcar, en diferentes momentos de cosecha

The genotype x environment interaction in different moment crops in sugarcane

Héctor Jorge-Suárez, Alberto N. González-Marrero, Irenaldo Delgado-Mora, Rolando Bodaños-Estrada, Oscar Suárez-Benítez, Adrián Céspedes-Zayas, José R. Gómez-Pérez, Félix R. Díaz-Mujica, Yaquelín Puchades-Izaguirre y Reynaldo Rodríguez-Gross

Análisis de riesgos e impacto ambiental en el manejo y almacenamiento de biomasa cañera en bioeléctricas

Risk analysis and environmental impact on handling and storage of sugarcane biomass in bioelectric plants

Juan Fernández-Rodríguez y José Alberto Pérez-Hernández

Producción de carotenoides a partir de *Rhodotorula*: una revisión

Carotenoid Production by *Rhodotorula*: A Review

Nayra Ochoa-Viñals y Evelyn Faife-Pérez

Influencia del tamaño de partícula y tiempo de agitación en la producción de un extracto a partir de la cutícula de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*)

Influence of particle size and agitation time on the production of an extract from the sugar cane cuticle (*Saccharum officinarum*)

Julio Amilcar Pineda-Insuasti, Jairo Viracocha-Cacuango y Julio Andrade-Colahuazo

Comportamiento de las variables ambientales y evaluación del impacto ambiental en la producción de la Furvina

Behavior of environmental variables and evaluation of environmental impact in the production of Furvina

María Isabel Díaz-Molina, Lidia Osmaida-Sánchez, Yulexy Rodríguez-Montesino, Zenaida Rodríguez-Negrín, Rosayda Báez-Montesino, Amalia Calvo-Alonso e Isleidy de la Caridad Ruíz-Pérez

Effect of growth regulators Albite and Lebame with phytolamp in the synthesis of yacon active compounds

Efecto de los reguladores de crecimiento Albite y Lebame con fitolámparas para la síntesis de compuestos activos en yacon

Yarelys Herrera-Díaz and Elena V. Romanova

Estudio preliminar de producción de enzima dextranasacarasa recombinante Dsr-F- Δ SP- Δ GBD en cultivo discontinuo

Preliminary study of recombinant dextranase enzyme production Dsr-F- Δ SP- Δ GBD in batch culture

Keyla Tortoló-Cabañas, Catherine Sain-Hubert, Elisabeth Bodo, Ruben Werquin, Benoit Moreau, Amanda Montes-Álvarez y Reinaldo Fraga-Vidal

Determinación de alcoholes superiores por cromatografía de gases en destilados

Determination of higher alcohols by gas chromatography in distillates

Dacelis Borroto-Mato, Magdalena Lorenzo-Izquierdo, Roxana García-Gutiérrez y Nancy Herrera-Marrero

Evaluación de la efectividad de diferentes métodos de conservación para las cepas de *Rhizobium* sp 3 y *Lactobacillus rhamnosus* LB/103-1-5

Effectiveness evaluation of different conservation methods of *Rhizobium* sp 3 and *Lactobacillus rhamnosus* LB / 103-1-5 strains

Marlyn Pérez-Rodríguez, Yanely Díaz-Pérez, Natividad Oliva-Llanes, Direilis Díaz-García, Eulalia Gómez-Santiesteban, Ana Nelis San Juan-Rodríguez, Vivian León-Fernández y Daisy Dopico-Ramírez

Implementación del sistema medioambiental por la norma 14001:2015, integrado al Sistema Calidad-Inocuidad en Bodegas Vigía

Implementation of the environmental system by standard 14001: 2015, integrated to the quality-safety system in Bodegas Vigía

Maricela Vega-Batista, Idania Blanco-Carvajal, Eric Estrada-Medina, Carlos Molina-Maqueira, Arlyn Reyes Linares y Dayamí Hernández-Salcedo

Utilización de variables cuantitativas para evaluar la resistencia a la enfermedad roya parda, de la caña de azúcar

Joaquín Montalván-Delgado*, Isabel Alfonso-Terry, Eida Rodríguez-Lema, Ivía Pouza Sierra, Yoslén Fernández-Gálvez, Isabel Torres-Varela y Eloy Valdés-González
Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA). Carretera CUJAE, km 1½, Boyeros, La Habana, Cuba.

*jmontalvan@eticacm.azcuba.cu

RESUMEN

Con la finalidad de analizar el comportamiento ante la roya parda (*Puccinia melanocephala* Sydow and P. Sydow), en áreas de la Estación Territorial de Investigaciones de la Caña de Azúcar (ETICA), Centro Oriental, se llevó a cabo un experimento con los cultivares de caña de azúcar C1051-73, C132-81, C266-70, C323-68, C86-12, C86-503, C86-56, C88-380, C90-530, Co997, SP70-1284 y los patrones de reacción conocida, PR980 (grado I), Ja64-11 (grado II), C334-64 (grado III), My5514 y Ja60-5 (grado IV) y B4362 (grado V). Las evaluaciones se realizaron en las cepas de planta y primer retoño a las edades de tres, cuatro, cinco, seis y nueve meses en las hojas +1, +3 y +5. Los parámetros evaluados fueron: largo y número de pústulas, tamaño de la pústula mayor, y área ocupada por pústulas. A los datos obtenidos se les realizaron análisis de varianzas y la prueba de Tukey para detectar las diferencias entre los cultivares. Se utilizó el paquete estadístico SPSS, así como las interacciones principales aditivas y multiplicativas (Modelos AMMI). Existen diferencias en todos los factores analizados (cultivar, hoja y momento de evaluación) y en las variables analizadas (tamaño de pústula mayor y área ocupada por pústula). Los patrones de resistencia mantuvieron el comportamiento esperado y el mayor porcentaje de cultivares se comportó como resistente.

Palabras clave: AMMI, cultivares, enfermedades, *Puccinia melanocephala*, pústulas.

ABSTRACT

With the purpose to analyze the behavior of a group of sugarcane cultivars in the presence of brown rust (*Puccinia melanocephala* Sydow and P. Sydow) in the area of the Territorial Sugarcane Research Station Oriental Center Camagüey, it was carried out an experiment with the sugarcane cultivars C1051-73, C132-81, C266-70, C323-68, C86-12, C86-503, C86-56, C88-380, C90-530, Co997, SP70-1284 and the patterns of well-known reaction PR980 (I grade), Ja64-11 (II grade), C334-64 (III grade), My5514 y Ja60-5 (IV grade) y B4362 (V grade). The evaluations were made at the plant and ratoon shoot at the ages of three, four, five, six and nine months in the leaves +1, +3 y +5. The evaluated parameters were: length and the number of pustules, size of the biggest pustule, and the occupied area by pustules. It was made an analysis of variance and Tukey's test to find the differences between the cultivars. The statistical packet SPSS such as the main additive and multiplicative interactions (AMMI Models) were used. There are differences in every analyzed factors (cultivar, leaf and evaluation moment) and in the analyzed variables (TPM and occupied area by pustule). The resistance patterns kept the expected behavior and the biggest cultivars percentage behaved like resistant.

Key words: AMMI, cultivars, diseases, *Puccinia melanocephala*, pustules.

INTRODUCCIÓN

La roya de la caña de azúcar, producida por el hongo *Puccinia melanocephala* Sydow and P. Sydow, es una de las enfermedades de mayor importancia que afecta a este cultivo, según Chinea *et al.* (1). El ambiente donde se desarrolla el cultivo de la caña de azúcar está constituido por numerosos factores y su combinación contribuye a la formación de diferentes condiciones de desarrollo y producción, lo que determina el comportamiento específico de los cultivares. Asimismo, las enfermedades están fuertemente determinadas en su desarrollo y distribución, por las variaciones edafoclimáticas locales, apunta Xavier *et al.* (2).

A mediados de la década del 2000 se informaron ataques intensos de la enfermedad en diferentes provincias del país con sintomatología atípica. Por ello, se hace necesario intensificar la vigilancia y tener en cuenta que, nacionalmente, aún se plantan cultivares susceptibles. Por estas razones nos propusimos los objetivos de evaluar y comparar la reacción de un grupo de cultivares de caña de azúcar y de los patrones de resistencia a roya parda en las condiciones de Camagüey, mediante el uso de variables cuantitativas y poner en funcionamiento un sistema que permita una evaluación eficiente de la enfermedad en el Esquema de Obtención de Variedades, utilizando los modelos de interacciones principales aditivas y multiplicativas (AMMI, por sus siglas en inglés) en la clasificación de genotipos y definir los momentos óptimos de evaluación.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en áreas de la ETICA, de Camagüey, sobre un suelo pardo con carbonatos. Los cultivares estudiados fueron: C1051-73, C132-81, C266-70, C323-68, C86-12, C86-503, C86-56, C88-380, C90-530, Co997 y SP70-1284. Se utilizaron, además, los patrones PR980 (AR), Ja64-11 (R), C334-64 (MR), My5514 y Ja60-5 (S) y B4362 (AS).

Se empleó un diseño de bloques al azar, con tres réplicas. Las evaluaciones se realizaron a los tres, cuatro, cinco, seis y nueve meses de edad, en las cepas caña planta y primer retoño, en las hojas +1, +3 y +5. Se analizaron 2 cm² del tercio central de cada hoja (Tamayo *et al.* (3), se tuvo en cuenta la cantidad de pústulas (CPUST), el largo de la pústula más frecuente (LPUST), el tamaño de la pústula mayor (TPM) y el porcentaje del área ocupada por pústulas (PAPUST). Para el procesamiento estadístico se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 10 y los modelos AMMI del tabulador de datos EXCEL. Se realizaron análisis de varianza factoriales para detectar las diferencias entre los distintos factores de variación y, con posterioridad, la prueba de Tukey, para la formación de los grupos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de la dócima de Tukey reportan la formación de grupos en los parámetros TPM y porcentaje de área ocupada por pústulas (cm²) en planta y primer retoño (tabla 1). El cultivar B4362 alcanzó el mayor tamaño de pústulas, en correspondencia con su nivel de susceptibilidad, y se diferenció significativamente del resto en ambas cepas. Los cultivares que presentaron menores tamaños de pústulas y que son catalogados como más resistentes corresponden a C132-81, Co997, C266-70 y C1051-73. Los genotipos C90-530, C86-56, SP70-1284 y C86-503 se encuentran en un grupo intermedio, mientras que C86-12 formó un grupo independiente. Resultados similares han sido obtenidos por otros autores como (Tamayo *et al.* (4), quienes encontraron la formación de grupos similares.

Tabla 1. Comparación de las medias aportadas por los genotipos para el parámetro TPM y el porcentaje de área ocupada por pústulas

	Planta		Retoño			Planta		Retoño	
	TPM	Porcentaje de área con pústulas	TPM	Porcentaje de área con pústulas		TPM	Porcentaje de área con pústulas	TPM	Porcentaje de área con pústulas
C90-530	0.05 ab	0.016 a	0.000 a	0.000 a	C86-503	0.22 ab	0.130 a	0.818 d	0.470 a
C132-81	0.00 a	0.000 a	0.010 a	0.003 a	C88-380	1.20 c	0.920 bc	0.900 d	0.440 a
Co997	0.00 a	0.000 a	0.040 a	0.012 a	Ja60-5	1.72 d	1.610 d	1.540 e	1.510 a
PR980	0.00 a	0.000 a	0.050 a	0.020 a	C334-64	1.25 c	1.130 c	2.000 f	2.050 bc
C266-70	0.00 a	0.000 a	0.120 ab	0.050 a	C323-68	1.27 c	0.610 b	2.440 g	2.220 c
Ja64-11	0.07 ab	0.002 a	0.170 ab	0.050 a	My5514	2.20 e	1.260 cd	2.650 g	1.83 bc
C86-56	0.06 ab	0.020 a	0.220 ab	0.090 a	B4362	5.26 f	4.560 e	5.510 h	8.11 d
C1051-73	0.00 a	0.000 a	0.43 bc	0.450 a	Sx	0.24	0.33	0.25	0.45
SP70-1284	0.15 ab	0.070 a	0.68 cd	0.410 a	E.S	13.08	18.7	10.2	18.9
C86-12	0.30 b	0.150 a	0.817 d	0.400 a					

Letras desiguales difieren $p \leq 0.01$ Prueba de Tukey, Sx desviación típica.

Al analizar los porcentajes de pústulas se pudo constatar que los menores correspondieron a: C90-530, C132-81, Co997, C266-70, C1051-73, SP70-1284, C86-12 y C86-503. Las mayores afectaciones correspondieron a B4362. Se puede observar que el resto de los patrones utilizados se comportan conforme a su reacción: PR980 (Altamente resistente), Ja64-11 (Resistente), C334-64 (Moderadamente resistente), My5514 y Ja60-5 (Susceptibles).

La utilización de este parámetro (Porcentaje de pústulas por centímetro cuadrado) nos permite disponer de un resultado más confiable, pues está sustentado sobre las observaciones contables que no dependen de la apreciación del observador y que, sin lugar a dudas, no introduce errores que surgen cuando las mediciones son realizadas por diferentes evaluadores.

Al analizar el área ocupada por pústulas en los distintos momentos de evaluación (tabla 2), se observa que en la cepa de caña planta, las evaluaciones a los 6 y 9 meses de edad, poseen resultados similares, por lo que podemos inferir que con uno de ellos es suficiente.

En las condiciones de este estudio, las mayores afectaciones en la provincia de Camagüey ocurren antes de los tres meses de edad, momento en que se manifiestan con mayor claridad los signos típicos de la roya parda y disminuyen progresivamente la sintomatología. Otros autores exponen que las afectaciones por roya parda comienzan desde muy temprano, antes de los primeros seis meses de edad, según refiere Tarazona (5).

Tabla 2. Comparación de los momentos de evaluación y hojas evaluadas en las cepas de planta y retoño para el porcentaje de área ocupada por pústulas

Momento de evaluación	PAPUST en planta	PAPUST en retoño	Hoja evaluada	PAPUST en planta	PAPUST en retoño
3 meses	1.82 d	2.59 e	+1	0.31 a	0.72 a
4 meses	1.06 c	1.40 d	+3	0.79 b	1.02 b
5 meses	0.65 b	0.74 c	+5	1.27 c	1.45 c
6 meses	0.24 a	0.43 b	Sx	0.33	0.45
9 meses	0.19 a	0.16 a	C.V (%)	18.7	18.9
Sx	0.33	0.45			
C. V (%)	18.7	18.9			

Letras desiguales difieren al $p \leq 0.01$ Prueba de Tukey, Sig. Significación.

Al analizar el comportamiento de las hojas evaluadas (tabla 2) se aprecia que los mayores porcentajes de afectación correspondieron a la hoja +5, aunque existe un valor intermedio en la hoja +3.

La representación gráfica de los efectos principales en las diferentes hojas, para el carácter Porcentaje de área ocupada por pústulas en las abscisas y el valor del CP1 en las ordenadas (figura 1), muestra la interacción Genotipo x Ambiente (G x E), descrita en términos de susceptibilidad diferencial de los cultivares frente a la roya parda. Los patrones B4362, My5514, Ja60-5 y C334-64 manifiestan afectaciones de mayor a menor, en el orden señalado. El porcentaje mayor de individuos se comportó como resistente. Según la representación gráfica del modelo AMMI2, los vectores cuyo punto final se encuentra más alejado del origen de coordenadas, contribuyen relativamente más a la interacción que aquellos cuyos vectores finalizan más próximos al origen (figura 2). Los puntos cuyas direcciones de vectores coinciden tienen un patrón de interacción similar. De acuerdo con estas consideraciones, se pueden agrupar los momentos de evaluación en tres grupos, uno formado por las primeras evaluaciones en la hoja +5, otro con las segundas evaluaciones en la hoja +5, y otro grupo formado por las evaluaciones cuartas y quintas en cualquiera de sus hojas.

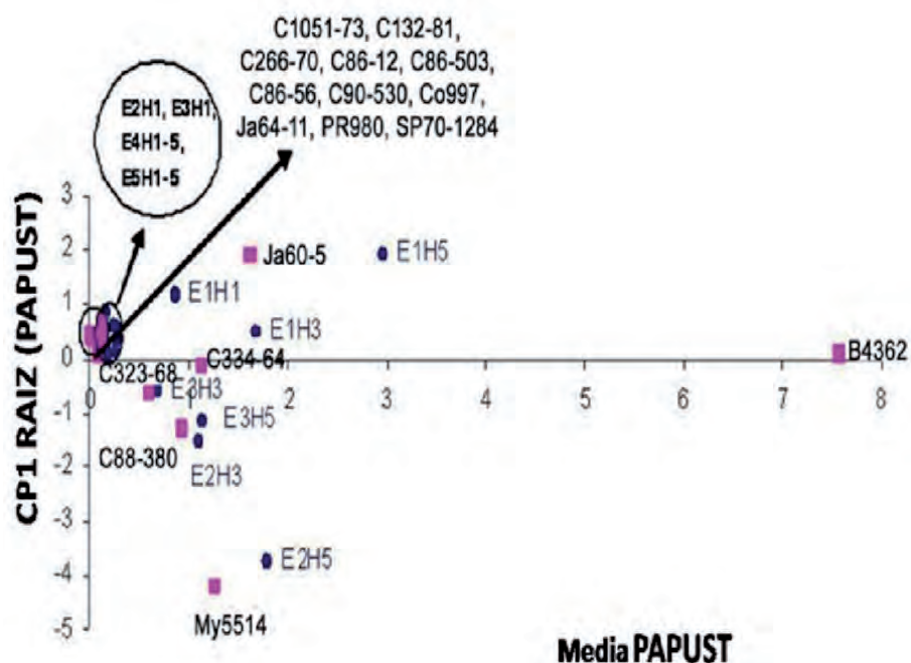


Figura 1. Representación Biplot del nivel de respuesta de los cultivares para el carácter Porcentaje de área ocupada por pústulas.

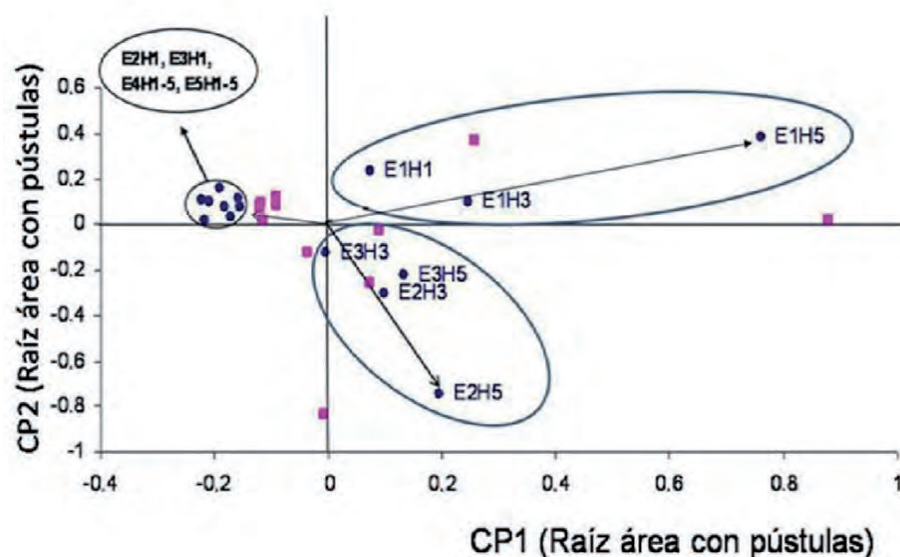


Figura 2. Representación Biplot para el carácter Porcentaje de pústulas por centímetro cuadrado relacionado con los momentos de evaluación: E1: evaluación 3 meses; E2: evaluación 4 meses; E3: evaluación 5 meses; E4: evaluación 6 meses; E5: evaluaciones 9 meses; H1: hoja +1; H3: hoja +3; H5: hoja +5.

CONCLUSIONES

1. En la localidad de Camagüey el 81 % de los cultivares que se estudiaron se comportaron como resistentes y presentaron las mayores afectaciones por roya parda a la edad aproximada de tres meses.
2. Los modelos AMMI permitieron graficar el comportamiento de los genotipos estudiados, así como la interacción Cultivar Momento de evaluación y mostrar la mayor interacción con las observaciones 1 y 2 en la hoja +5 y las 4 o 5 en cualquiera de sus hojas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chinae, A., R. Acevedo, E. Rodríguez y M. La O. Enfermedades de la caña de azúcar y evolución de las técnicas para su detección y diagnóstico en Cuba. Memorias del evento por el 50 aniversario del INICA, INICA, La Habana, Cuba. pp. 41-47, 2014.
2. Xavier, M.A., B.S. Gonçalves, M.G.A. Landell, P. Figueiredo, D. Perecin and I.R. Pinto. Brown rust (*Pucciniamelanocephala*) incidence in sugarcane families in Sao Paulo State, Brazil. Procc. Issct xxviii congress. Vol 28: 3 pp, 2013.
3. Tamayo, M., J. Montalván, Y. Puchades, I. Alfonso, P. Pablos, R. González. Estudio metodológico para evaluar roya parda de la caña de azúcar. Revista ATAC, 2: 33–36, 2010.
4. Tamayo, M., J. Montalván, Y. Puchades, I. Alfonso, R. González y P. Pablos. Roya común en caña de azúcar, estudio metodológico y relación genética como índice de consanguinidad. Memorias de la Jornada Científico Productiva 45 aniversario del INICA, INICA, Florida, Camagüey, Cuba. 2009.
5. Tarazona, G.A. Manejo fitosanitario del cultivo de la caña panelera. Medidas para la temporada invernal. Bogotá D.C., Colombia. Código 00.09.28.11. 2011, 51 pp.

Interacción genotipo x ambiente en caña de azúcar, en diferentes momentos de cosecha

Héctor Jorge-Suárez*, Alberto N. González-Marrero, Irenaldo Delgado-Mora, Rolando Bodaños-Estrada, Oscar Suárez-Benítez, Adrián Céspedes-Zayas, José R. Gómez-Pérez, Félix R. Díaz-Mujica, Yaquelin Puchades-Izaguirre y Reynaldo Rodríguez-Gross
Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA). Carretera CUJAE, km 1½, Boyeros, La Habana, Cuba.

*hector.jorge@inica.azcuba.cu

RESUMEN

El trabajo se realizó con el objetivo de estudiar la influencia de la interacción genotipo x ambiente en el cultivo de la caña de azúcar, cosechado en cepas de caña planta y de primer retoño, en tres períodos de zafra. Fueron evaluadas las variables t caña ha⁻¹, porcentaje de pol en caña y t pol ha⁻¹, mediante análisis de Varianzas bifactoriales de efectos fijos, en cada período de cosecha. Se empleó para esto el paquete estadístico *Statgraphics-plus-5,0* y, posteriormente, el análisis GGE *biplot* para determinar el comportamiento y la estabilidad de los cultivares evaluados. Los resultados demostraron existencia de interacción genotipo x ambiente para las variables t caña ha⁻¹ y de t pol ha⁻¹ en los tres momentos de cosecha, mientras que en la variable porcentaje de pol en caña solo fue significativa en el período final de cosecha. En la producción de caña por área, los genotipos que resultaron estables y de alta producción variaron en dependencia de los momentos de cosecha, de forma mayoritaria fueron C97-445, C95-416 y C86-12. Para el porcentaje de pol en caña, los cultivares de mayor contenido azucarero y estables en el período final de zafra resultaron ser: C97-445, C95-416 y C86-156.

Palabras clave: cepas, comportamiento, cultivares, estabilidad, localidades.

ABSTRACT

The work was carried out with the objective of studying the influence of the genotype x environment interaction in the cultivation of sugarcane at different harvest times, in multi-environmental studies; composed of 21 field experiments in three localities harvested in plant and first shoot cane strains in three harvest periods. The variables t cane ha⁻¹, percentage of pol in cane and t pol ha⁻¹ were evaluated by means of bifactorial variance analysis of fixed effects in each harvest period. For this, the statistical package *Statgraphics-plus-5,0* was used and later the GGE *biplot* analysis to determine the behavior and stability of the evaluated cultivars. The results demonstrated the existence of genotype x environment interaction for the variables t cane ha⁻¹ and t pol ha⁻¹ at the three harvest moments, while in the variable percentage of pol in cane it was only significant in the final harvest period. In the sugarcane production by area, the genotypes that were stable and of high production varied depending on the harvest times, mostly C97-445, C95-416 and C86-12. For the percentage of pol in sugarcane, the cultivars with the highest sugar content and stable in the final harvest period were: C97-445, C95-416 and C86-156.

Key words: strains, behavior, cultivars, stability, localities.

INTRODUCCIÓN

El comportamiento diferencial de genotipos en diferentes ambientes (interacción genotipo x ambiente, G x A), ha demostrado que reduce el progreso en la selección y complica la identificación de cultivares superiores en ensayos regionales (1).

Diversos estudios de interacción genotipo x ambiente (IGxE), en cultivares de caña de azúcar, reiteran su importancia y significación, que apunta a la necesaria evaluación multiambiental de los nuevos genotipos durante el programa de mejoramiento genético y posterior a su liberación en plantaciones comerciales (2).

En este sentido se han desarrollado técnicas estadísticas asistidas por gráficos de doble representación (*biplo*t), que permiten visualizar el patrón de comportamiento de los genotipos, para estimar su eficiencia, la capacidad de discriminación y representatividad de las localidades de prueba; como es el caso del *biplo*t, obtenido del modelo de Regresión de sitios (3), que ha sido utilizado para estimar las interacciones genotipo x ambiente en diferentes cultivos (4).

Un elemento a considerar en la zafra azucarera son los momentos de cosecha porque definen determinados ambientes específicos; al respecto Jorge *et al.* (5), señalaron que en el cultivo de la caña de azúcar, en Cuba, existen tres etapas bien definidas (inicial, intermedia y final) y que existen pocos trabajos donde se tenga en cuenta este factor, como causa de variación en los estudios de variedades, según expresan (6), (7), (8), por lo que resulta importante conocer la influencia que ejercen las diferentes etapas de zafra y los sitios de prueba en las respuestas productivas de los genotipos.

El objetivo de este trabajo es estudiar el comportamiento de la interacción genotipo x ambiente en tres localidades de pruebas, en diferentes momentos de cosecha, con seis cultivares de caña de azúcar en Cuba.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se desarrolló en tres sitios de prueba de la red experimental del Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA), estos fueron: Localidad 1, Espartaco, provincia de Cienfuegos (suelos Pardos sin carbonatos); Localidad 2, Guayos, provincia de Sancti Spíritus (suelos Pardos con carbonatos) y Localidad 3, Palma Soriano, provincia de Santiago de Cuba (suelos Pardos con carbonatos).

En cada localidad se estudiaron seis cultivares de la caña de azúcar: C95-416, C97-445 (de reciente incorporación al proceso productivo), comparadas con las variedades comerciales C323-68, C86-12, C86-156 y C90-469.

Se plantaron siete experimentos de campo en cada localidad (tabla 1), entre septiembre de 2009 y febrero de 2010, a los que se le realizaron 14 cosechas (siete en caña planta y siete en retoño), durante el período de noviembre de 2010 y mayo de 2012. Los estudios fueron conducidos, según las Normas y Procedimientos para el Mejoramiento Genético de la Caña de Azúcar en Cuba (9).

Tabla 1. Fecha de plantación y cosecha de los experimentos en cada localidad

Exptos. x localidad	Fecha de plantación	Cosechas caña planta		Cosecha retoño	
		Fechas	Edades	Fechas	Edades
2	Sept. 2009	Nov.-Dic. 2010	14-15 meses	Nov.-Dic. 2011	12 meses
2	Nov. 2009	Ene.-Feb. 2011	14-15 meses	Ene.-Feb. 2012	12 meses
2	Ene. 2010	Mar.-Abr. 2011	14-15 meses	Mar.-Abr. 2012	12 meses
1	Feb. 2010	Mayo 2011	15 meses	Mayo 2012	12 meses

Se evaluaron tres momentos de cosecha en cada cepa: momento 1, corresponde con las evaluaciones realizadas de noviembre a enero (inicio de zafra); momento 2, con las evaluaciones de febrero a marzo (período medio de zafra); y momento 3, con la información de abril a mayo (período final de zafra), para totalizar 21 ensayos de campo, con 42 cosechas.

Se utilizó la información de las variables del comportamiento agrícola y azucarero de los cultivares estudiados en las cepas de caña planta y primer retoño (t caña ha^{-1} , porcentaje pol en caña y t pol ha^{-1}), las que fueron evaluadas en los tres momentos de cosecha, en todas las localidades de estudio.

Los datos originales de las variables de cosecha, fueron analizados respecto a su normalidad y homogeneidad de varianza, mediante pruebas de Chí cuadrado y *Bartlett-Box F* y en ningún caso se hizo necesaria su transformación. Se realizaron análisis de varianzas bifactoriales de efectos fijos en cada momento, se tomaron como fuentes de variación los genotipos, los ambientes (localidades x cepas) y la interacción genotipo x ambiente, donde fue usado el modelo simple de análisis de la IGxE (10) y el paquete estadístico *Statgraphics-plus-5.0*.

Para el estudio de la estabilidad y la adaptabilidad fenotípica, se utilizó el modelo estadístico multivariado de efectos principales de los genotipos más efectos de la interacción genotipo-ambiente, también llamado modelo de Regresión de sitios (SREG) o GGE (del inglés, *Genotype main effect plus Genotype-by-Environment interaction*). En este modelo los efectos principales de los genotipos se envían al residual junto con la interacción genotipo x ambiente, para modelarlo de forma multivariada, mediante análisis de componentes principales (11).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Período inicial de zafra (momento 1)

En las variables t caña ha^{-1} y t pol ha^{-1} , se presentaron diferencias altamente significativas para la interacción genotipo x ambiente. Esto demostró que los cultivares estudiados presentaron un comportamiento diferenciado a través de los ambientes que fueron evaluados (tabla 2); aspecto que corrobora lo señalado por Gordon *et al.* (12), con relación a que la evaluación de los genotipos a través de distintos ambientes, es una de las prácticas más usadas para la recomendación de nuevos cultivares comerciales a los productores cañeros y se corresponde con los resultados obtenidos en Cuba por varios investigadores, entre ellos, González (13), Rodríguez (14) y Delgado (8). La no significación de la Interacción genotipo x ambiente para el porcentaje de pol en caña; pudo estar relacionada conque, cinco de los seis cultivares estudiados, se definen como de alto contenido azucarero (8), razón por la que la variabilidad de este carácter, en la población objeto de estudio, a inicios de zafra puede ser reducida.

Tabla 2. Análisis de Varianza factorial para el período inicial de la zafra (momento 1)

FV	G.L	t caña ha^{-1}		Porcentaje de pol en caña		t pol ha^{-1}	
		CM	Sig.	CM	Sig.	CM	Sig.
Genotipos	5	6198.72	**	1.15	n.s	172.90	**
Ambientes	5	42349.40	**	113.17	**	1197.20	**
G x A	25	4473.86	**	3.55	n.s	106.05	**
Error	270	502.74	-	2.95	-	19.00	-
Media	-	91.68 \pm 7.47	-	16.69 \pm 0.57	-	17.01 \pm 1.38	-

FV. Fuentes de variación. G.L. Grados de libertad. CM. Cuadrados medios. Sig. Significación.

G x A. Interacción genotipo x ambiente.

En la figura 1 se observa la representación *biplot* del modelo de Regresión de sitios con las relaciones entre los ambientes de prueba y los genotipos. En sus dos primeros componentes extrajo 71.5 % de la variabilidad total de los datos, contenido en los efectos de los genotipos más la interacción genotipo x ambiente para el rendimiento agrícola (t caña ha^{-1}). Este porcentaje es adecuado para mostrar las relaciones entre ambientes, genotipos y entre estos, por medio de los diferentes *bi*-

plots que se pueden obtener con el modelo (15). Las localidades se separaron con buena definición, cada una de ellas con sus dos ambientes perfectamente relacionados (caña planta y primer retoño), ya que presentaron ángulos agudos entre ellos, lo que indica correlación positiva. Las cañas plantas alcanzaron mayores rendimientos agrícolas que sus respectivos retoños.

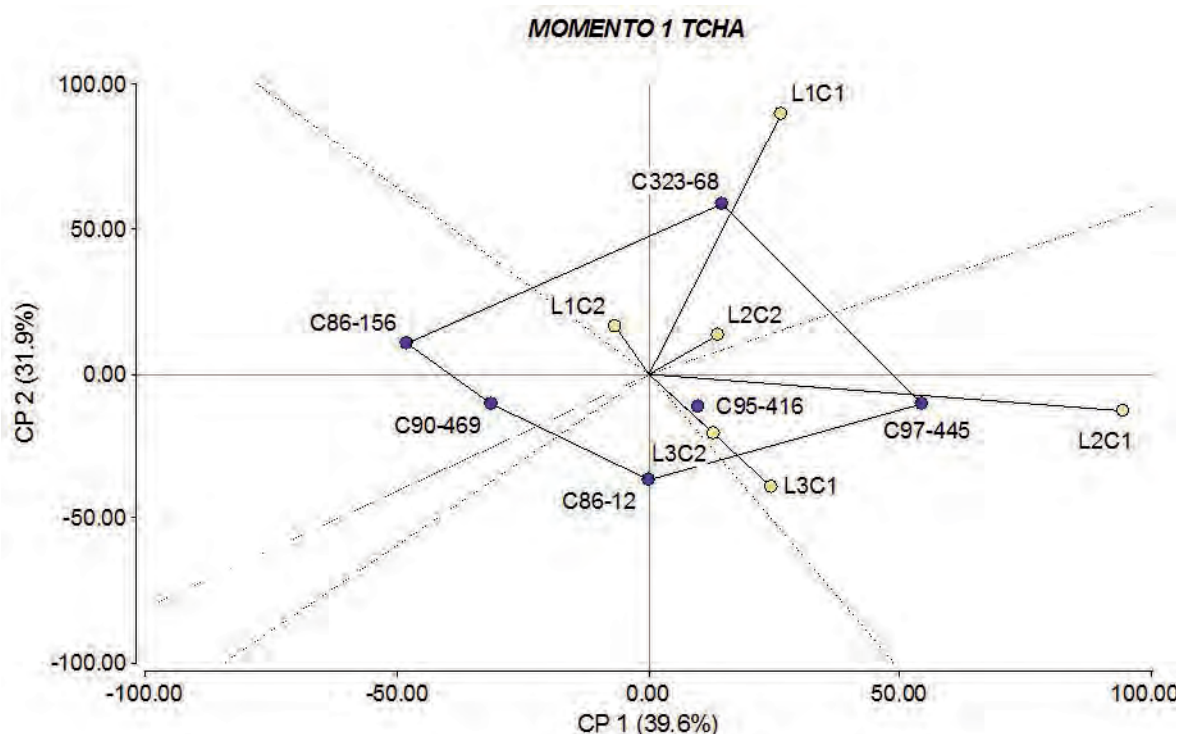


Figura 1. Habilidad discriminadora de genotipos de los ambientes de prueba, mediante el análisis GGE *Biplot*, en el período inicial de la zafra, a partir de las t caña ha⁻¹ (TCHA).

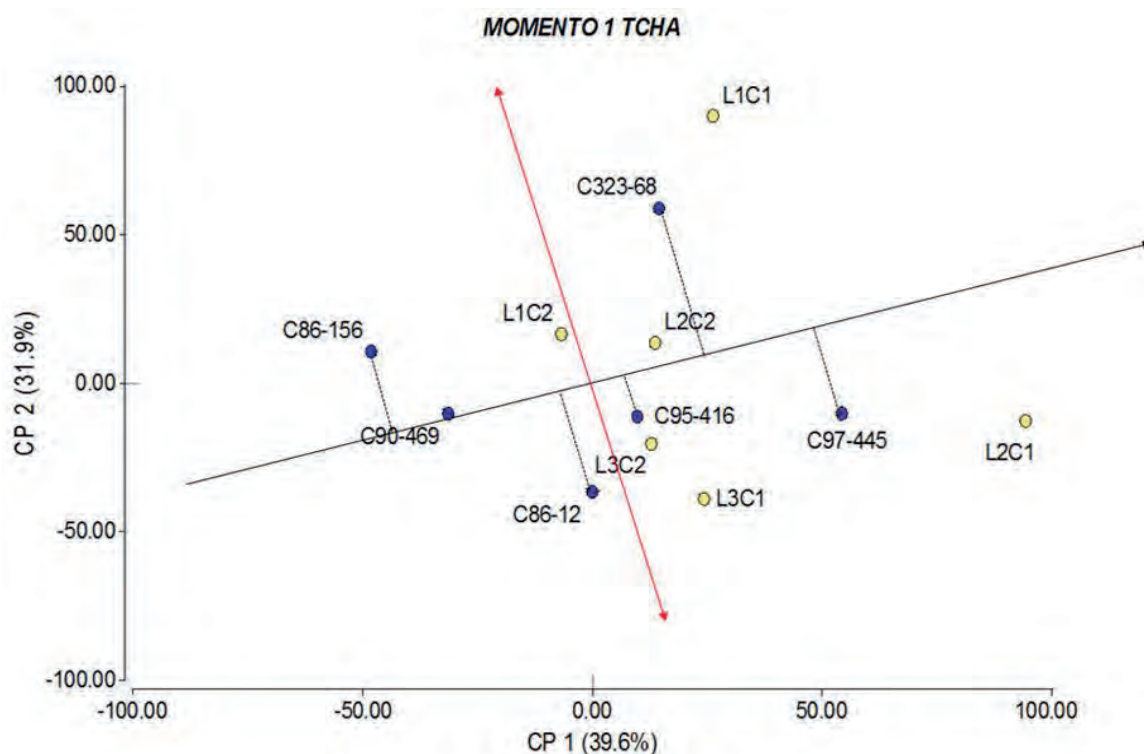


Figura 2. Clasificación de los genotipos en los ambientes de prueba en la variable t caña ha⁻¹ (TCHA), en el período inicial de la zafra.

Los cultivares más productivos (figura 2), fueron C97-445, C323-68 y C95-416, el primero y el tercero fueron estables, al igual que C90-469, con la diferencia que la producción de esta última, fue baja.

En la figura 3 se observa la representación *biplot* del modelo de Regresión de sitios (GGE), para el rendimiento de azúcar por área ($t\text{ pol ha}^{-1}$ o TPHA), en el plano de las dos primeras componentes. El vector ambiental del GGE *biplot* explicó el 71.7 % de la variación total.

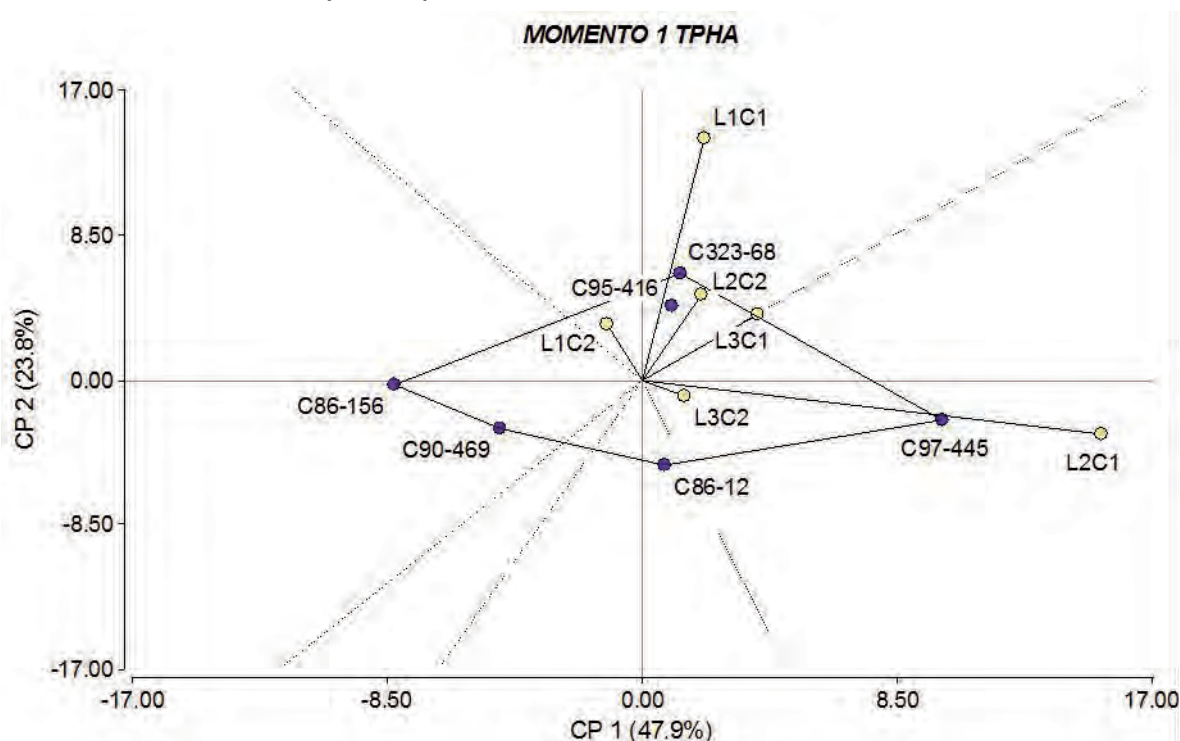


Figura 3. Habilidad discriminatoria de genotipos de los ambientes de prueba, mediante el análisis GGE *Biplot*, en el período inicial de la zafra, a partir de las $t\text{ pol ha}^{-1}$ (TPHA).

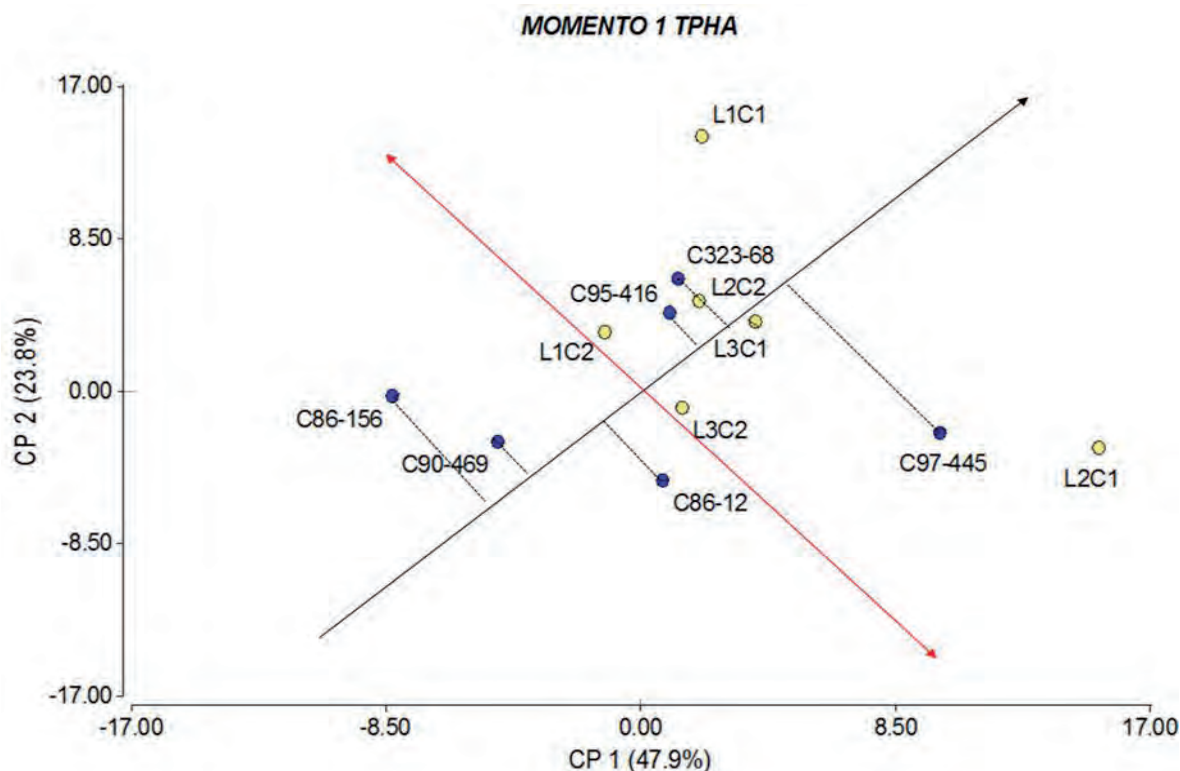


Figura 4. Clasificación de los genotipos en los ambientes de prueba, en la variable $t\text{ pol ha}^{-1}$ (TPHA), en el período inicial de la zafra.

Los dos ambientes de cosechas (caña planta y primer retoño), en las tres localidades, se separaron y mostraron relación, ya que presentaron, en todos los casos, ángulos agudos entre ellos, lo que indica correlación positiva. Los cultivares más productivos fueron C97-445, C323-68 y C95-416, las dos últimas fueron las más estables; al igual que C86-12 y C90-469, pero con producciones más bajas (figura 4).

Los resultados obtenidos en el rendimiento agrícola (toneladas de caña por hectáreas, t caña ha⁻¹ o TCHA) y en el rendimiento de azúcar por área (toneladas de pol por hectáreas, t pol ha⁻¹ o TPHA), coinciden con lo informado por Gabriel (16), cuando definió las primeras aplicaciones del *biplot* en análisis de datos agrícolas.

Período medio de zafra (momento 2)

De igual forma que en el momento 1 en las variables t caña ha⁻¹ y t pol ha⁻¹ también se encontraron diferencias altamente significativas para la interacción genotipo x ambiente en el momento 2 (tabla 3) y el porcentaje de pol en caña tampoco resultó significativo para esta interacción, lo que pudo estar influido por la menor variabilidad que presenta el carácter en este período, ya que los cultivares alcanzan su mayor concentración de sacarosa durante este (17).

Tabla 3. Análisis de Varianza factorial para el período medio de la zafra (momento 2)

FV	G.L	t caña ha ⁻¹		Porcentaje de pol en caña		t pol ha ⁻¹	
		CM	Sig.	CM	Sig.	CM	Sig.
Genotipos	5	2517.64	**	3.52	n.s	102.99	**
Ambientes	5	19618.40	**	103.89	**	506.77	**
G x A	25	1931.21	**	1.69	n.s	71.42	**
Error	180	254.66	-	1.55	-	14.46	-
Media	-	104.36 ± 6.51	-	18.57 ± 0.51	-	19.30 ± 1.55	-

FV. Fuentes de variación. G.L. Grados de libertad. CM. Cuadrados medios. Sig. Significación.

G x A. Interacción genotipo x ambiente.

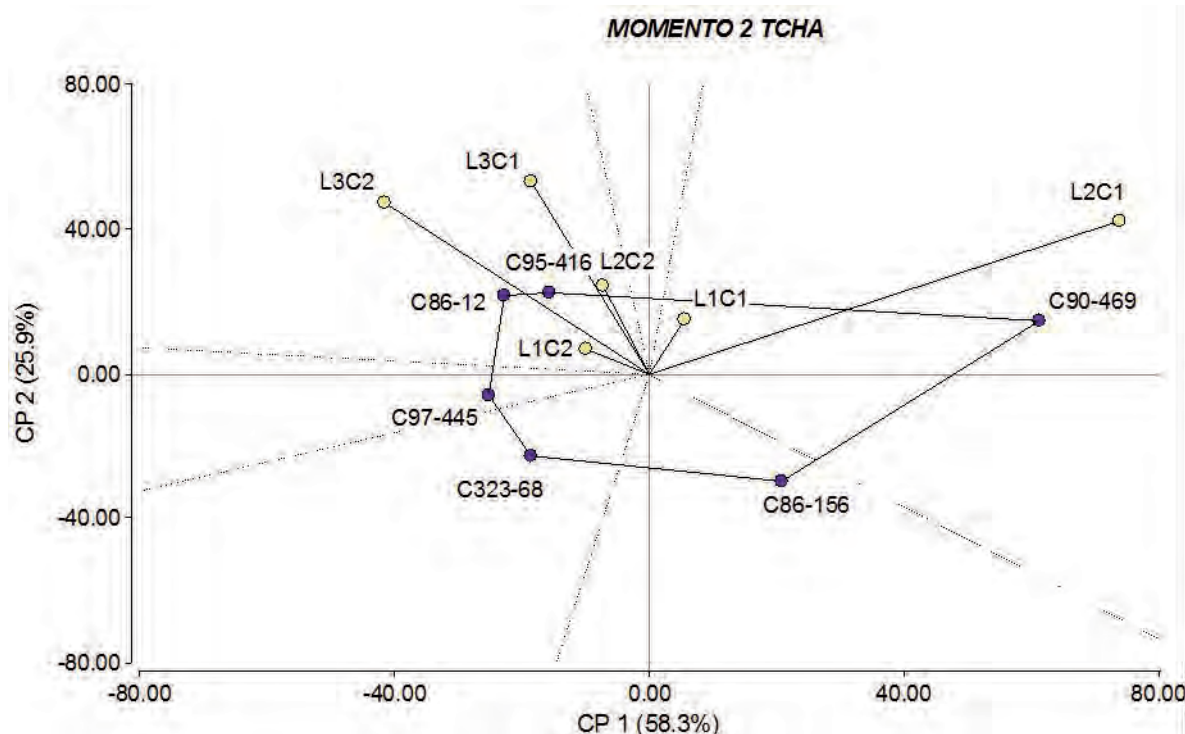


Figura 5. Habilidad discriminatoria de genotipos de los ambientes de prueba, mediante el análisis GGE *Biplot* en el período medio de la zafra, que parte de las t caña ha⁻¹ (TCHA).

En la figura 5 se mostró la representación *biplot* del modelo de Regresión de sitios (GGE), para el rendimiento agrícola (t caña ha⁻¹ o TCHA), en el plano de las dos primeras componentes, en que el vector ambiental del GGE *biplot* explicó el 84.2 % de la variación total.

Los cultivares más productivos fueron C95-416 y C86-12; ambos estables, al igual que C97-445, C323-68 y C86-156, pero con rendimientos agrícolas más bajos que las dos anteriores (figura 6).

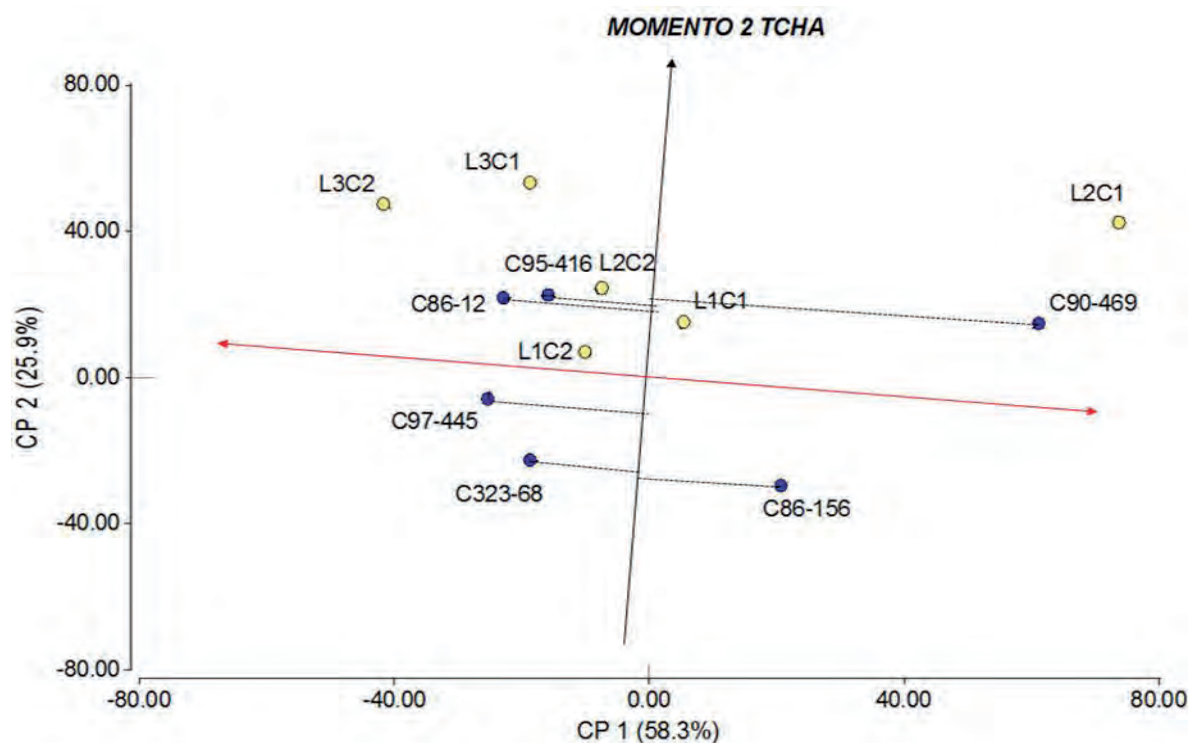


Figura 6. Clasificación de los genotipos en los ambientes de prueba, en la variable t caña ha⁻¹ (TCHA), en el período medio de la zafra.

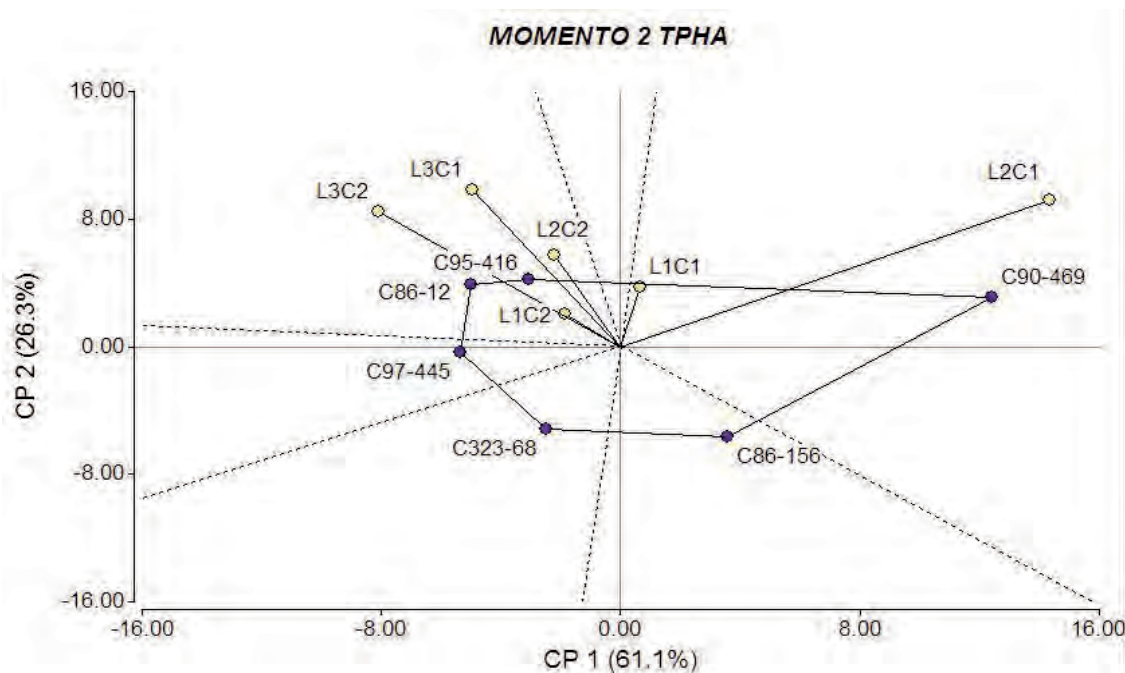


Figura 7. Habilidad discriminatoria de genotipos de los ambientes de prueba, mediante el análisis GGE *Biplot* en el período medio de la zafra, que parte de las t pol ha⁻¹ (TPHA).

En la figura 7 se observa la representación *biplot* del modelo de Regresión de sitios (GGE), para el rendimiento de azúcar por área (t pol ha⁻¹ o TPHA), en el plano de las dos primeras componentes. El vector ambiental del GGE *biplot* explicó el 87.4 % de la variación total, que se corresponde con la variación total de la IGxE.

La estabilidad de los cultivares en los ambientes de prueba en la variable t pol ha⁻¹ en el período medio de la zafra, fue similar a la descrita en la variable t caña ha⁻¹ (figura 8).

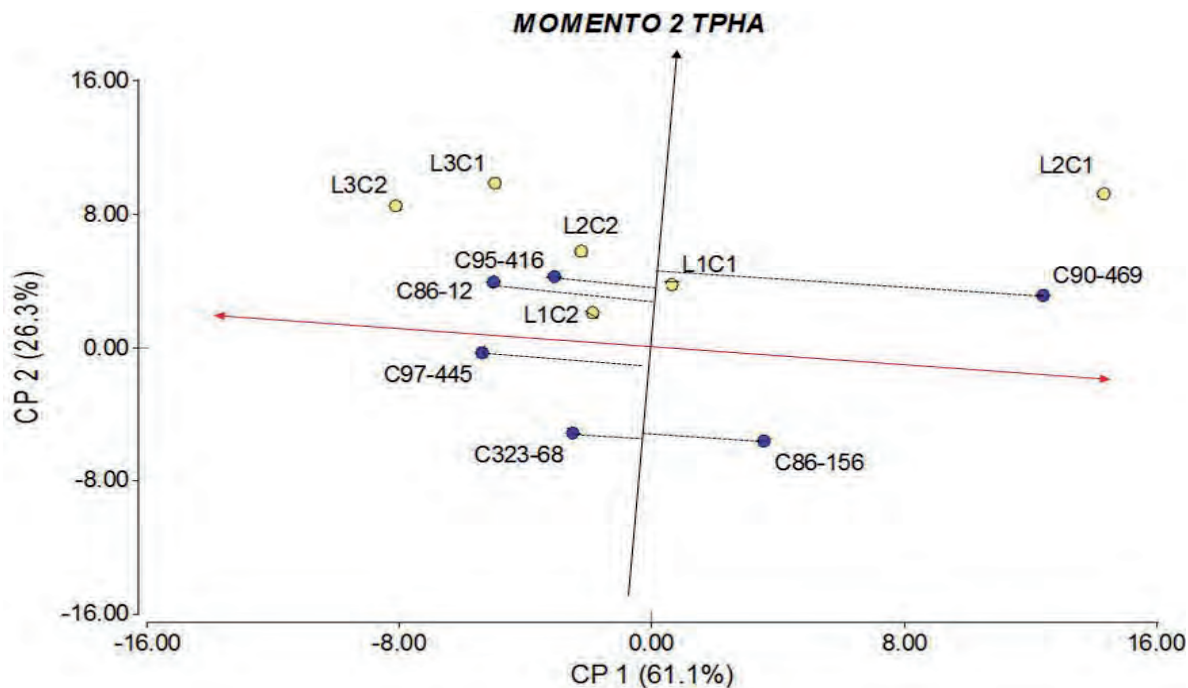


Figura 8. Clasificación de los genotipos en los ambientes de prueba, en la variable t pol ha⁻¹ (TPHA), en el período medio de la zafra.

Período final de zafra (momento 3)

En el período final de la zafra (momento 3 de cosecha), se encontraron diferencias significativas en la interacción genotipo x ambiente, en las tres variables evaluadas (tabla 4), que indica que los genotipos estudiados presentaron un comportamiento diferenciado, a través del conjunto de ambientes de prueba.

Tabla 4. Análisis de Varianza factorial para el período final de la zafra (momento 3)

FV	G.L	T caña ha ⁻¹		Porcentaje de pol en caña		T pol ha ⁻¹	
		CM	Sig.	CM	Sig.	CM	Sig.
Genotipos	5	1662.92	**	1.44	n.s	58.06	**
Ambientes	5	8939.12	**	189.75	**	157.86	**
G x A	25	958.41	**	2.28	**	32.84	**
Error	180	128.04	-	1.06	-	6.61	-
Media	-	93.74 ± 4.60	-	18.22 ± 0.42	-	16.89 ± 1.05	-

FV. Fuentes de variación. G.L. Grados de libertad. CM. Cuadrados medios. Sig. Significación.

G x A. Interacción genotipo x ambiente.

El comportamiento específico del porcentaje de pol en caña, pudo estar relacionado con las condiciones específicas de la cosecha en los meses de abril y mayo (fuera del período óptimo de maduración), que pertenecen al inicio de la primavera cuando se incrementan las precipitaciones y aumentan, de forma significativa, las temperaturas del aire, la humedad relativa y la evapotranspira-

ción; condiciones que afectan notablemente la acumulación de sacarosa y, a las que las variedades comerciales responden, de forma diferencial (19) (8).

En la figura 9 se apreció la representación *biplot* del modelo de Regresión de sitios (GGE), para el rendimiento agrícola (t caña ha⁻¹ o TCHA), en el plano de las dos primeras componentes el vector ambiental del GGE *biplot*, explicó el 90,1 % de la variación, que se corresponde con la variación de la IGxE.

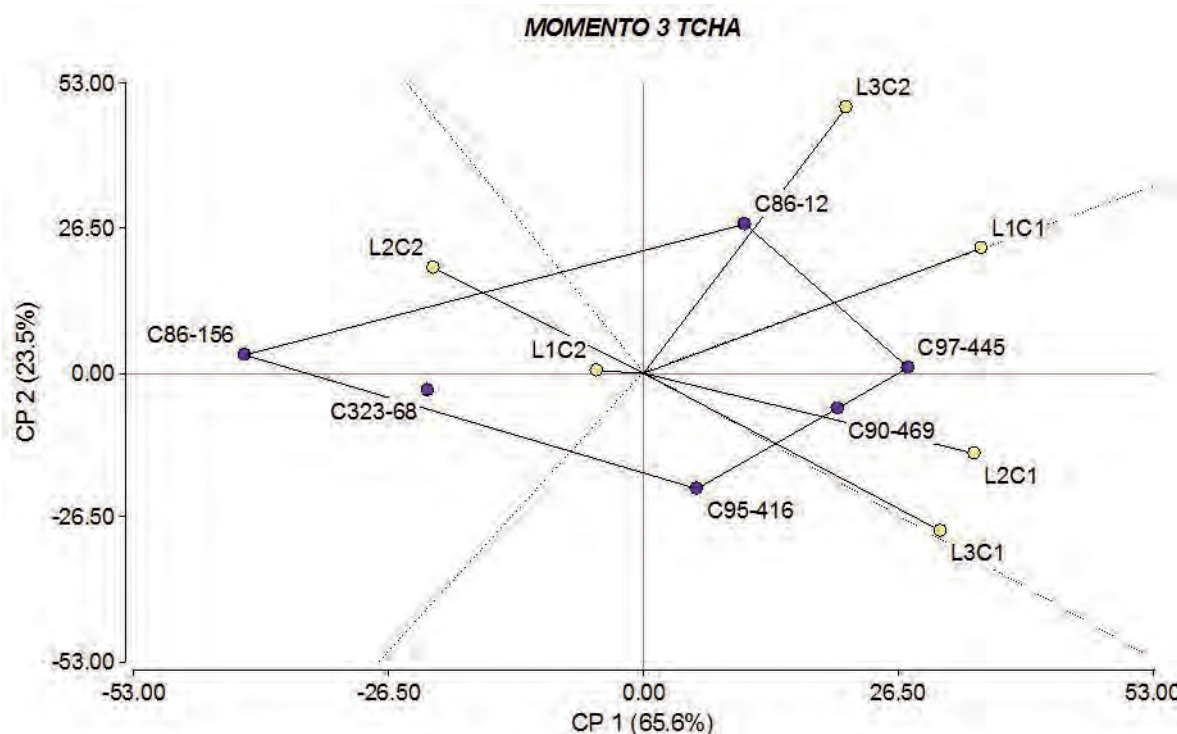


Figura 9. Habilidad discriminatoria de genotipos de los ambientes de prueba, mediante el análisis GGE *Biplot*, en el período final de la zafra, que parte de las t caña ha⁻¹ (TCHA).

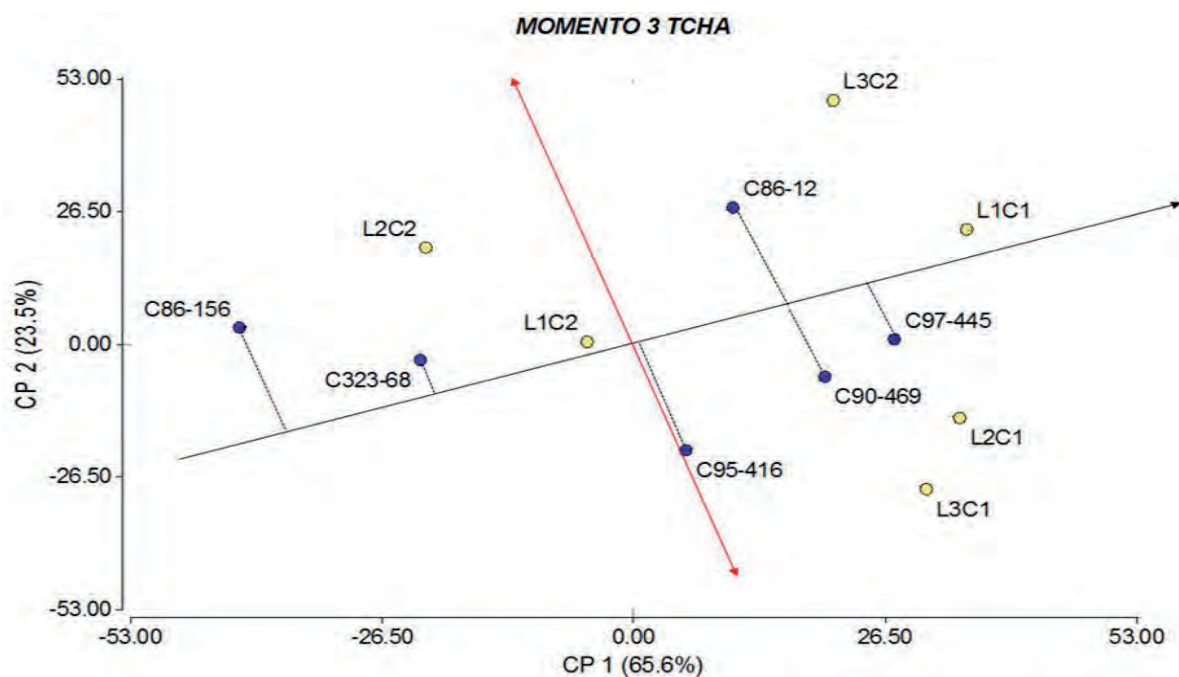


Figura 10. Clasificación de los genotipos en los ambientes de prueba en la variable t caña ha⁻¹ (TCHA), en el período final de la zafra.

Los ambientes se separaron diferenciadamente; pero aparecen relacionados, por un lado, las cañas plantas de las tres localidades y, por otro, los retoños de estos sitios de prueba que, de igual forma coincidieron. No hubo relación entre los ambientes de caña planta y sus respectivos retoños, es decir bien separados estadísticamente (con ángulos de unión igual o superior a 90°).

Los cultivares más productivos y estables fueron C97-445, C90-469, C95-416 y C86-12 (figura 10).

En la figura 11 se pudo observar la representación *biplot* del modelo de Regresión de sitios (GGE), para el contenido azucarero (porcentaje de pol en caña o PPC), en el plano de las dos primeras componentes. El vector ambiental del GGE *biplot* explicó el 80.1 % de la variación total.

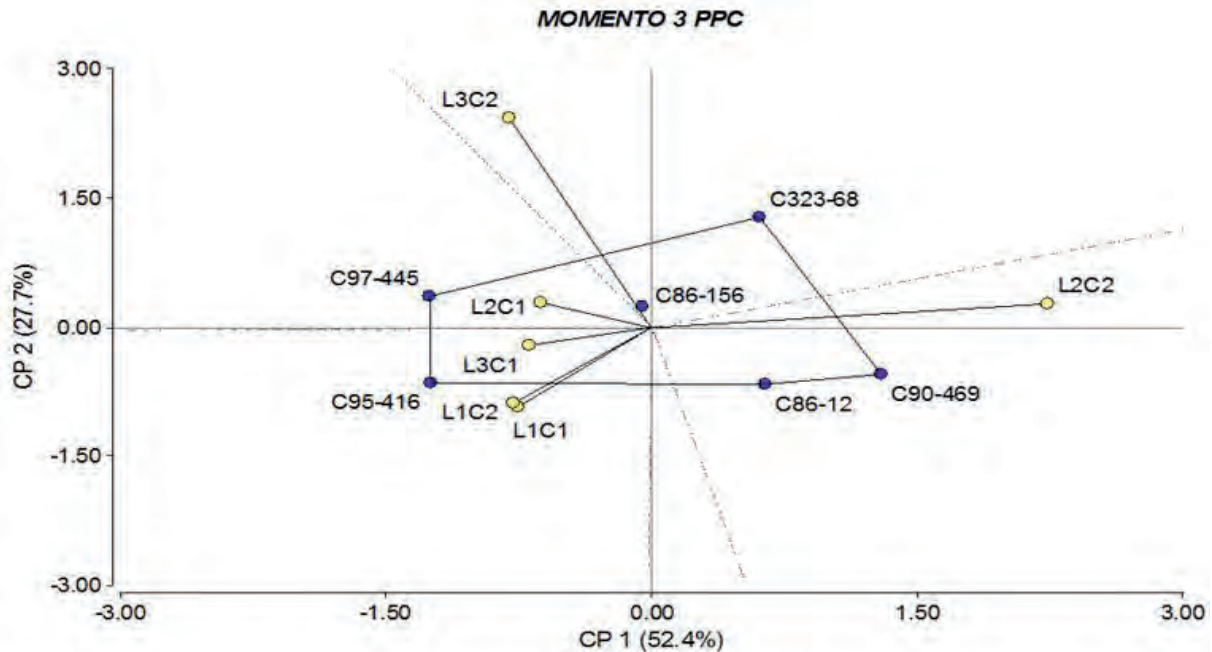


Figura 11. Habilidad discriminatoria de genotipos de los ambientes de prueba, mediante el análisis GGE *Biplot*, en el período final de la zafra, que parte del porcentaje de pol en caña (PPC).

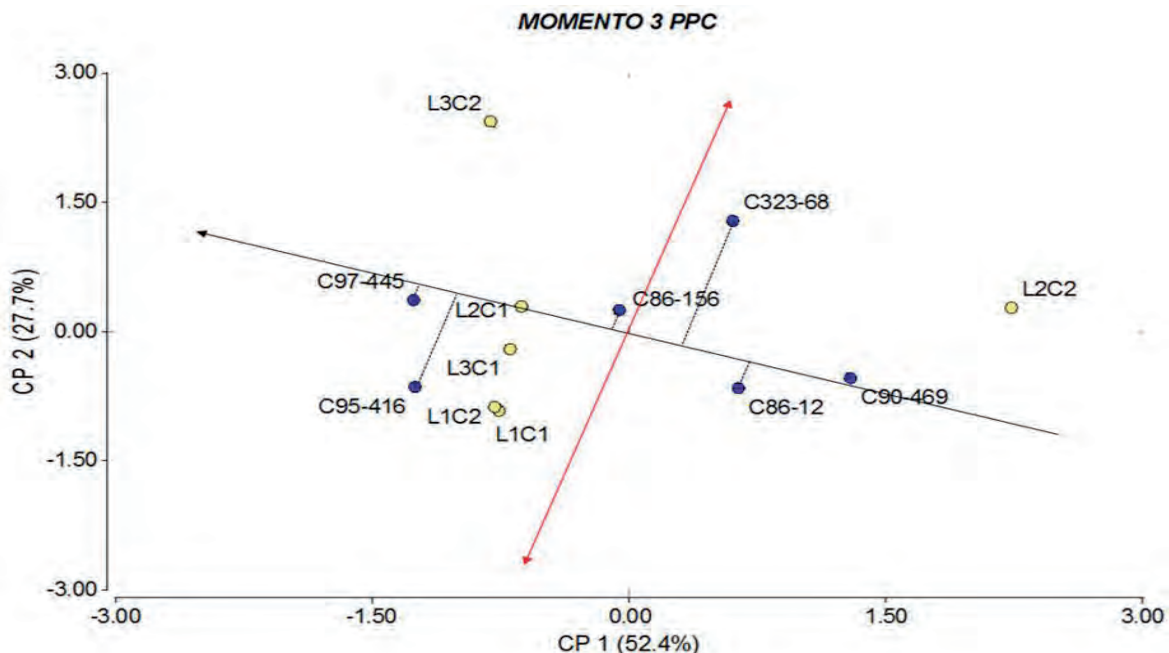


Figura 12. Clasificación de los genotipos en los ambientes de prueba en la variable porcentaje de pol (PPC) en caña, en el período final de la zafra.

Los ambientes se diferenciaron, excepto la caña planta y retoño de la localidad de Espartaco. La localidad de Guayos (2), mostró el mayor poder discriminativo de genotipos, sobre todo por los resultados de la cosecha de primer retoño, al igual que el caso de la localidad Palma Soriano (3), que también se destacó por los resultados en igual cepa.

La figura 12 reflejó que el cultivar C97-445, resultó el de mayor productividad y los de mayor estabilidad, con elevado contenido azucarero fueron: C97-445, C95-416 y C86-156, resultaron estables también, pero con valores inferiores en esta variable, los cultivares C90-469 y C86-12.

Los resultados para el rendimiento de azúcar por área ($t \text{ pol ha}^{-1}$ o TPHA) tuvieron semejanzas con las $t \text{ caña ha}^{-1}$.

CONCLUSIONES

- El comportamiento de los genotipos evaluados en los ambientes de prueba, presentó diferencias altamente significativas en la interacción genotipo x ambiente, en las variables $t \text{ caña ha}^{-1}$ y $t \text{ pol ha}^{-1}$, en los tres momentos de cosecha. La variable porcentaje de pol en caña, solo fue significativa en el momento tres de cosecha.
- Los ambientes más discriminativos de genotipos para el rendimiento agrícola, fueron las cañas plantas de las tres localidades, en los tres momentos de cosecha. Para el contenido azucarero, resultó ser el primer retoño de la localidad 2 (Guayos), en la etapa final de zafra.
- En la producción de caña por área, los genotipos estables y de altos rendimientos, variaron según los momentos de cosecha, de forma mayoritaria fueron C97-445, C95-416 y C86-12. En el porcentaje de pol en caña, resultaron ser C97-445, C95-416 y C86-156.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rea, R., O. De Sousa., M. Ramón., G. Alejos., A. Díaz y J. George: Selección simultánea para rendimiento y estabilidad en genotipos de caña de azúcar en la región centro-occidental de Venezuela (2014). Bioagro, 26 (3).
2. Gilbert R. A., Shine J. M., Miller J. D., Rice R. W. and Rainbolt C. R. The effect of genotype, environment and time of harvest on sugarcane yields in Florida, USA. Field (2006). Crops Research 95: 156-170.
3. Yan, W: GGE biplot- a Windows application for graphical analysis of multi-environment trial data and other types of two-way data (2001). Agron. J. 93: 1111-1118.
4. Glaz, B. and S.M Kang. Location Contributions Determined via GGE Biplot. Analysis Multienvironment Sugarcane Genotype-Performance Trial (2008). Crop Sci. 48:941-950.
5. Jorge, H., Ibis Jorge., I. Santana., O. Santana y R. González: Manejo y explotación de los cultivares de caña de azúcar en Cuba (2000). Revista Cuba & Caña: 26-28.
6. Delgado, I., H. Jorge., H. García., N. Bernal., Aydiloide Bernal., J.R. Gómez., O. Aday., H. González., Mayelín Buedo., Susana Reyes., Dunia Núñez., J. Barroso y L.F. Machado: Potencialidades de familias de cultivares de caña de azúcar para diferentes períodos de zafra (2012) Revista Cultivos Tropicales 33(3): 5-14.
7. Jorge, H., I. Delgado., A. Vera., J.R. Gómez., F.R. Díaz., A. Céspedes., J. Pérez., J. Santos y S. Guillén (2014). Caracterización de las familias de variedades acorde con los momentos de cosecha en dos localidades de la región central de Cuba. Centro Agrícola, 41(2): 71-77.
8. Delgado, I: Contribución al conocimiento científico y metodológico para la recomendación de cultivares de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) en Cuba (2019). Tesis de Opción al Grado

- Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA). Carretera al CAI Martínez Prieto km 11/2. Boyeros. La Habana. Cuba.
9. Jorge, H., Íbis Jorge, J.M. Mesa y N. Bernal: Normas y Procedimientos del Programa de Mejoramiento Genético de la Caña de Azúcar en Cuba (2011). PUBLINICA. La Habana. 346p.
 10. Kempthorne, O: Una Introducción a la Estadística Genética (1957). John Welley y Sons. New York.
 11. Yan, W., Kang, M.S.; Ma, B., Woods, S. and Cornelius, P.L. GGE biplot vs. AMMI analysis of genotype-by-environment data (2007). Crop Sci. 47: 643–655.
 12. Gordon, M., B. Camargo., B. Franco y S. González: Evaluación de la adaptabilidad y estabilidad de 14 híbridos de maíz, Azuero, Panamá (2006). Agronomía Mesoamericana, 17 (2): 189-199.
 13. González, A: Caracterización del efecto ambiental en estudios de regionalización de variedades de caña de azúcar (*Saccharum* sp. Híbrido), en la provincia de Las Tunas (1995). Tesis de Opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. La Habana. Cuba: 120 p.
 14. Rodríguez, R: Perfeccionamiento del Programa de Mejora genética de la caña de azúcar (*Saccharum* spp) para la obtención de nuevos genotipos tolerantes al estrés por déficit hídrico (2012)) Tesis en opción al grado de doctor en Ciencias Agrícolas. Ministerio de Educación Superior, Universidad Agraria de la Habana. Cuba: 121 p.
 15. Yan, W and Tinker, N.A: Biplot analysis of multi-environment trial data: Principles and applications (2006). Contemporary Issues in Statistic, Data Management, Plant Biology and Agriculture Research. Eastern Cereal and Oilseed Research Centre, Agriculture and Agri-Food Canada, 960 Carling Ave., Ottawa, Ontario, Canada K1A 0C6 (e-mail: wyan@ggebiplot.com; yanw@agr.gc.ca).
 16. Gabriel, K.R: The biplot graphic display of matrices with applications to principal component analysis (1971). Biometrika 58: 453-467.
 17. Jorge, H., A. Menéndez., A. González., I. Delgado y J.R. Gómez: Evaluación de genotipos de caña de azúcar en diferentes ambientes en el ingenio Ofelina, República de Panamá (20118) Revista Centro Agrícola. Vol.45, No.1, 24-33.

Análisis de riesgos e impacto ambiental en el manejo y almacenamiento de biomasa cañera en bioeléctricas

Juan Fernández-Rodríguez* y José Alberto Pérez-Hernández

Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA).

Pablo Noriega, CP 33500. Quivicán. Mayabeque, Cuba.

*juan.fernandez@icidcamy.azcuba.cu

RESUMEN

En Cuba está en desarrollo un programa para la construcción de varias plantas bioeléctricas que requieren grandes volúmenes de biomasa. El objetivo de este trabajo es analizar los distintos riesgos e impactos ambientales que tienen el manejo y almacenamiento de biomasa cañera. Se realizaron diagnósticos en patios de almacenamiento y búsqueda bibliográfica para facilitar la clasificación de los riesgos, su manifestación y establecerse el origen y las consecuencias de los impactos. El polvo de bagazo que se genera, constituye un riesgo para las vías respiratorias, provoca afecciones oculares y molestias en la piel. Las partículas entre 3 y 10 micras, al penetrar en los pulmones transportan esporas de actinomicetos responsables de la bagazosis, por lo que se debe contar con los medios de protección necesarios. Existen riesgos de incendios que exigen un sistema de protección que incluya los dispositivos para detectar y monitorear la temperatura de la pila y los equipos y medios de extinción. Los riesgos asociados a equipos de manejo y transporte de biomasa se deben a fallas de maniobrabilidad en la conducción del vehículo, ya que los cargadores operan entre 10 y 20 m de altura y los camiones y sus remolques alcanzan más de 25 m de largo. Otros riesgos están asociados al ruido, emanación de vapores, contaminación por las aguas de drenaje de las pilas y el mal olor en los patios de almacenamiento. Los riesgos y efectos ambientales del uso de la biomasa cañera deben evaluarse cuidadosamente y tener en cuenta la dimensión de los impactos, antes de extender su uso a gran escala.

Palabras clave: almacenamiento, bioeléctrica, biomasa cañera, medioambiente, riesgos.

ABSTRACT

A program for the construction of several bioelectric plants that require large volumes of biomass is carrying up in Cuba. The purpose of this paper is to analyze different risks and environmental impacts during handling and storage of sugarcane biomass. Diagnoses were made in storage yards and a bibliographic search was performed, which facilitated the classification of risks and their manifestation, establishing the origin and consequences of impacts. The generation of bagasse dust causes respiratory risks, eye conditions and skin discomfort. The particles between 3 and 10 microns, when entering the lungs, carry spores of actinomycetes that are responsible for bagassosis, so that it is necessary the use of means of protection. There are fire hazards that require a protection system including devices for detection, pile temperature monitoring and extinguishing equipment. The risks associated with biomass handling and transportation means are due to maneuvering failures in driving the vehicle, since the loaders operate between 10 and 20 m high and the trucks and their trailers reach more than 25 m long. Other risks are associated with noise, vapor emission, contamination by pile drainage water and bad smell in storage yards. The risks and environmental effects of the use of sugarcane biomass should be carefully evaluated, taking into account the dimension of impacts, before extending their use on a large scale.

Key words: bioelectric plants, environment, risks, sugarcane biomass, storage.

INTRODUCCIÓN

Los temas de la contaminación ambiental y el análisis de los riesgos han tenido una mayor atención por parte de todos los sectores (social, industrial, gubernamental, entre otros) en los últimos años en Cuba, ya que para alcanzar los objetivos propuestos se requiere garantizar la sostenibilidad de los procesos productivos. Debido a la acción humana se está modificando la composición química y física de la atmósfera, se experimentan un rápido deterioro de los materiales, afectaciones al medioambiente y a la salud humana (1); por tanto, los efectos económicos, ambientales y sociales del uso de la biomasa deben evaluarse cuidadosamente. Las bondades de la biomasa para la generación de energía eléctrica deben sopesarse cuando se analizan profundamente sus riesgos e impacto ambiental (2).

Las centrales termoeléctricas de biomasa vegetal han alcanzado un auge a nivel internacional (3) y en Cuba existe un programa para el cambio sostenido de la generación de energía eléctrica, a partir del uso del bagazo y los residuos agrícolas de la caña (RAC) (4).

El almacenamiento prolongado de grandes cantidades de biomasa cañera para la generación de energía, fuera de zafra, presenta retos diferentes a los asociados con el almacenamiento en pequeña escala, típico de los ingenios para cogenerar. Entre los desafíos se incluyen la pérdida de valor del combustible, la combustión espontánea, el manejo del bagazo y una variedad de impactos sobre el medioambiente y la salud de los trabajadores (5). Por otra parte, los riesgos a la seguridad ocupacional y a la salud dependen de las características de la biomasa, el diseño de planta y, también, del manejo, procesamiento y almacenamiento de esta (6).

En Cuba se ha acumulado experiencia en el manejo y almacenamiento de grandes cantidades de bagazo, en plantas de pulpa y en plantas de tableros. En la literatura especializada son escasos los trabajos sobre los riesgos e impacto ambiental del uso de la biomasa cañera con fines energéticos (7,8); por lo que, al constituir una experiencia nueva para el país, no se tienen completamente identificados los riesgos y las regulaciones ambientales vigentes que le son aplicables, por lo que se requieren más evidencias y trabajos de investigación en este campo (2).

El objetivo de este trabajo es analizar algunos riesgos e impactos del manejo y almacenamiento de grandes cantidades de biomasa cañera con fines energéticos, para proponer las medidas de mitigación correspondientes.

Materiales y métodos

Se realizaron diagnósticos tecnológicos por parte de los autores, en patios de almacenamiento, en papeleras de Cuba en 2014 y de Colombia en 2012, se revisaron informes internos del ICIDCA, relacionados con el tema y se hizo una búsqueda bibliográfica; todo ello facilitó la clasificación de los riesgos y sus manifestaciones; se estableció el origen y consecuencia de los impactos a la salud humana y al medioambiente. El muestreo de la pila se hizo por el método de triangulación por laderas y se emplearon las normas TAPPI. El nivel de presión sonora se midió con un sonómetro digital marca EXAIR, con rango de 20 a 130 dB y la temperatura de la pila se midió con un termopar de la marca Eutechnics 4500, con láminas (Fe-Cu, Ni) y rango de 40 °C a 150 °C. Se analizó el molino pica-paja del centro de limpieza en seco, del ingenio Manuel Fajardo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los riesgos asociados al manejo y almacenamiento de la biomasa cañera se pueden clasificar de acuerdo con el agente causante, como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Clasificación de los riesgos y sus manifestaciones

Riesgos	Manifestaciones
Físico- ambientales	Ruido y vibraciones; condiciones termo-higrométricas (temperatura, humedad); radiaciones no ionizantes (exposición a radiaciones solares en patios de almacenamiento).
Químicos	Emanaciones gaseosas de la combustión; emanaciones de vapores (reacciones bioquímicas del bagazo almacenado).
Biológicos.	Hongos (enmohecimiento de polvos de origen vegetal); particulados (micro-partículas de polvo de bagazo y RAC); enfermedades transmitidas por el hombre o animales.
Topográficos.	Riesgos por pendientes, cambios de nivel, zanjas, canales.
Mecánicos	Maquinaria y equipos (desgaste, falta de mantenimiento).
Transporte	Se producen choques, vuelcos e incendios de medios de transporte por desperfectos técnicos y por imprudencias.
Eléctricos	Generados por motores, conductores, paneles de energía.
Del puesto	Orden y limpieza; trabajo en las alturas; condiciones microambientales.
Del ecosistema	Inundaciones, tormentas, tornados, huracanes, descargas eléctricas y lluvias sostenidas e intensas.

El ruido se origina por los camiones de carga, los equipos pesados de manejo del bagazo, por los conductores de banda y otros equipos. En la tabla 2, se reportan valores del nivel de ruido medido, a diez metros de la fuente generadora.

Tabla 2. Fuente de ruido en el manejo y almacenamiento de biomasa cañera

Fuente de emisión	Camión	Cargador	Triturador	Tractor	Conductor
Nivel de ruido dB(A)	82.4	82.1	87.0	80.0	80.0

Los valores de presión sonora asociados al ruido de los distintos equipos no rebasan la norma (NC-19-01-04) (9) de 85 dB (A) para un tiempo de exposición de 8 horas, excepto el ventilador de tiro inducido y el molino triturador de RAC, con 85 y 87 dB (A), respectivamente. Como medida preventiva los trabajadores involucrados deben usar tapones auditivos y orejeras, que debe atenuarles entre 10-30 decibeles.

Las vibraciones se transmiten al cuerpo a través de los asientos de vehículos, estructuras, pisos y el suelo, provocando dolores abdominales y lumbares, trastornos visuales y problemas con el equilibrio. Los equipos de manejo y transporte de la biomasa producen vibraciones de baja frecuencia admisibles, según la norma (NC 19-01-05) (10), pero los molinos de martillos picadores de los RAC generan vibraciones de alta frecuencia (de 1 a 80 Hz), más riesgosas. Para enfrentar la exposición a radiaciones solares, los trabajadores utilizarán el casco, la camisa de mangas largas y la solera. La generación de gases de combustión por equipos de transporte y manejo de la biomasa cañera, al igual que la combustión del bagazo, son focos de emisiones de gases de efecto invernadero. Uno de los impactos de mayor incidencia económica, laboral y medioambiental es el incendio de las pilas de bagazo, por lo que se debe contar con un sistema de protección contra incendio (11). El fuego se puede producir accidentalmente en cualquier área, debido a violaciones de las instrucciones laborales como: fumar en áreas prohibidas, no cumplir las medidas de seguridad al realizar trabajos de mantenimiento y no utilizar mata-chispas en los equipos de manipulación y transportación de biomasa con motores de combustión interna.

Debe ejecutarse el monitoreo de la pila, como se muestra en la figura 1 y en la tabla 3, para predecir la ocurrencia de autocombustión y la calidad del bagazo.



Figura 1. Muestreo de la pila de bagazo.

Tabla 3. Resultados del muestreo de la pila de bagazo

Ladera	Punto de muestreo	Humedad (% w/w)	Temperatura (°C)	Cenizas (%)	pH	Solubilidad NaOH (%)
3	Superficie	57.11	43.5	7.94	4.28	32.33
	Interior V	53.80	48.0	5.14	4.53	30.45
	Interior H	55.20	48.3	5.85	4.95	29.73
2	Superficie	74.52	35.9	5.52	6.00	30.52
	Interior V	44.20	67.1	4.85	5.32	33.25
	Interior H	51.18	63.8	5.36	5.73	30.91
1	Superficie	48.83	45.2	5.79	5.91	28.13
	Interior V	56.60	54.3	5.85	5.44	29.78
	Interior H	54.98	53.7	4.16	5.50	31.02
	Control	53.2	-	6.09	5.33	30.94

V: en el plano vertical del muestreo; H: en el plano horizontal del muestreo.

La pila muestreada después de tres meses de almacenamiento, con una altura de 18 m, conteniendo 35 000 t (bh) de bagazo no mostró evidencias de peligro de incendio, según los modelos de riesgos de Macaskill (12), ni tampoco deterioro de la calidad del bagazo, corroborado por los bajos niveles de solubilidad en sosa al 1 %.

En caso de incendio de la pila, debe evacuarse al personal hacia zonas contrarias al viento, por el arrastre del humo; activarse el sistema contra incendio y solicitar los servicios de los bomberos. Al extinguir el fuego, mediante el riego con agua, se corre el riesgo de contaminación de las fuentes de abasto de agua con el drenaje de la pila, por lo que deben tomarse medidas de protección en este sentido.

El manejo, almacenamiento y reclamo de la biomasa cañera genera contaminación por polvo, a partir de distintas fuentes como se observa en la tabla 4, ocasionando riesgos de enfermedades respiratorias, afecciones oculares y molestias en la piel. Este material particulado se encuentra disperso en la atmósfera y puede mantenerse suspendido por largo tiempo. En la NC 111:2002 (13) se establecen las regulaciones para la vigilancia de la calidad del aire, las de mayor riesgo son las partículas en suspensión entre 3 y 10 μm de diámetro. Se establece como patrón primario para las partículas en suspensión una carga de 140 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. La carga resultante en un ingenio donde se apila bagazo es de 150 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (7). Estas partículas favorecen el desarrollo y transportación del *termo-Actinomiceto sacchari*, causante de la bagazosis (14) que, al penetrar en los pulmones, provocan la

formación de tumores cancerígenos (15). Este polvo presenta un riesgo de explosión ante la cercanía de una fuente de ignición, como en el caso de usar equipos de soldadura y corte de metales.

Tabla 4. Fuentes de generación de polvo, a partir de la biomasa cañera

Fuente	Manifestación	Medidas de mitigación
Pila a granel	Erosión de la pila por el viento	Plantar cortinas de árboles y montar barreras de contención de polvo.
Recolección y picado de los RAC en el campo	Levantamiento de nubes de polvo por los equipos recolectores	Uso de espejuelos protectores y filtro de aire para los trabajadores.
Preparación de los RAC en pacas en el patio	Generación de polvo en los molinos picadores	Colocar sistema de extracción de polvo en la nave
Carga del bagazo en camiones	Se arrastra polvo por el viento y se adhieren partículas de bagazo a las ruedas de vehículos	Uso de medios de protección. Limpieza del vehículo antes de abandonar el área
Transportación del bagazo en camiones	Generación de polvo por arrastre del viento	Cubrir la carga de los camiones con carpas
Transportadores de banda	Generación de polvo por arrastre del viento	Techar los transportadores
Formación de la pila mediante descargadores de cinta	Generación de nube de polvo	Colocar bajante de descarga para minimizar la altura de la caída del bagazo
Acarreo del bagazo con el cargador formando la pila	Generación de nube de polvo	Orientar la rampa de la pila en la dirección de los vientos.
Desbroce de la pila por cargadores frontales para el reclamo del bagazo.	Generación de nube de polvo	Se montan barreras de contención de malla plástica sobre la cerca perimetral del patio en sentido contrario al arrastre del polvo.
Tolvas de reclamo de bagazo	Al descargar el camión se genera polvo	Colocar protección de cortinas de goma
Desintegración de las pacas de bagazo	Generación de polvo en las desempacadoras	Colocar sistema de extracción de polvo en la nave

Debido al polvo también se afecta la maquinaria, los interruptores eléctricos y la instrumentación, por lo que deben hacerse frecuentes limpiezas de estos dispositivos. A los trabajadores de las áreas de manejo y almacenamiento de biomasa cañera, se les exige un chequeo médico con cierta periodicidad.

La contaminación odorífera o por malos olores, en actividades industriales, provoca malestar, molestias respiratorias, alteraciones psicológicas y de otra índole, aunque los olores no lleguen a ser tóxicos. Hasta donde se conoce, no existe en nuestro país legislación que regule o limite las emisiones de olor, de manera que las entidades involucradas deben mitigar su efecto.

El bagazo fresco no produce ningún olor agresivo; sin embargo, cuando se almacena de forma inadecuada puede producir mal olor, debido a su descomposición por la fermentación alcohólica, ya

que en su etapa final genera ácido acético que puede impactar en los trabajadores y en los núcleos poblacionales cercanos a la planta.

En cuanto a los riesgos por pendientes, debe tenerse en cuenta que las pilas a granel se construyen, fundamentalmente, en forma de cuña, con una inclinación entre de 27 y 30°, mediante la formación con cargador frontal. En el caso de camiones de menor envergadura, que transportan el bagazo subiendo la pila marcha atrás, es conveniente la revisión diaria del sistema de frenos para garantizar la operatividad del vehículo a mayores alturas y restringir pendientes entre 10 y 18°.

Los riesgos mecánicos de maquinaria y equipos, en el manejo y preparación de la biomasa cañera, se deben a fallas mecánicas causadas por desgaste, falta de mantenimiento e imprudencias de los operadores.

En cuanto a los riesgos asociados al transporte, se deben extremar las medidas en la conducción del vehículo por parte de su conductor, ya que los tracto-camiones alcanzan una longitud de unos 25 metros junto con su remolque, lo que constituye un foco potencial de accidentes, especialmente en vías de mayor densidad de tráfico. Los países que utilizan esta tecnología establecen importantes regulaciones de vialidad para minimizar estos riesgos.

Los riesgos generados por la electricidad están asociados, fundamentalmente, a fallas en motores eléctricos de los conductores de bagazo. En el diseño del patio, los conductores eléctricos y las líneas de alta tensión, deben estar alejados de la pila de bagazo.

En el almacenamiento en pacas, las pilas pueden alcanzar la altura de hasta 10 metros y dificultar el trabajo del gruero y sus auxiliares, que genera riesgos y exige un gran nivel de concentración y de pericia para evitar accidentes. En el almacenamiento a granel, las variantes que más se manejan, en la práctica, son pilas chiquitas con altura de la cresta de 10 m (16) y pilas grandes de 20 m de altura, ambas en forma de cuña, mediante cargadores frontales. En Cuba se acumuló una amplia experiencia en la formación de este tipo de pilas de 20 m de altura y de hasta 50 000 t bh (tonelada de bagazo húmedo), en la industria del papel. Se han dado casos en que los cargadores se han desplomado desde la cima de la pila. Se ratifica, entonces, la importancia del mantenimiento adecuado, la revisión técnica diaria y la conducción con cautela y precisión del equipo.

Cuando llueve fuerte, la superficie de la pila, hasta menos de un metro de profundidad, se lava y genera un efluente con arrastres de sólidos disueltos, provocando un incremento en la demanda química y biológica de oxígeno, que también contiene fenoles, taninos, entre otros y constituyen un riesgo potencial de contaminación de los reservorios de agua adyacentes.

El área de almacenamiento debe contar con un plan de respuesta ante las emergencias, así como un plan de prevención de riesgos, para lo cual se requiere la capacitación y preparación de todo el personal que labora en el área.

CONCLUSIONES

Se clasificaron los riesgos, también sus manifestaciones en el manejo y almacenamiento de la biomasa cañera. Asimismo, se identificaron sus orígenes y consecuencias. Finalmente, se propusieron medidas para su mitigación.

Los principales riesgos están asociados a: incendio de la biomasa, a la generación de polvo causante de la bagazosis, ruido y vibraciones en los molinos picadores de RAC, emanación de vapores, contaminación por las aguas de drenaje de las pilas y mal olor en los patios de almacenamiento. Otros riesgos están relacionados con equipos de manejo y transporte de biomasa, debido a la generación de gases de efecto invernadero y a fallas de maniobrabilidad, ya que los cargadores operan entre 10 y 20 m de altura, y los camiones y sus remolques alcanzan más de 25 m de largo.

La política de seguridad y salud ocupacional y de protección del medioambiente, correspondiente al manejo y almacenamiento de la biomasa cañera se formulará por los directivos de la bioeléctrica y será de conocimiento de los trabajadores. El área de almacenamiento debe contar con un plan de prevención de riesgos, para la que se requiere la capacitación y preparación de todo el personal. Los riesgos y efectos ambientales del uso de la biomasa cañera deben evaluarse cuidadosamente y tener en cuenta la dimensión de los impactos, antes de extender su uso a gran escala.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CITMA. Primera Comunicación Nacional de la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre Cambio Climático. Octubre, 2001.
2. Freiberg A y otros. The Use of Biomass for Electricity Generation: A Scoping Review of Health Effects on Humans in Residential and Occupational Settings, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 15(2), 354. 2018
3. *García, S. Centrales Termoeléctricas de Biomasa Editorial: Renovetec (España). ISBN 9788461615575. 400 páginas. 2015*
4. Zayas, C. Conversando con la ingeniera Bárbara Hernández acerca de las bioeléctricas en Cuba. *Revista ATAC*, No. 3. ISSN 0138-7553. 2017
5. Purchase B.C, Rosettenstein, S and Bezuidenhout, D.V. Challenges and potential solutions for storage of large quantities of bagasse for power generation. *Proc S Afr Sug Technol Ass.* 86: 495 – 513, 2013.
6. Rohr A.C., Campleman S.L., Long C.M., Peterson M.K., Weatherstone S., Quick W., Lewis A. Potential Occupational Exposures and Health Risks Associated with Biomass-Based Power Generation. *Int. J. Environ. Res. Public Health*; 12:8542–8605. 2015.
7. Gil, Z. Estudio del impacto ambiental del uso del bagazo como fuente de energía en centrales azucareros en Cuba. Estudio de caso “Melanio Hernández”. TESIS DOCTORAL. Matanzas. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10803/50994>. 2005
8. Villegas, P y Colaboradores Estudio de la calidad del aire en instalaciones azucareras. *Centro Azúcar*, 4,85 -92. 2005
9. Norma NC-19-01-04
10. Norma NC 19-01-05
11. Lokapure, R.B; Kadam; A.P; Nerle, V.B. Fire Protection of Sugarcane Bagasse –A Case Study Of Renuka Sugar's 30 MW Co-Generation Plant at Ichalkranji. *International Journal of Engineering Research and Applications (IJERA)* ISSN: 2248-9622 Vol. 2, Issue 4, July-August, pp.1617-1620. 2012.
12. Macaskill, M. J; and Gray, B. F. A reaction-diffusion model of stored bagasse. *ANZIAM* , J. 4313-34, 2001
13. Norma NCIII:2002
14. Lacey, J. *Thermoactinomyces sacchari* sp. nov., a thermophilic actinomycete causing bagassosis. *Journal of General Microbiology* 66, 327-338. 1971.
15. Lois-Correa J, Flores-Vela A, Artega-Grimaldo and Berman-Delgado J. Experimental evaluation of sugar cane bagasse storage in bales. *J Appl Res Technol* 8(3): 365-375. 2010.
16. Cusi, D.S. Methods for *bagasse conservation*, pile formation and handling procedures: *Sugar y Azúcar*. Vol.75 No.8 pp.39 -51. 1980.

Producción de carotenoides a partir de *Rhodotorula*: una revisión

Nayra Ochoa-Viñals y Evelyn Faife-Pérez

Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA).

Vía Blanca No. 804 y Carretera Central, La Habana, Cuba.

nayra.ochoa@icidca.azcuba.cu

evelyn.faife@icidca.azcuba.cu

RESUMEN

Rhodotorula pertenece al grupo de las levaduras productoras de pigmentos, tales como β -caroteno, γ -caroteno, toruleno y torularhodina. Los carotenoides tienen grandes aplicaciones en la industria de los alimentos y piensos, así como en los productos para la salud y los cosméticos, estos han generado un valor en el mercado que se espera que alcance más de 2 mil millones para 2022. Debido a la creciente demanda y a la preocupación por la seguridad alimentaria, se ha incrementado la búsqueda de estrategias de producción de carotenoides de origen natural, favoreciendo la fermentación microbiana. Esta revisión resume las propiedades biológicas de los carotenoides y los diferentes métodos de ingeniería metabólica aplicados para mejorar la producción de estos pigmentos a partir de *Rhodotorula*. Los enfoques prácticos para mejorar los rendimientos de carotenoides han sido facilitados por los avances en el trabajo de mejoramiento genético de las cepas, así como en la optimización de medios y condiciones de fermentación.

Palabras clave: *Rhodotorula*, levaduras oleaginosas, carotenoides, β -Caroteno.

ABSTRACT

Rhodotorula is a group of pigment-producing yeasts well known for its intracellular biosynthesis of carotenoids such as β -carotene, γ -carotene, torulene and torularhodin. The great potential of carotenoids in applications in food and feed as well as in health products and cosmetics has generated a market value expected to reach over \$2.0 billion by 2022. Due to growing public concern over food safety, the demand for natural carotenoids is rising, and this trend significantly encourages the use of microbial fermentation for natural carotenoid production. This review covers the biological properties of carotenoids and the most recent findings on the carotenoid biosynthetic pathway, as well as strategies for the metabolic engineering methods for the enhancement of carotenoid production by *Rhodotorula*. The practical approaches to improving carotenoid yields, which have been facilitated by advancements in strain work as well as the optimization of media and fermentation conditions, were summarized respectively.

Key words: *Rhodotorula*, oleaginous yeast, carotenoids, β -Carotene.

INTRODUCCIÓN


Rhodotorula es un género de levadura unicelular pigmentada, que pertenece al *phylum Basidiomycota*, familia *Cryptococcaceae*, subfamilia *Rhodotorulodae* (1). Se han informado 164 especies del género *Rhodotorula*, incluidas *R. glutinis*, *R. toruloides*, *R. mucilaginosa*, *R. graminis*, entre otras variedades. Son levaduras saprofitas ubicuas y pueden encontrarse en diferentes hábitats, tales como aire, tierra y estiércol, así como en los cuerpos de animales, plantas y algunos organismos inferiores. Las células de *Rhodotorula* son polifiléticas, con apariencia subglobosa, ovoide, elipsoidal y alargadas. La reproducción es asexual y, generalmente, ocurre a través de brotes multilaterales (2).

Una de las características más notables de *Rhodotorula* es la biosíntesis de carotenoides de forma natural. El 90 % de los carotenoides producidos son torularhodina, toruleno, γ -caroteno y β -caroteno (3). En la tabla 1 se muestran algunos ejemplos. Este género tiene la capacidad de producir altas concentraciones de lípidos (que se acumulan en condiciones limitantes de nutrientes, como un mecanismo de almacenamiento de carbono) y de enzimas importantes. Estos productos son fundamentales para la industria: los lípidos y compuestos derivados de lípidos, que son buenos sustitutos del petróleo en la producción de combustibles y productos químicos, las altas actividades enzimáticas de la L-fenilalanina amoniaco-liasa y la D-aminoácido oxidasa hacen a esta levadura necesaria para la industria químico-farmacéutica (4).

Los carotenoides han sido reconocidos en todo el mundo como aditivos alimentarios y suplementos nutricionales, por sus funciones biológicas, tales como: el efecto antioxidante, la mejora de la respuesta inmune, los efectos preventivos contra enfermedades cardiovasculares, enfermedades oculares y cáncer, respectivamente (5,6).

Hoy en día, los carotenoides son usados como aditivo alimentario en EE.UU, Australia y Nueva Zelanda. Estadísticamente, el mercado global de carotenoides alcanzó los 1.5 mil millones en el 2017 y deberá incrementarse hasta los 2.0 mil millones para el 2022, con un aumento de 5.7 % durante este período (7). Actualmente, más del 90 % de los carotenoides comerciales son producidos por síntesis química; sin embargo, la producción a partir de levadura es natural y orgánica, además de las ventajas adicionales como el tiempo de producción más corto, amigable con el medioambiente y fácil escalado en los procesos de fermentación.

Tabla 1. Comparación de la capacidad de diferentes microorganismos para producir carotenos

	Microorganismo	Sustrato	Carotenoides mg/g peso seco celular	Carotenoides mg/L	Ref.
	<i>Rhodotorula glutinis</i>	Glucosa	0.11	0.63	(3)
	<i>Rhodotorula graminis</i>	Glucosa	0.16	1.47	(3)
	<i>Rhodotorula toruloides</i>	Glucosa	0.12	1.31	(3)
	<i>Rhodotorula toruloides</i>	Glucosa	0.28	27.5	(48)
	<i>Rhodotorula paludigenum</i>	Glucosa	0.40	2.99	(47)
	<i>Rhodotorula roseus</i>	Glucosa	0.08	0.63	(3)
	<i>Rhodotorula salmonicolor</i>	Glucosa	0.35	0.61	(3)
	<i>Rhodotorula rhodozyma</i>	Glucosa	0.21	1.48	(46)

La biomasa de *Rhodotorula* puede ser usada como fuente proteica de alta calidad y como un valioso aditivo para piensos animales. Este género tiene la capacidad de crecer a diferentes temperaturas y pH (8). Utiliza diversas fuentes de carbono y energía, por ejemplo, monosacáridos que incluyen hexosas y pentosas; oligosacáridos tales como sacarosa, maltosa, celobiosa, trehalosa, rafinosa y melezitosa; alcoholes como etanol, glicerol, manitol y sorbitol; ácidos orgánicos como acetato, lactato, succinato, citrato y ácidos grasos de cadena larga, así como ácido D-galacturónico (9). Se han demostrado la robustez de *Rhodotorula* en términos de resistencia contra inhibidores derivados de la biomasa lignocelulósica (10,11) y la efectividad con varias fuentes de nitrógeno tales como el amonio, nitrato, cadaverina, aminoácidos y péptidos pequeños (12).

A pesar que las potencialidades biotecnológicas de este microorganismo fueron descubiertas desde la década de 1950, la mayoría de los trabajos para el desarrollo de bioprocesos y aplicaciones se han llevado a cabo en la última década, que coincide con la primera publicación de su secuencia genómica, seguida de la generación de herramientas genéticas.

Esta revisión presenta el *Rhodotorula* como un microorganismo industrial emergente, empleado para la producción de una gran variedad de productos relevantes para la industria, entre los cuales se encuentran los carotenoides, por lo que en este estudio se revisaron las vías de biosíntesis de los carotenoides por *Rhodotorula* y las estrategias para su producción.

Vía de biosíntesis de los carotenoides en *Rhodotorula*

Se han estudiado las vías biosintéticas de los carotenoides en un grupo de especies del *Rhodotorula*, se ha demostrado que *R. minuta*, *R. glutinis*, *R. graminis*, *R. mucilaginosa* y *Rhodotorulasp* poseen perfiles de carotenoides analógicos con los β -caroteno, γ -caroteno, toruleno y torularhodina, que representan los principales carotenoides en todas estas especies. Estos enfoques permitieron llegar a la conclusión de que el género *Rhodotorula* posee una vía biosintética de carotenoides idéntica o conservada (figura 1) (13).

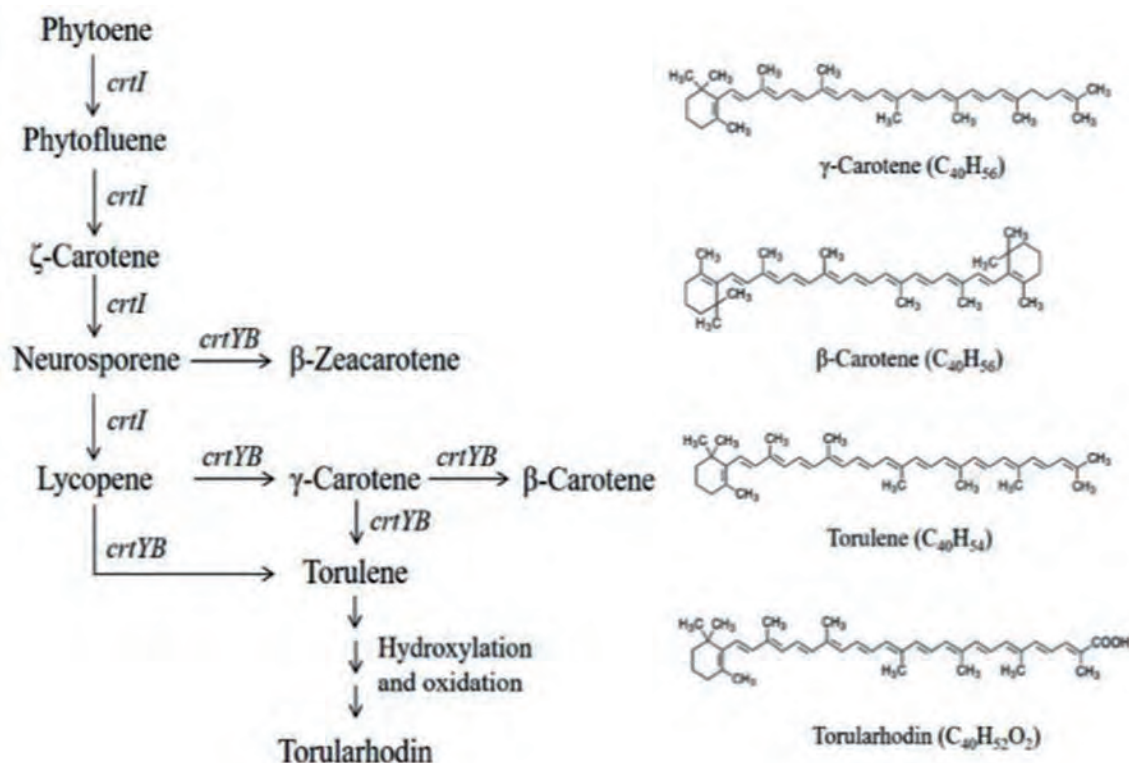


Figura 1. Vía biosintética de los carotenoides en especies del *Rhodotorula*, elaborada por Tang *et al.* (13).

Se ha descrito que esta ruta metabólica sigue una cascada de condensaciones consecutivas de unidades isoprenoides en fitoeno, el primer carotenoide incoloro de la vía. El fitoeno se deshidrogena continuamente y el doble enlace conjugado se extiende hasta la formación en licopeno.

Existen dos rutas de ciclación independientes que conducen a dos vías, una los γ -caroteno o toruleno como producto intermedio, que puede convertirse, además, en β -caroteno y torularhodina, respectivamente.

Principales carotenoides y su fisiología en *Rhodotorula*

β -caroteno y γ -caroteno

El β -caroteno es uno de los pigmentos más conocidos, por haber sido ampliamente utilizado en medicamentos, productos para la salud, aditivos alimentarios, cosméticos, aditivos para piensos y

otros productos en otras industrias. También ha sido aprobado como aditivo alimentario y alimenticio por sus funciones duales como colorante y por su uso nutritivo, en más de 50 países.

Estructuralmente, el β -caroteno es un caroteno liposoluble de color amarillo-anaranjado, con 11 dobles enlaces conjugados y 2 grupos retinilos (anillo de β -ionona). Es este gran número de dobles enlaces lo que se une a su cadena y anillos de polieno, que lo hace propenso a ser oxidado por los radicales libres. Y esta propiedad le otorga una alta actividad antioxidante y permite sus amplias aplicaciones como alimentos y piensos (13). Para fines médicos y en la salud, el β -caroteno se ha prescrito por vía oral para la prevención de cáncer, tumores y enfermedades cardiovasculares. Dentro de los pigmentos de las cepas del *Rhodotorula*, el β -caroteno representa, aproximadamente, el 70 % de los carotenoides totales (14).

El γ -caroteno es el isómero del β -caroteno, estructuralmente contiene 11 dobles enlaces conjugados, un doble enlace no conjugado y un grupo retinilo. Funcionalmente, γ -caroteno tiene actividad de vitamina A (aunque menos que β -caroteno), gracias a su único grupo retinilo (15). Se forma por ciclación de licopeno, a través de la reacción enzimática catalizada por licopeno ϵ -ciclase.

Toruleno y Torularhodina

El torularhodina se aisló por primera vez en la década de 1930, a partir del *Rhodotorula* (16). Bonner *et al.* informaron el descubrimiento de toruleno de *R. rubray*, lograron la sobreproducción de este metabolito (equivalente al 76 % de los carotenoides totales) aplicando un mutante de *R. rubra* (17). No fue hasta la década de 1990 que el toruleno y torularhodina fueron considerados como sustancias potencialmente valiosas (18).

El toruleno se deriva de la sustracción de 2H de γ -caroteno, con la formación de un doble enlace extra en el carbono 13C; es decir, 13 dobles enlaces, mientras que se forma la torularhodina del toruleno, mediante la sustitución de un grupo metilo con un grupo carboxilo (14 dobles enlaces). Ambos carotenoides contienen anillos con la estructura de β -ionona, que es el esqueleto de la vitamina, ambos pueden ser posibles precursores de la vitamina A. En comparación con el β -caroteno, el toruleno y la torularhodina han demostrado mayor actividad antioxidante, gracias a la existencia de un doble enlace conjugado en el carbono 13C (19). Este doble enlace extra dotó a la torularhodina de una mayor capacidad para eliminar los radicales de peróxido de hidrógeno y una mayor resistencia a la degradación del sustrato, en comparación con el de β -caroteno (20).

Además de la actividad antioxidante, se han demostrado propiedades anticancerígenas *in vivo* de dos carotenoides. En los experimentos de actividad anticancerígena en comparación con el licopeno, tanto el toruleno como la torularhodina inhibieron el crecimiento del cáncer de próstata de forma más significativa, por la inducción de la apoptosis en células tumorales (21). Además, se confirmó que ambos incrementaron la actividad protectora en las células del estroma prostático, por daño por estrés oxidativo (22). La actividad antimicrobiana de estos dos carotenoides también ha sido informada. Se ha demostrado su empleo en la prevención de infecciones, particularmente en implantes, productos y preparaciones médicas que requieren productos naturales antimicrobianos. Además, la torularhodina es uno de los pocos carotenoides con función de ácido carboxílico.

Estrategias para mejorar la producción de carotenoides por *Rhodotorula*

Búsqueda de cepas nativas productoras de carotenoides

Varios grupos de investigadores se han enfocado en la búsqueda para satisfacer la creciente demanda de carotenoides naturales, el desarrollo y la utilización de cepas carotenoides de alto rendimiento. Hasta ahora *Phaffiarhodozyma*, la levadura pigmentada más utilizada para la producción de carotenos a gran escala, por ejemplo, astaxantina.

El *Rhodotorula* se ha evaluado para la producción de carotenoides, particularmente para la producción de mezclas de carotenoides en mayores cantidades. Por ejemplo, una cepa nativa de *R. mucilaginosa* CRUB 0138, fue aislada en el lago patagónico de gran altitud Toncek, la cual produce carotenoides a una concentración de $234 \pm 7 \mu\text{g/g}$, después de 4 días de incubación, cuando la concentración inicial de glucosa se ajustó al 1 % (23). Se logró un rendimiento de carotenoides de 33.2 mg/g, a partir de *R. glutinis*, cepa aislada de las aguas residuales de refinería, cuando se cultivó en un medio que contenía lactosa de suero como fuente de carbono y nitrógeno (24). La levadura *Rhodotorula* sp cepa KF-104 aislada a partir de residuo vegetal, produce una mezcla de carotenoides, tales como los β -caroteno, γ -caroteno, toruleno y torularhodina, respectivamente (25).

Evaluación de las condiciones de cultivo para la producción de carotenoides

Varios estudios han tratado de mejorar la producción de carotenoides en *Rhodotorula* mediante la optimización de condiciones de cultivo. Se ha evaluado el efecto del pH del medio de cultivo sobre la producción de carotenoides y lípidos por *R. toruloides*, con uso de citometría de flujo. Se ha demostrado que el pH óptimo para la producción de biomasa y lípidos es de 4, mientras que el pH óptimo para los carotenoides es de 5 (26).

Días *et al.* (27) informaron que el cultivo por lotes con alimentación controlada por pH era una estrategia para aumentar la producción de carotenoides (0.29 g/Lh) (27). Otro trabajo analizó la importancia de los componentes del medio de cultivo sobre la producción de lípidos y caroteno, por la metodología de superficie de respuestas y observó un aumento del 10 % (p/v) en la producción de carotenoides (28).

La biosíntesis y la acumulación de carotenoides también pueden ser regulados por la incidencia de la luz, más específicamente por la fotoinducción, que puede mejorar los rendimientos de carotenoides al promover el crecimiento y la densidad celular, así como elevar la actividad de las enzimas involucradas en la biosíntesis de carotenoides. Zhang *et al.* (29) informaron que la irradiación causaba mejoras significativas de la biomasa y producción de carotenoides de *R. glutinis* (29). En general, la oxidación inducida por la luz o los daños por la radiación, puede limitar el crecimiento de algunas especies, particularmente aquellos microorganismos que carecen de una adecuada producción de las sustancias fotoprotectoras intracelulares. Sakaki *et al.* (30) demostraron la mejora del rendimiento de carotenoides facilitada por la luz blanca débil, ya que se produjo un aumento de 180 % de torularhodina y 14 % de β -caroteno, a partir de *R. glutinis* (30).

La temperatura es otro factor importante que afecta la biosíntesis de carotenoides, puede afectar la propagación de cepas productoras de carotenoides e influye en su proporción. Se ha descrito que las concentraciones relativas de carotenoides producidos por *R. glutinis* son diferentes cuando se han cultivado a 4 °C y a 25 °C (31). Se encontró que a 25 °C, toruleno y torularhodina representaron aproximadamente, el 30 % de los carotenoides totales respectivamente, mientras que a 5 °C, la proporción de β -caroteno aumentó a un 64 %, en contraste con el contenido de los otros dos carotenoides disminuyó significativamente (31). Buzzini y Martini destacaron que en *R. glutinis*, a temperatura más baja (25 °C), se favoreció la síntesis de β -caroteno y toruleno, mientras que a mayores temperaturas (30 ~ 35°) se incrementó la producción de torularhodina (32).

Se ha demostrado que muchos iones metálicos (Ba_2^+ , Fe_2^+ , Mg_2^+ , Ca_2^+ , Zn_2^+ y Co_2^+) son capaces de afectar la carotenogénesis del *Rhodotorula*, posiblemente porque la actividad de las enzimas en las vías de biosíntesis es regulada por estos cationes. Buzzini *et al.* señalaron que los iones metálicos podrían afectar selectivamente el perfil de carotenoides de *R. graminis* DBVPG 7021, y se demostró que Al_3^+ y el Zn_2^+ promovieron la producción de β -caroteno y γ -caroteno, mientras que Zn_2^+ y Mn_2^+ inhibieron la producción de toruleno y torularhodina (33).

Además, la composición de solventes exógenos, químicos o agentes naturales pueden afectar los carotenoides de diversas maneras. Kim *et al.* informaron que el contenido de β -caroteno en

R. glutinis aumentó en un 35 % cuando se añadió fenol a los medios de cultivo y, en contraste, se observó una disminución en torularhodina cuando la concentración de fenol fue elevada (34). Squina y Mercadante evaluaron la adición de 5 μmol de difenilamina en el cultivo de *R. rubra* y *R. glutinis*, logrando un incremento de los carotenoides, sin embargo provocó disminución significativa de la relación de torularhodina/ toruleno. Es de destacar que para ambas cepas, la acumulación de β -caroteno se favoreció al aumentar la suplementación de difenilamina (a una concentración mayor de 10 μmol). La biosíntesis de carotenoides se inicia en la fase de logaritmo tardío y en la fase de estacionaria, típico del metabolismo de los metabolitos secundarios (35).

Mejora de la síntesis de carotenoides por mutagénesis

La mutagénesis físico-química o de inserción para mejorar la producción de carotenoides ha sido menos estudiada. Las mutagénesis físico-química, tal como la mutagénesis por plasma a temperatura ambiente (ARTP) y nitrosoguanidina (NTG), se han aplicado para seleccionar la cepa mutante, basada en el color de la colonia; por ejemplo, se logró producir 0.75 mg de carotenoides/g en condiciones de limitación de nitrógeno (36). Lin *et al.* modificaron el perfil de producción de carotenoides, al crear una biblioteca de mutantes de inserción por transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT). Los tres mutantes seleccionados por cambio de color mostraron un aumento de 2.4 veces los carotenos, un aumento de nueve veces en toruleno, y un aumento de 1.7 veces en β -caroteno (37).

Tabla 2. Producción de carotenoides por diferentes cepas de *Rhodotorula*, tratadas por varios métodos de mutagénesis

Microorganismo	Mutagénesis	Carotenoides	Control		Tratamiento		Ref.
			mg/g	mg/L	mg/g	mg/L	
<i>R. glutinis</i> NCIM 3353	Radiación UV	Total de carotenos	0.12	2.2	2.9	33	(43)
<i>R. rubra</i> GED8	NTG	Total de carotenos	0.187	2.67	0.64	8.12	(46)
<i>R. glutinis</i> RG6	Alta presión hidrostática (HHP)	β -caroteno	-	6.34	-	10.01	(44)
<i>R. glutinis</i> NR-98	Ultra alta presión /baja energía del ion nitrógeno	β -caroteno	-	6.03	-	17.36	(46)
<i>R. acheniorum</i>	UV, etil metano sulfonato (EMS), y NTG	β -caroteno	2.31	40.6	10.69	262.12	(47)

Bhosale *et al.* obtuvieron un mutante de *R. glutinis* NCIM3353 mediante radiación UV, con el cual se incrementó el rendimiento de producción de β -caroteno en 120 veces en comparación con el de la cepa nativa (38). Del mismo modo, Wang *et al.* lograron aumentar el rendimiento en un 57.89 % de β -caroteno en *R. glutinis* cepa mutante RG6p, mediante el uso de cinco ciclos repetidos de alta presión hidrostática (39). Se mejoró significativamente el rendimiento de carotenoides en *R. mucilaginoso* cepa RM-1, mediante la mutagénesis, utilizando la implantación del ion N^+ con 10 keV y $2.0 \times 10^{14} \text{ ion/cm}^2$ (40). Se logró aumentar en 3 veces la biosíntesis de carotenoides por la combinación de diferentes estrategias de mutagénesis, a través de UV, EMS y NTG (41). Se evaluó en *R. glutinis* el efecto de diversos métodos de mutagénesis, y se evidenció que la irradiación de UV mejoró la producción de pigmentos en comparación con la mutagénesis con ázida de sodio (42).

La ingeniería metabólica se ha utilizado para cultivar y separar carotenoides, normalmente acumulados dentro de las células de cultivos de *R. toruloides*. Lee *et al.* declararon que el transportador de membrana de resistencia a fármacos pleiotrópicos PDR10 de *Saccharomyces cerevisiae*, permitió la exportación de carotenoides al medio de cultivo y la separación de lípidos intracelulares (43).

La aplicación de nuevas herramientas biológicas para modificar las rutas de los carotenoides de *R. toruloides* pudieran aumentar la producción de este metabolito.

Empleo de sustratos de bajo costo para la producción de carotenoides

El costo de los componentes de los medios es un tema crucial en cualquier proceso biotecnológico. El precio de las fuentes de carbono y nitrógeno pueden representar hasta el 70–85 % del costo total del bioproceso. Por lo tanto, el empleo de fuentes de carbonos baratas pudieran hacer, en principio, un proceso económicamente factible (44).

La levadura *R. toruloides* puede crecer, naturalmente, en una amplia gama de fuentes de carbono y presenta una buena tolerancia a compuestos inhibidores encontrados en sustratos no refinados, tales como los materiales lignocelulósicos y los residuales de destilería del alcohol (45). Para la producción de carotenoides por fermentación de *Rhodotorula*, la forma más económica de la reducción de costos es utilizar materias primas agroindustriales y subproductos, en lugar de usar componentes definidos como se encuentran en medios comerciales (46). La tabla 3 resume los ejemplos de producción de carotenoides con materias primas de bajo costo. Como se muestra, la producción de carotenoides depende de los componentes de medios, tales como las fuentes de carbono y nitrógeno y la proporción de minerales y otros componentes. Un aumento en el rendimiento puede lograrse, simplemente, mediante la optimización de los medios de cultivo.

Tabla 3. Producción de carotenoides por diferentes cepas de *Rhodotorula*, cultivada en sustratos de bajo costo

Microorganismo	Sustratos	Carotenoides	Control		Tratamiento		Ref.
			mg/g	mg/L	mg/g	mg/L	
<i>R. glutinis</i> CCY20-2-26	Suero	β -caroteno	0.48	17.93	1.03	45.68	(48)
<i>R. glutinis</i> ATCC 4054	Salvado de arroz	β -caroteno	1.23	-	3.2	-	(49)
<i>R. glutinis</i> MT-5	Residuales de plumas de pollo	Carotenos totales	5.76	60	6.47	92	(50)
<i>R. mucilaginosa</i> CCY20-7-31	Papa	β -caroteno	0.16	4.31	1.86	55.91	(51)
<i>R. mucilaginosa</i> NRRL-2502	Aceite de algodón	Carotenos totales	-	39.5	-	57.6	(52)
<i>R. aurantiaca</i>	Residuales de glicerol	β -caroteno	0.34	-	1.08	-	(53)
<i>R. glutinis</i>	Melazas	Carotenos totales	4.5	-	-	-	(54)

Existe un interés, tanto académico como industrial, en las investigaciones relacionadas con las levaduras *Rhodotorula*, esta combinación puede brindarnos un salto importante en las aplicaciones biotecnológicas. El desarrollo de herramientas para su ingeniería, está generando una gran expansión del número de laboratorios, en todo el mundo, que usan *Rhodotorula*.

CONCLUSIONES

Rhodotorula es bien conocido por sus potencialidades, en la producción de carotenoides, estos compuestos no solo sirven como excelentes colorantes, sino también se presentan como un grupo de productos naturales utilizados en múltiples aplicaciones. Estos han sido empleados en alimentos, medicinas, productos de salud, cosméticos y aditivos para piensos. El crecimiento poblacional y la

preocupación por la seguridad alimentaria instan al suministro de carotenoides de origen natural, y la producción de carotenos por fermentación microbiana sobre otras opciones, a pesar de que no es aún la vía más rentable.

Elaborar estrategias para la producción de carotenoides, a partir de *Rhodotorula*, es una realidad, debido a la disponibilidad y potencialidad de las herramientas de ingeniería genética y metabólica. Además de la experiencia y el desarrollo industrial, a base de los sistemas con levaduras.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hawksworth, DL, Kirk PM, Sutton BC, Pegler DN. 1996. Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi. Revista Do Instituto De Medicina Tropical De São Paulo 38: 17-19.
2. Kurtzman CP. 2011. The Yeasts, a Taxonomic Study, pp. 233-234. 5th Ed. Taylor & Francis, London.
3. Buzzini P, Innocenti M, Turchetti B, Libkind D, Van BM, Mulinacci N. 2007. Carotenoid profiles of yeasts belonging to the genera *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Sporobolomyces*, and *Sporidiobolus*. Can. J. Microbiol. 53: 1024-1031.
4. Wirth F, Goldani LZ. 2012. Epidemiology of *Rhodotorula*: an emerging pathogen. Interdiscip. Perspect. Infect. Dis. 2012: 465717.
5. Passoth, V.; et al. 2017. Lipids of yeasts and filamentous fungi and their importance for biotechnology. In Biotechnology of Yeasts and Filamentous Fungi (Sibirny, A., ed.), pp. 149–204, Springer.
6. Prabhala RH, Braune LM, Garewal HS, Watson RR. 2010. Influence of beta-carotene on immune functions. Ann. NY Acad. Sci. 691: 262-263.
7. Hennekens CH. 1997. β -Carotene supplementation and cancer prevention. Nutrition 13: 697-699.
8. Libkind D, Sampaio JP. 2006. Yeast diversity in the extreme acidic environments of the Iberian Pyrite Belt. Microb Ecol. 52:552-63.
9. Jagtap SS, Rao CY. 2018. Production of D-arabitol from D-xylose by the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* IFO0880. Appl Microbiol Biotechnol. 102:143-51.
10. Hu C, Zhao X, Zhao J et al. 2009. Effects of biomass hydrolysis by-products on oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. Bioresour Technol. 100 :4843–7.
11. Nogué VS, Black BA, Kruger JS, et al. 2018. Integrated diesel production from lignocellulosic sugars via oleaginous yeast. Green Chem. 20:4349 –65.
12. Li Q, Kamal R, Wang Q et al. 2020. Lipid production from amino acid wastes by the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. Energies; 13:1576.
13. Tang W, Wang Y, Zhang J, Cai Y, and He Z. 2019. Biosynthetic Pathway of Carotenoids in *Rhodotorula* and Strategies for Enhanced Their Production J. Microbiol. Biotechnol. 29(4), 507–517.
14. Landolfo S, Ianiri G, Camiolo S, Porceddu A, Mulas G, Chessa R, et al. 2018. CAR gene cluster and transcript levels of carotenogenic genes in *Rhodotorula mucilaginosa*. Microbiology 164: 78-87.
15. Kot AM, Błażej S, Gientka I, Kieliszek M, Bryś J. 2018. Torulene and torularhodin: “new” fungal carotenoids for industry? Microb. Cell. Fact. 17: 49.
16. Azmi Wamik TM, Kumari Priyanka. 2011. Production of a heat stable β -carotene with antioxidant activity by *Rhodotorula* sp. Int. Food Ferment. Technol. 1: 83-91.
17. Bonner J, Sandoval A, Tang YW, Zechmeister L. 1946. Changes in polyene synthesis induced by mutation in a red yeast. Arch. Biochem. 10: 113.

18. Razavi SH, Marc I. 2006. Effect of temperature and pH on the growth kinetics and carotenoid production by *Sporobolomyces ruberrimus* H110 using technical glycerol as carbon source. Iran. J. Chem. Chem. Eng. 25: 59-64.
19. Ungureanu C, Ferdes M. 2012. Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Activities of Torularhodin. Adv. Sci. Lett. 18: 50-53.
20. Sakaki H, Nochide H, Komemushi S, Miki W. 2002. Effect of active oxygen species on the productivity of torularhodin by *Rhodotorula glutinis* No.21. J. Biosci. Bioeng. 93: 338-340.
21. Du C, Li Y, Guo Y, Han M, Zhang W, Qian H. 2016. The suppression of torulene and torularhodin treatment on the growth of PC-3 xenograft prostate tumors. Biochem. Biophys. Res. Commun. 469: 1146-1152.
22. Chao D, Guo Y, Cheng Y, Mei H, Zhang W, He Q. 2017. Torulene and torularhodin, protects human prostate stromal cells from hydrogen peroxide-induced oxidative stress damage through the regulation of Bcl-2/Bax mediated apoptosis. Free Radic. Res. 51: 113-123.
23. Libkind D, Brizzio S, Van BM. 2004. *Rhodotorula mucilaginosa*, a carotenoid producing yeast strain from a Patagonian high altitude lake. Folia. Microbiol. 49: 19-25.
24. Aksu Z, Eren AT. 2007. Production of carotenoids by the isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*. Biochem. Eng. J. 35: 107-113.
25. Tkačová J FK, Klempová T, et al. 2015. Screening of carotenoid producing *Rhodotorula* strains isolated from natural sources. Acta Chimica Slovaca 8: 34-38.
26. Freitas C, Nobre B, Gouveia L, Roseiro J, Reis A, da Silva TL. 2014. New at-line flow cytometric protocols for determining carotenoid content and cell viability during *Rhodospiridium toruloides* NCYC 921 batch growth. Process. Biochem. 49, 554-562.
27. Dias C, Silva C, Freitas C, Reis A, da Silva TL. 2016. Effect of medium pH on *Rhodospiridium toruloides* NCYC 921 carotenoid and lipid production evaluated by flow cytometry. Appl. Biochem. Biotechnol. 179, 776-787.
28. Singh G, Jawed A, Paul D, Bandyopadhyay KK, Kumari A, Haque S. 2016 Concomitant production of lipids and carotenoids in *Rhodospiridium toruloides* under osmotic stress using response surface methodology. Front. Microbiol. 7, 1686.
29. Zhang Z, Zhang X, Tan T. 2014. Lipid and carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* under irradiation/high temperature and dark/low-temperature cultivation. Bioresour. Technol. 157: 149-153.
30. Sakaki H, Nakanishi T, Tada A, Miki W, Komemushi S. 2001. Activation of torularhodin production by *Rhodotorula glutinis* using weak white light irradiation. J. Biosci. Bioeng. 92: 294-297.
31. Bhosale P, Gadre RV. 2001. Production of β -carotene by a *Rhodotorula glutinis* mutant in sea water medium. Bioresour. Technol. 76: 53-55.
32. Buzzini P, Martini A. 2000. Production of carotenoids by strains of *Rhodotorula glutinis* cultured in raw materials of agro-industrial origin. Bioresour. Technol. 71: 41-44.
33. Buzzini P, Martini A, Gaetani M, Turchetti B, Pagnoni UM, Davoli P. 2005. Optimization of carotenoid production by *Rhodotorula graminis* DBVPG 7021 as a function of trace element concentration by means of response surface analysis. Enzyme. Microb. Technol. 36: 687-692.
34. Kim BK, Park PK, Chae HJ, Kim EY. 2004. Effect of phenol on β -carotene content in total carotenoids production in cultivation of *Rhodotorula glutinis*. Korean. J. Chem. Eng. 21: 689-692.
35. Squina FM, Mercadante AZ. 2010. Influence of nicotine and diphenylamine on the carotenoid composition of *Rhodotorula* strains. J. Food. Biochem. 29: 638-652.
36. Zhang, C. Shen H, Zhang X, Yu X, Wang H, Xiao Sh, Wang J, Zhao ZK. 2016. Combined mutagenesis of *Rhodospiridium toruloides* for improved production of carotenoids and lipids. Biotechnol. Lett. 38, 1733-1738.

37. Lin, X., Gao N, Liu S, Zhang S, Song S, Ji Ch, Dong X, Su Y, Zhao Z K, Zhu B. 2017. Characterization the carotenoid productions and profiles of three *Rhodospiridium toruloides* mutants from *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Yeast* 34, 335–342.
38. Bhosale P, Gadre RV. 2010. Manipulation of temperature and illumination conditions for enhanced β -carotene production by mutant 32 of *Rhodotorula glutinis*. *Lett. Appl. Microbiol.* 34: 349-353.
39. Wang SL, Sun JS, Han BZ, Wu XZ. 2010. Optimization of beta-carotene production by *Rhodotorula glutinis* using high hydrostatic pressure and response surface methodology. *J. Food. Sci.* 72: 325-329.
40. Liu S, Li Q, Liu HL, Jia T, Xie DP. 2012. Mutation breeding of high-yield carotenoid producing *Rhodotorula mucilaginosa* by N⁺ implantation and optimization of solid-state fermentation conditions for carotenoid production. *Food Sci.* 23: 244-248.
41. Cong L, Chi Z, Li J, Wang X. 2007. Enhanced carotenoid production by a mutant of the marine yeast *Rhodotorula* sp. *hidai*. *J. Ocean. U. China.* 6: 66-71.
42. Yolmeh M, Khomeiri M. 2016. Using physical and chemical mutagens for enhanced carotenoid production from *Rhodotorula glutinis* (PTCC 5256). *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 8:158-166.
43. Lee JJ, Chen L, Cao B, Chen NW. 2016. Engineering *Rhodospiridium toruloides* with a membrane transporter facilitates production and separation of carotenoids and lipids in a bi-phasic culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 869–877.
44. Xiaozan D., Hongwei S., Qiang L., Kamal R., Qian W., Xue, Zhao ZK. 2019. Microbial Lipid Production from Corn Stover by the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* using the PreSSLP Process. *Energies*, 12:1053.
45. Valdés G, Teixeira RM, Aggelis G. 2020. Lignocellulosic Biomass as a Substrate for Oleaginous Microorganisms: A Review. *Appl. Sci.*, 10, 7698.
46. Qi F, Shen P, Hu R, Xue T, Jiang X, Qin L, Chen Y, Huang J. 2020. Carotenoids and lipid production from *Rhodospiridium toruloides* cultured in tea waste hydrolysate *Biotechnol Biofuels* 13:74.
47. Fang TJ, Cheng Y-S. 1993. Improvement of Astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* through mutation and optimization of culture conditions. *J. Ferment. Bioeng.* 75: 466-469.
48. Wang SL, Liu W, Wang HX, Lv CH. 2012. Ultra highpressure and ion implantation combined mutagenesis to improve the production of β -carotene from red yeast. *Adv. Mater. Res.* II 554-556: 1165-1169.
49. Marova I, Carnecka M, Halienova A, Certik M, Dvorakova T, Haronikova A. 2012. Use of several waste substrates for carotenoid-rich yeast biomass production. *J. Environ. Manage* 95: S338-S342.
50. Hussein S.M., Abdelhafez A.A., Ali A.A., Sand H.M., Hussein S.M., Abdelhafez A.A., *et al.* 2017. Optimization of β -carotene production from *Rhodotorula glutinis* ATCC 4054 growing on agro-industrial substrate using plackett-burman design. *P. Natl. A. Sci. India* 3: 1-10.
51. Taskin M, Sisman T, Erdal S, Kurbanoglu EB. 2011. Use of waste chicken feathers as peptone for production of carotenoids in submerged culture of *Rhodotorula glutinis* MT-5. *Eur. Food. Res. Technol.* 233: 657-665.
52. Aksu, Z; Eren, A.T. 2005. Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: use of agricultural wastes as a carbon source. *Process. Biochem.* 40: 2985-2991.
53. Petrik, S.; Marova, I.; Haronikova, A.; Kostovova, I.; Breierova, E. 2013. Production of biomass, carotenoid and other lipid metabolites by several red yeast strains cultivated on waste glycerol from biofuel production - a comparative screening study. *Ann. Microbiol.* 63: 1537-1551.
54. Lakshmidevi R, Ramakrishn B, Kumar S, Bhaskar S. 2021. Valorisation of molasses by oleaginous yeasts for single cell oil (SCO) and carotenoids production *Environmental Technology & Innovation*. 21.

Influencia del tamaño de partícula y tiempo de agitación en la producción de un extracto a partir de la cutícula de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*)

Julio Amilcar Pineda-Insuasti^{1*}, Jairo Viracocha-Cacuango², Julio Andrade-Colahuazo²

1. Centro Ecuatoriano de Biotecnología y Ambiente (CEBA), Corredor Periférico Sur s/n, Fincas San Agustín. Ibarra. Ecuador.

*cebaecuador@gmail.com

2. Instituto Superior Tecnológico "17 de Julio". SECAP, Darío Egas Almeida y Genaro Jaramillo. Ibarra-Ecuador.

RESUMEN

El extracto de caña rico en n-octacosanol es utilizado en la industria farmacéutica. Existe un limitado conocimiento del proceso de producción utilizando la cutícula de la caña. El objetivo de este trabajo es determinar la influencia del tamaño de partícula y el tiempo de agitación sobre la eficiencia del proceso. Se planificó un diseño experimental factorial 2^2 completamente al azar, con tres réplicas, los factores de estudio fueron el tamaño de partícula 2 y 7 mm y un tiempo de agitación de 24 y 72 h. El análisis de varianza muestra diferencia significativa en el tamaño de partícula 95 % de confianza. El análisis de regresión para los datos ajusta el modelo matemático empírico $SDT = 296.633 - (3.56667 \cdot TP) + (0.0236111 \cdot t) + (0.0125 \cdot TP \cdot t)$ que permite calcular un valor óptimo de 293 SDT, cuando el proceso es operado con un tamaño de partícula de 2 mm y un tiempo de agitación de 72 h.

Palabras clave: cera, caña, partícula, agitación, maceración.

ABSTRACT

The cane extract rich in n-octacosanol is used in the pharmaceutical industry. There is limited knowledge of the production process using the cuticle of the sugar cane. The objective of this work is to determine the influence of the particle size and the time of agitation on the efficiency of the process. A factorial 2^2 experimental design was planned completely randomly, with three replicates, the study factors were particle size 2 and 7 mm and a time of agitation of 24 and 72 h. The analysis of variance shows significant difference in 95% confidence particle size. The regression analysis for the data, fits the empirical mathematical model $SDT = 296.633 - (3.56667 \cdot TP) + (0.0236111 \cdot t) + (0.0125 \cdot TP \cdot t)$ that allows to calculate an optimal value of 293 SDT, when the process is operated with a particle size of 2 mm and a stirring time of 72 h.

Key words: wax, sugar cane, particle, agitation, maceration.

INTRODUCCIÓN

Según datos del Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC), las enfermedades cardiovasculares ocupan las primeras causas de muerte en el país, produciendo más de 15.000 defunciones al año. Estas enfermedades van de la mano con el aumento de colesterol en la sangre. El nivel de colesterol en sangre se reduce con fármacos de origen químico cuyo principio activo son las estatinas, las cuales pueden tener efectos colaterales probados, como daños musculares, hepáticos y

diabetes tipo II. Se sugiere como alternativa el uso de fitofármacos para tratar dichas patologías, como el policosanol del cual se han realizado estudios que demuestran que reduce el colesterol en la sangre y no presenta ningún efecto secundario (1).

Actualmente en el mercado se puede encontrar una serie de productos de origen químico que se utilizan para los mismos efectos, los cuales, si bien producen un resultado positivo en poco tiempo, los efectos secundarios son notables, es decir cura una cosa pero daña a otra. Mientras que el PPG (policosanol) por ser 100 % natural, no tiene efectos secundarios y puede ser consumido perennemente obteniendo los resultados deseados a partir del tercer o cuarto mes de tratamiento (2).

La caña de azúcar, al igual que otras plantas, sintetiza lípidos, parte de los cuales recubren el tallo en forma de una película cerosa, lo cual constituye un mecanismo de defensa que regula el intercambio con el medio, por lo tanto, esta propiedad se la puede utilizar como alternativa para la obtención de un nuevo producto, en la mayoría de los casos de mayor valor agregado e importancia económica que el azúcar (3).

Por esto se ha investigado la oportunidad de extraer la cera y los metabolitos presentes en la cutícula de la caña, el cual es un recurso degradable que se presenta dentro de las plantas de caña, como una fuente alternativa de nuevos compuestos, debido a su poca investigación como un recurso viable para la generación de nuevas líneas de producción diferentes a las líneas tradicionales de generación de energía en su mayor parte y aplicaciones de menor uso (4, 5).

Sin embargo, existe limitado conocimiento con respecto al proceso de producción de policosanol a partir de la cera de caña de azúcar, debido a que en la actualidad no se cuenta con los parámetros óptimamente definidos como tiempo, tamaño de partícula, relación solventes y temperatura, lo cual no ha permitido el desarrollo de tecnologías eficientes para el aprovechamiento de la cera que se encuentra en la cutícula o tallo de la caña de azúcar.

El propósito del estudio es determinar la influencia del tamaño de partícula y tiempo de agitación en la producción de un extracto a partir de la cutícula de caña de azúcar, mediante análisis de procesos químicos, que permitan el máximo aprovechamiento de las materias primas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se investigó a escala de laboratorio la producción de cera a partir de bagazo de caña de azúcar. El trabajo experimental se realizó en el laboratorio de Biociencia del Centro Ecuatoriano de Biotecnología y Ambiente (CEBA), localizado en la ciudad de Ibarra, a 2200 metros sobre el nivel del mar y con una temperatura promedio de 18 °C.

Material vegetal

Como materia prima se utilizó la caña de azúcar de la empresa Ingenio Azucarero del Norte (IAN-CEM), ubicada en la ciudad de Ibarra.

Diseño experimental y análisis estadístico

Se estableció como unidad experimental una muestra de 10 g de cutícula de bagazo de caña y se definieron como factores de estudio el tamaño de partícula entre 2 y 7 mm y el tiempo de maceración entre 24 y 72 horas. Se establecieron como parámetros de operación una temperatura ambiente de 18 °C, un pH de 7.2 un grado de agitación de 140 rpm y se mantuvo una relación de hidromódulo 1:5. La variable de respuesta seleccionada fue los sólidos disueltos Totales (SDT) medidos en ppm. Se utilizó el software estadístico Statgraphics Centurion, para crear un diseño experimental factorial estándar 2², con tres réplicas, completamente aleatorio, dando un total de 12 tratamientos.

Procedimiento

Se procedió a la extracción de la cutícula de caña de forma manual raspando la caña con un cuchillo de acero inoxidable (figura 1), las muestras de cutícula fueron secadas en un horno a 55 °C hasta 13 % de humedad y molidas en un molino manual, se tamizaron en tamaños de 2 y 7 mm. Se pesaron muestras de 10 g de cutícula en una balanza gramera de marca ACCULAB y se llenaron frascos de vidrio de 250 ml con las muestras, se ajustó el hidromódulo con alcohol al 60 % (figura 2). Las muestras se maceraron en zaranda orbital de marca CEBA a 140 rpm y temperatura constante de 18 °C. Las muestras maceradas se filtraron en con una bomba de vacío a través de un filtro de papel de 40 micras. Las mediciones de sólidos solubles totales se realizaron con un medidor multi-propósito de la serie Combo HI 98129, marca HANNA. Las muestras fueron conservadas en frascos de plástico para posteriores estudios de estabilidad.



Figura 1. Extracción de la cutícula de la caña de azúcar.



Figura 2. Proceso experimental para la obtención de extracto de cutícula de caña.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 1, se presenta la matriz de resultados experimentales. Como se puede observar se logra un mínimo de SDT de 274 ppm, cuando se trabaja con una partícula de 7 cm y 24 h de ma-

ceración y un máximo de 292 ppm con 2 mm de tamaño de partícula y 24 h de maceración, esto es debido principalmente a la mayor área de transferencia de masa en la partícula más pequeña.

Tabla 1. Matriz de resultados experimentales para obtención de extracto de cutícula de caña

Experimento	Tamaño partícula, mm	Tiempo, h	SDT, ppm
1	2	24	292
2	7	24	274
3	7	72	281
4	2	72	294
5	2	72	293
6	7	72	278
7	7	24	275
8	2	24	290
9	7	24	274
10	2	72	292
11	7	72	280
12	2	24	290

Análisis de varianza

En la tabla 2, se presenta los análisis de varianza realizado a la variable SDT del proceso de obtención del extracto de caña. En este caso, 3 efectos tienen un valor-P menor que 0.05; indicando

Tabla 2. Análisis de varianza para sólidos disueltos totales (SDT)

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
A:tamaño partícula	660.083	1	660.083	678.94	0.0000
B:tiempo	44.0833	1	44.0833	45.34	0.0005
AB	6.75	1	6.75	6.94	0.0388
Bloques	4.167	2	2.08333	2.14	0.1985
Error total	5.833	6	0.972222		
Total (corr.)	720.917	11			

que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95.0 %.

Modelo matemático empírico

El modelo matemático empírico generado a partir del análisis de regresión se muestra en la ecuación:

$$\text{SDT} = 296.633 - 3.56667 \cdot \text{Tamaño partícula} + 0.0236111 \cdot \text{Tiempo} + 0.0125 \cdot \text{Tamaño partícula} \cdot \text{Tiempo}$$

En la figura 3, se presenta el diagrama de Pareto estandarizado para SDT, lo cual corrobora que existe diferencia significativa entre el tamaño de partícula y el tiempo de maceración y la correlación tamaño / tiempo.

Optimización de respuesta

Utilizando el modelo matemático se calculó que el óptimo de los SDT está en 293.0 ppm cuando se opera el proceso con un tamaño de partícula de 2 mm y 72 h de maceración dinámica.

Revelo (6 2013) estudió el proceso de obtención de cera por lixiviación de la cachaza durante 4 horas con etanol al 96 °G y una temperatura de 70 °C, a presión atmosférica, agitando a 700 rpm durante 2.5 h y señaló la importancia del tamaño de partícula y el tiempo para obtener una eficiente extracción coincidiendo con este trabajo. Por otra parte, Rebollar (3) no consideró el tamaño de partícula de la cutícula de caña ignorando una posible influencia de su área superficial para la extracción del PPG. Existe un limitado conocimiento sobre el proceso de producción de extractos de caña utilizando la cutícula, la mayoría de los trabajos científicos se han centrado en el uso de la cachaza y el bagazo.

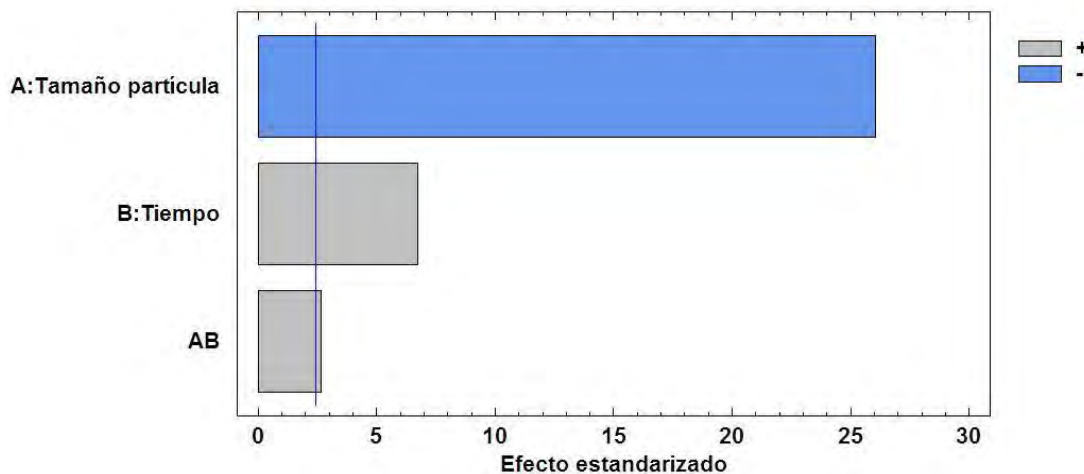


Figura 3. Diagrama de Pareto estandarizado para SDT.

Como se observa en la figura 4 a medida que incrementa el tiempo y disminuye el tamaño de partícula se logra un óptimo en el valor del intervalo estudiado.

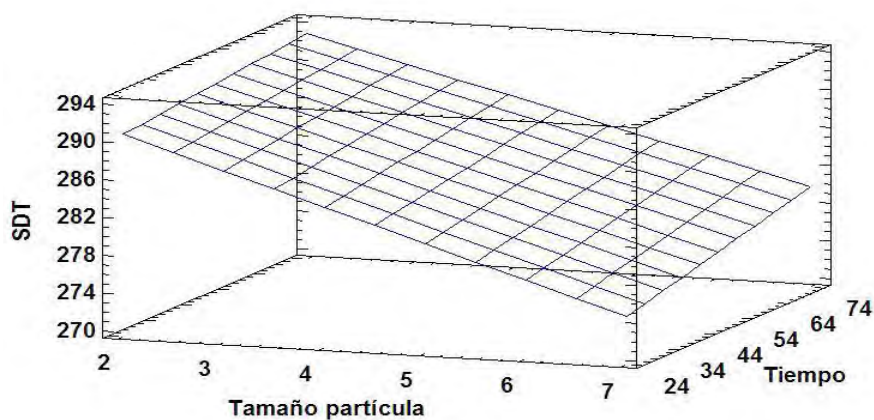


Figura 4. Superficie de respuesta para la obtención de SDT considerando el tamaño de partícula y el tiempo de extracción.

CONCLUSIONES

A partir del modelo matemático empírico se calculó un óptimo de SDT en 293 ppm cuando se trabaja con 2 mm de tamaño de partícula y 24 h de maceración dinámica, estableciendo que el tamaño de partícula de la cutícula de la caña es de alta importancia para el proceso de producción de extracto de caña a partir de la cutícula.

AGRADECIMIENTOS

Los autores dejan constancia de su agradecimiento al Centro Ecuatoriano de Biotecnología y Ambiente (CEBA), por su cooperación económica y científica en el desarrollo del presente estudio.

De igual forma agradecen a la empresa Ingenio Azucarero del Norte (IANCEM), por su cooperación con las muestras de cutícula de caña.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Guijarro, J. M. (2001). Policosanol: Alcoholes alifáticos de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) en el tratamiento de las enfermedades, 9 (4), 164–167.
2. Washington, N.; Guevara, A.; Augusto, C.; Anchundia, B.; Liset, K. & Cedeño, S. (2010). Proyecto de inversión para la importación y distribución del PPG (policosanol) para el mercado de Guayaquil Resumen 2 . Proyecto De Inversión Para La Importación Y Distribución del PPG y sus objetivos, 1–5.
3. Anastacio-Rebollar, Ms. I. M. S. (2016). Extracción de cera a partir de cachaza con etanol 96 °GL a escala de laboratorio Wax extraction from filter Cake with Ethanol 96 °GL at Laboratory Scale. Delegación MININT, Camagüey, 140–151.
4. Arbeláez, M. A.; Estacio, A. & Olivera, M. (2010). Impacto socioeconómico del sector azucarero colombiano en la economía nacional y regional. <http://www.asocana.org/modules/documents/10396.aspx>
5. Vladimir, A.; Morales, P. & Ramos, G. V. (2012). Posibilidades de reconversión de una fábrica de Cera Cruda para la elaboración de productos de alto valor agregado. Possibilities of re-vamping of a factory of Wax for the elaboration of products of high added value, 39 (3), 35–41
6. Revelo, D. (2013). Extracción de la cera del baho de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) mediante tratamiento de explosión de vapor y tratamiento de combinación de solventes heptano/hexano/agua. Journal of Chemical Information and Modeling, 53(9), 1689–1699. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.

Comportamiento de las variables ambientales y evaluación del impacto ambiental en la producción de la Furvina

María Isabel Díaz-Molina*, Lidia Osmaida-Sánchez, Yulexy Rodríguez-Montesino, Zenaida Rodríguez-Negrín, Rosayda Báez-Montesino, Amalia Calvo-Alonso e Isleidy de la Caridad Ruíz-Pérez
Centro de Bioactivos Químicos. Universidad Central de Las Villas. Carretera a Camajuaní, km 5 ½, Santa Clara. CP 54830, Villa Clara, Cuba.

*midiaz@uclv.edu.cu

RESUMEN

En el presente trabajo se analizó el comportamiento de las variables ambientales: agua, energía, contaminantes gaseosos, ruido, residuales líquidos y residuales sólidos, durante la producción de la Furvina, en correspondencia con la normativa vigente y la metodología establecida por la autoridad ambiental. Se aplicó la metodología desarrollada por Conesa para la evaluación de impactos ambientales. Al analizar los flujos contaminantes, se determinó que las variables ruido y concentración promedio de las inmisiones de NO_2 no comprometen la salud y el desempeño laboral del personal. En el caso de los residuales líquidos, después del tratamiento, cumplen con los parámetros establecidos en la NC 27:2012, para ser vertidos al alcantarillado; además, los residuos sólidos generados se almacenan y se transportan según lo descrito en la Licencia Ambiental para el Manejo de Desechos Peligrosos en el país. La evaluación de impactos ambientales permitió conocer que las acciones más impactantes y los factores más impactados son la generación de residuos líquidos y la salud y seguridad de los trabajadores y la población aledaña, respectivamente.

Palabras clave: variables ambientales, evaluación del impacto, residuales líquidos, residuales sólidos, evaluación del desempeño ambiental.

ABSTRACT

In the present work, the behavior of the environmental variables water, energy, gaseous pollutants, noise, liquid waste and solid waste in the production of Furvina was analyzed in accordance with current regulations and the methodology established by the environmental authority. The methodology developed by Conesa for the evaluation of environmental impacts was applied. When analyzing the pollutant flows it was determined that the noise variables and the average concentration of NO_2 immissions do not compromise the health and work performance of the personnel. In the case of liquid waste, it was determined that after treatment they comply with the parameters established in NC 27: 2012, to be discharged to the sewer system and the solid waste generated is stored and transported as described in the environmental management license. Of hazardous waste in the country. The environmental impact assessment allowed to know that the most impactful actions and the most impacted factors are the generation of liquid waste and the health and safety of the workers and the surrounding population respectively.

Key words: environmental variables, impact evaluation, liquid waste, solid waste, environmental performance evaluation.

INTRODUCCIÓN

La industria farmacéutica se distingue por ser generadora de residuos. La prevención en la generación de estos residuos, su adecuada gestión y la aplicación de las buenas prácticas ambientales,

suponen importantes beneficios para las empresas, tanto de carácter económico, como de posicionamiento estratégico en el sector industrial (1, 2).

Los contaminantes generados en la fabricación de los ingredientes farmacéuticos activos (IFA) y productos terminados, tienen un impacto ambiental muy diferente de una industria a otra, pues dependen de los procesos utilizados y de la naturaleza de los productos fabricados en cada instalación industrial. Por otra parte, hay que identificar la cantidad de residuos y emisiones por cada actividad (3, 4, 5, 6).

El mayor impacto ambiental de la industria farmacéutica tiene lugar sobre el medio acuoso. El impacto sobre la atmósfera y los residuales sólidos no deben ser olvidados para lograr evitar la contaminación y viabilizar los procesos, con reducción en el consumo de las materias primas (7, 8, 9).

La industria farmacéutica tiene importantes retos en relación con la generación de residuos, derivados de sus actividades, consecuente con el cumplimiento de las obligaciones establecidas en las normas del medioambiente (10, 11).

El Centro de Bioactivos Químicos (CBQ) de la Universidad Central Marta Abreu de Las Villas (UCLV), tiene el objeto social de investigar, producir y comercializar, de forma mayorista, productos con acción biológica, obtenidos por síntesis química, para ser utilizados en la salud humana, veterinaria y en la esfera agrícola.

En el CBQ, para la producción de la Furvina, se requiere analizar el comportamiento de las variables ambientales: agua, energía, contaminantes gaseosos, ruido, residuales líquidos y residuales sólidos, en correspondencia con la normativa vigente y la metodología establecida por la autoridad ambiental y aplicar la metodología desarrollada por Conesa, para la evaluación del impacto ambiental (12).

MATERIALES Y MÉTODOS

El análisis del comportamiento de las variables ambientales en la producción de la Furvina toma como referencia la metodología propuesta por el CITMA (Metodología para la ejecución de los diagnósticos ambientales para la obtención del Reconocimiento Ambiental Nacional (13). Para conocer el comportamiento de las variables ambientales se contó con el sistema de información que existe en el centro.

En la caracterización de la variable ambiental agua se tuvo en cuenta la fuente de suministro, la descripción de la red de suministro interno de la entidad (cantidad de depósitos, bombas y material de las tuberías). Se verificó el estado de la red hidráulica: estado de las tuberías y accesorios y la existencia de salideros.

Se monitorea la calidad del agua potable que entra al centro y el agua purificada que se obtiene usando como fuente de alimentación el agua potable, según establecen las normas NC 827:2017 Agua potable. Requisitos Sanitarios. Obligatoria (14) y la Farmacopea Europea (Ph. Eur. 7^{ma} Edición) (15). Para el sistema agua existe el programa preventivo que asegura su estado de control y establece el programa de seguimiento de los atributos de calidad críticos y de las condiciones operativas que incluyen la calibración de instrumentos críticos en correspondencia con el Anexo 06 de la Regulación No. 16-2012 Buenas Prácticas Ingenieras para la Producción de Aguas de Uso Farmacéutico (16).

Los resultados de la evaluación del agua se reflejan en los registros de resultados emitidos por la Unidad de Aseguramiento de la Calidad para el agua potable y por el laboratorio de Control de Procesos para el agua purificada.

Respecto a la variable energía se refleja la empresa suministradora de la energía y se cuantifica el consumo de la energía eléctrica en el emplazamiento físico implicado con la producción de la Furvina.

En los locales de trabajo, se determinaron, por la Empresa GEOCUBA Villa Clara – Santi Spíritus, los contaminantes gaseosos en el ambiente laboral. Se utilizó el método de estudio establecido por la NC 872: 2011 Seguridad y Salud del Trabajo. Sustancias Nocivas en el Aire de la Zona de Trabajo (17). Evaluación de la Exposición Laboral. Requisitos Generales, en el apartado 6. Requisitos generales de los métodos e instrumentos para la medición de las concentraciones de las sustancias nocivas. Las muestras fueron tomadas in situ en la zona respiratoria de los trabajadores expuestos.

Para la medición de los gases se utilizó un equipo Aeroqual, de la serie 500, de Nueva Zelanda, de tecnología GSS (Semiconductor GAS Sensible), GSE (Gas Sensible Electroquímico) y Nefelómetros. En correspondencia con las sustancias emitidas, sobre las cuales existe certeza de su presencia en el ambiente laboral, se le acoplaron los sensores de: Dióxido de Nitrógeno (NO_2), Sulfuro de Hidrógeno (H_2S) y Compuestos Orgánicos Volátiles (VOC). Se midió el NO_2 y los VOC en el taller de producción del Producto Intermedio G-0 y las cantidades de sulfuro de hidrógeno (H_2S) en el taller de Furvina (G-1). En el laboratorio de Control de la Calidad se midió la cantidad de dióxido de nitrógeno (NO_2), durante la técnica de determinación de metales pesados a la Furvina.

La caracterización de la variable ambiental ruido se realizó por la Empresa GEOCUBA, de Villa Clara – Santi Spíritus. Para la ejecución de las mediciones se utilizó un Sonómetro integrador marca SOLO 01 dB Stell, con filtro de valoración A, de nacionalidad francesa, calibrado por intercomparación, considerando la determinación automática (por microprocesador).

El monitoreo se efectuó en horario diurno, durante el desempeño de cada una de las etapas del proceso y en los puntos donde se ubican las principales fuentes generadoras de ruido, (18, 19, 20). Los resultados de las mediciones se comparan con la NC 871: 2011 Seguridad y Salud en el Trabajo- Ruido en el Ambiente Laboral- Requisitos Higiénico Sanitarios Generales.

Para el análisis de la generación de residuales líquidos se precisa la caracterización de los principales parámetros físicos, químicos y microbiológicos. Los valores del residual tratado se comparan con la NC 27: 2012 Vertimiento de aguas residuales a las aguas terrestres y al alcantarillado. Especificaciones. Obligatoria (21). Se describen las prácticas de manejo de los lodos generados por el tratamiento y se precisa la autorización de la autoridad ambiental y sanitaria.

Se reflejan los tipos y las cantidades totales de residuos sólidos generados por lotes de Furvina producidos mediante el pesaje de los residuos. Se describen las prácticas de colección, almacenamiento, transportación y disposición final en la entidad receptora.

Se identificaron las actividades principales en la producción de la Furvina, para proceder a la identificación y evaluación de los impactos ambientales. Se revisó cada actividad y se determinaron las que causan un efecto positivo o negativo en el medioambiente.

Con la relación causa-efecto entre aspectos e impactos ambientales y con el modelo matemático para fines predictivos se realiza la valoración cualitativa, para el estudio se utilizó la matriz de importancia de Conesa, (13). La importancia (I) de cada impacto se determina de manera cualitativa a través de la ecuación.

$$I = \pm[3I+2EX+MO+PE+RV+SI+AC+EF+PR+MC]$$

En la ecuación, el signo corresponde al carácter del impacto: (+) si es beneficioso y (-) si es perjudicial de las acciones que actúan sobre los factores ambientales, I representa la intensidad, EX la extensión, MO el momento, PE la persistencia, RV la reversibilidad, SI la sinergia, AC la acumulación, EF el efecto, PR la periodicidad y MC la recuperabilidad.

Los valores de importancia que se obtienen varían entre 13 y 100. De acuerdo con la calificación el impacto se cataloga como Irrelevante ($0 \leq I < 25$), Moderado ($25 \leq I < 50$), Severo ($50 \leq I < 75$) o Crítico ($75 \leq I$).

Para cada factor ambiental se establece una medida de importancia relativa al entorno, expresada en Unidades de Importancia (UIP); la asignación de los valores de UIP se realizó a partir de valores estandarizados de la metodología de Conesa (13). La ponderación de los factores ambientales se basó en la consulta a expertos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se exponen los resultados de la caracterización de las variables ambientales en la producción de la Furvina, en el Centro de Bioactivos Químicos.

Caracterización de la variable ambiental agua

La entidad cuenta con un suministro de agua potable, abastecida por la Universidad Central Marta Abreu de Las Villas y, esta, a su vez, se abastece de la Presa Minerva, por una tubería de diámetro 150 mm, que luego es reducida a diferentes diámetros como son $\frac{1}{2}$, $1\frac{1}{4}$, 2 y 4 pulgadas, respectivamente, por lo que se puede decir que la red se encuentra en serie. El sistema que bombea agua potable para el consumo y para el uso en la producción cuenta con dos bombas del tipo Electrobomba Ribalta: modelo 1.5 DK-20. Las bombas cuentan con una carga diseño de 20 m, capacidad de succión de 4 m y una capacidad máxima de 180 L/min, según declara el fabricante. Las bombas están conectadas en paralelo y succionan el agua de la cisterna hasta el hidropresor.

En el área de producción hay dos cisternas, una abastece el sistema de retorno y el sistema de incendio y la otra abastece a la planta de producción para la obtención de agua purificada. Las redes de suministro interno no presentan salideros y los materiales de las tuberías son hierro fundido y hierro galvanizado.

Al agua potable que se destina al consumo de los trabajadores y que se usa como fuente de alimentación para obtener agua purificada se le realiza monitoreo cuatro veces al año, como mínimo, (fuente superficial) en el punto de entrada a la cisterna de agua potable y los resultados de las determinaciones se comparan con los límites máximos admisibles NC 827: 2017 (14). Como se observa en la tabla 1, hay un cumplimiento de las determinaciones Sólidos Totales Disueltos, Dureza Total (como Carbonato de Calcio), Cloruro, Cobre, Hierro, Sodio y Zinc.

Tabla 1. Características físicas y componentes químicos que pueden afectar la calidad organoléptica del agua potable, así como los límites máximos admisibles (LMA) y su cumplimiento según la NC 827: 2017

Características	UM	LMA	Valor experimental	Cumplimiento
Sólidos Totales Disueltos	mg/L	1000	157	Cumple
Dureza Total (como Carbonato de Calcio)	mg/L	400	57.81	Cumple
Cloruro	mg/L	250	0.01	Cumple
Cobre	mg/L	2.0	0.019	Cumple
Hierro	mg/L	0.3	0.07	Cumple
Sodio	mg/L	200	15.17	Cumple
Zinc	mg/L	5	0.183	Cumple

Como se observa en la tabla 2 hay cumplimiento de las determinaciones de los componentes inorgánicos: Calcio, Plomo, Cromo total, Manganeseo y Magnesio y, respecto al Níquel, Cadmio y

Amoníaco, los valores están por encima de los límites máximos admisibles, pero en un valor muy pequeño. El pretratamiento con el filtro de zeolita elimina estos componentes inorgánicos, como se observa en la declaración de conformidad del lote AP222017, tablas 3 y 4.

Tabla 2. Componentes inorgánicos que influyen sobre la salud, así como los límites máximos admisibles (LMA) y su cumplimiento según la NC 827: 2012

Componente	LMA (mg/L)	Valor experimental (mg/L)	Cumplimiento
Calcio	200	11.88	Cumple
Plomo	0.05	< 0.001	Cumple
Cromo total	0.05	< 0.001	Cumple
Níquel	0.02	0.03	No cumple
Cadmio	0.005	0.008	No cumple
Manganeso	0.1	0.005	Cumple
Magnesio	150	25.46	Cumple
Amoníaco	No presencia	< 0.25	No cumple

Procedencia	Planta producción CBQ	Código interno	AP222017
Tipo de muestra	Agua potable	Etiqueta de la muestra	Salida filtro
Fecha de muestreo	2017/10/30	Fecha de recepción	2017/10/30
Fecha de inicio experimental	2017/10/30	Fecha de culminación del ensayo	2017/11/16

Tabla 3. Características físicas y componentes químicos que pueden afectar la calidad organoléptica del agua potable así como los límites máximos admisibles (LMA) y su cumplimiento, según la NC 827: 2017

Características	UM	LMA	Valor experimental	Cumplimiento
olor	-	inodora	Inodora	Cumple
pH	U	6.5-8.5	8.04	Cumple
Sólidos Totales Disueltos	mg/L	1000	128.4	Cumple
Dureza Total (como carbonato de calcio)	mg/L	400	50,36	Cumple
Cloruro	mg/L	250	48,13	Cumple

Tabla 4. Componentes inorgánicos que influyen sobre la salud, así como los límites máximos admisibles (LMA) y su cumplimiento, según la NC 827: 2017

Componentes	LMA (mg/L)	Valor experimental (mg/L)	Cumplimiento
Níquel	0.02	0.004	Cumple
Hierro	0.3	0.04	Cumple
Calcio	200	19.78	Cumple
Cromo total	0.05	0	Cumple
Magnesio	150	37.97	Cumple
Cobre	2.0	0.02	Cumple
Zinc	5	0.09	Cumple
Plomo	0.05	0.005	Cumple
Manganeso	0.1	0.01	Cumple
Sodio	200	41.63	Cumple
Cadmio	0.005	0.001	Cumple

El agua purificada cumplió con las especificaciones que establece la Farmacopea Europea (15): pH a 25 °C, entre 5.0 – 7.0, conductividad eléctrica a 25 °C máximo 5.1 $\mu\text{S}/\text{cm}$; materia oxidable – contenido de oxígeno máximo 0.4 mg/L y microbiológico menos o igual a 100 UFC/mL. El agua purificada cumple con los atributos clave de calidad como se establece en el programa de seguimiento de los atributos de calidad críticos; por tanto, puede ser utilizada para el lavado de la cristalería, preparación de soluciones y medios de cultivo, en la producción de la Furvina.

Caracterización de la variable ambiental energía

La empresa suministradora de la energía en el Centro de Bioactivos Químicos es la Empresa Eléctrica de Villa Clara. Los consumos de portadores energéticos se controlan a través del registro, como práctica sistemática. Se lleva la bitácora de energía que facilita los controles diarios de consumo. En cada una de las áreas existen los Procedimientos Normalizados de Operación para el Funcionamiento y Cuidado de cada uno de los equipos en las diferentes operaciones.

En el área de producción de la Furvina existe un metro contador para todo el emplazamiento físico. El consumo eléctrico en el año 2019 fue de 42 781 kW-h / año, ligeramente inferior al consumo de los años 2017 y 2018 que fue de 46 315 kW-h / año y 50 965 kW-h / año, respectivamente, debido a una menor producción de Furvina. El consumo de energía eléctrica por equipos, para la producción de la Furvina, se comporta favorablemente con relación a lo planificado.

Caracterización de la variable ambiental calidad del aire

La calidad del aire interior se refleja en el resultado del monitoreo en el ambiente de trabajo. En el Informe Técnico Monitoreo de variables ambientales (ruido y gases), del grupo empresarial GEOCUBA del año 2019 (Informe Técnico: 2019). Las inmisiones de NO_2 en el taller de producción del Producto Intermedio (PI) G-0, durante el proceso de síntesis de G-O, no revelaron contaminación en el área de trabajo, según los límites admisibles de exposición laboral establecidos en la NC 872: 2011 (17).

Las mediciones de las inmisiones de H_2S durante la síntesis del IFA Furvina en el año 2019 reflejan una concentración inferior a la CPA establecida en la NC 872: 2011 (17). Se aprecia un comportamiento similar en las concentraciones de este compuesto en el área de trabajo, en el año 2018.

Se determinó la concentración promedio de las inmisiones de NO_2 durante la ejecución de la técnica analítica Determinación del contenido de metales pesados en el 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano (IFA Furvina), que se realiza en el laboratorio de Control de la Calidad. Al comparar los valores con la Concentración Promedio Admisible (CPA) y la Concentración Máxima Admisible (CMA), en el aire de la zona de trabajo, según NC 872: 2011(17), se observó que no existe contaminación por dióxido de nitrógeno en la zona de trabajo, comportamiento similar al del año 2018.

En el taller de producción del Producto Intermedio (PI) G-0 desde el año 2015 se realiza el proceso de lavado de los gases nitrosos, mediante una columna absorbidora rellena, lo cual favorece la calidad del aire en el ambiente de trabajo.

Caracterización de la variable ambiental ruido

Para las mediciones de ruido realizadas en el Taller del Producto Intermedio G-0 (I) se tuvieron en cuenta las fuentes generadoras, así como la operación continua del sistema de extracción. No se realizaron mediciones en el Taller del Producto Intermedio G-0 (II) porque no existen fuentes generadoras de ruido en esta área.

En el taller del Producto Intermedio G-0 (I) se observaron valores que sobrepasaron el Límite Máximo Admisible (LMA) de 60 dBA en todas las áreas muestreadas, estos valores obtenidos no comprometen la salud y el desempeño laboral del personal, ya que los niveles sonoros están condi-

cionados al uso de los equipos instalados, que no se mantienen encendidos de manera continua en la jornada laboral de 8 h, sino que su funcionamiento varía entre 15 y 20 minutos.

En el Taller G-1 (I) existe gran incidencia del sistema de extracción, esto unido a la utilización de la tecnología instalada hizo que se obtuvieran valores superiores a los normados para este tipo de actividad.

En el taller G-1 (II) se obtuvieron los mayores valores acústicos durante el proceso de tamizado, con incidencia del vibrador del tamiz y el aire acondicionado. A pesar de ello, es significativo precisar que esta actividad es de corta duración (5 min) por lo que la exposición no compromete la situación acústica de la zona de trabajo y se considera aceptable.

La evaluación de las mediciones se realizó mediante la comparación del Nivel Sonoro Equivalente Continuo (Leq.), a partir de los valores medidos con el máximo admisible, según establece la NC 871: 2011 (22).

Teniendo en cuenta los términos y definiciones que aparecen en la norma cubana, se establece que para el Nivel Sonoro Equivalente Continuo, el máximo admisible es de 85 dB (A); por lo que al sobrepasarse este valor existe riesgo de daño auditivo para los trabajadores expuestos durante ocho horas de trabajo. La norma también establece los criterios de evaluación, según el tipo de actividad desarrollada y específica para cada caso el nivel sonoro equivalente continuo (Leq., en dB (A)), que garantiza condiciones seguras de trabajo para cada tarea o actividad.

Teniendo en cuenta las características del proceso, el Límite Máximo Admisible (LMA) se correspondió con los parámetros establecidos de 60 dB (A) para 8 h, por lo que no existe riesgo de daño auditivo.

Caracterización de la variable ambiental residuales líquidos

Los residuales líquidos pasan a la Planta de Tratamiento de Residuales y, una vez que cumplen con los parámetros establecidos en la NC 27:2012 (21), se vierten al alcantarillado. El Laboratorio de Control de Procesos realiza el análisis al agua residual tratada. El agua residual cumple con las especificaciones que establece la norma pH, entre 6.0 – 9.0; conductividad eléctrica a 25 °C < 4000 µS/cm; Demanda Química de Oxígeno (DQO) < 700 mg/L y temperatura < 50 °C.

Caracterización de la variable ambiental residuales líquidos sólidos

En la Planta de Producción, los residuos sólidos, están constituidos, principalmente, por la torta que se recoge en la etapa de purificación del Producto Intermedio G-0 y por la obtención de la Furvina. La torta contiene carbón, impurezas, papel de filtro y un pequeño porcentaje de alcohol, G-0 y G-1.

El almacenamiento y disposición final de los residuos sólidos de la Planta de Producción aparecen en el Plan de Manejo del CBQ y están aprobados en la Licencia Ambiental para el Manejo de Desechos Peligrosos en el país, No. 28/2018 y se otorga la Licencia Ambiental para el Manejo integral de desechos peligrosos.

Aspectos e impactos ambientales

Después de identificar las acciones y los factores del medio que son impactados por el proceso, la matriz de importancia nos permite obtener una valoración cualitativa.

Los resultados de la matriz de importancia permiten ordenar, jerárquicamente, las acciones más impactantes y los factores ambientales más impactados, según las importancias absolutas y relativas. Las acciones impactadas en orden decreciente, son: generación y emisiones de residuos líquidos, accidentes químicos, generación y emisiones de residuos gaseosos, generación y emisiones de residuos sólidos, almacenamiento de productos químicos, consumo de agua, consumo de aceite térmico, emisiones de ruidos, consumo de materia prima, consumo de energía eléctrica.

Los factores ambientales en orden decreciente son: salud y seguridad de trabajadores y población aledaña, aguas superficiales y subterráneas, aire, suelos, fauna y flora.

La metodología utilizada para la evaluación del impacto demostró que las acciones más impactantes y los factores más impactados son la generación de residuos líquidos y la salud y seguridad de los trabajadores y población aledaña.

CONCLUSIONES

Al analizar los flujos contaminantes en la producción de la Furvina en el Centro de Bioactivos Químicos, se determinó, que las variables ruido y concentración promedio de las inmisiones de NO₂, no comprometen la salud y el desempeño laboral del personal.

En el caso de los residuales líquidos se determinó que después del tratamiento cumplen con los parámetros establecidos en la NC 27:2012, para ser vertidos al alcantarillado ; además, los residuos sólidos generados se almacenan y se transportan según lo descrito en la Licencia Ambiental para el Manejo de Desechos Peligrosos en el país.

La aplicación de la metodología desarrollada por Conesa para la evaluación de impactos ambientales permitió conocer que las acciones más impactantes y los factores más impactados son la generación de residuos líquidos y la salud y seguridad de los trabajadores y población aledaña, respectivamente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Díaz Molina, M. I., Rodríguez Negrín, Z. & Rodríguez Rico, I. (2011). Producciones Más Limpias y Gestión Ambiental en la producción de bioactivos y Vitrofurul en el Centro de Bioactivos Químicos. *Tecnología Química*, 31(3), 36.
2. Díaz Molina, M. I., Rodríguez Rico, I., Rodríguez Negrín, Z., & Cuellar de la Cruz, M. E. (2013). Gestión Ambiental y Producciones Más Limpias en la producción de bioactivos y Vitrofurul. *icidca sobre los derivados de la caña de azúcar*, 47(1), 3-8.
3. Aceves Diez, A. E., & Castañeda Sandoval, L. M. (2012). Producción biotecnológica de lipasas microbianas, una alternativa sostenible para la utilización de residuos agroindustriales. *Revista Vitae*, 19(3).
4. Callejón, A. J., Carreño, A., Sánchez-Hermosilla, J., & Pérez, J. (2010). Evaluación de impacto ambiental de centro de transformación y gestión de residuos sólidos agrícolas en la provincia de Almería. *Informes de la Construcción*. España, 62(518), 79-93.
5. Angelats, R. (2012). Mastitis y residuos antibióticos. *Productor Agropecuario*. Costa Rica, Jun-Jul(22), 46-47.
6. Collazos, H., De Castro, C., Riveros, M., & Ospina, A. (2011). Los residuos sólidos Industriales peligrosos en Bogotá. *Ingeniería e Investigación*(20), 6-12.
7. Pérez Salazar, R., Alfaro Chinchilla, C., Sasa Marín, J., & Agüero Pérez, J. (2013). Evaluación del funcionamiento de un sistema alternativo de humedales artificiales para el tratamiento de aguas residuales. *UNICIENCIA*, 27(1), 332-340.
8. Arias Lizárraga, D. M., & Méndez Gómez, E. (2014). Remoción de sólidos en aguas residuales de la industria harinera de pescado empleando biopolímeros. *Tecnología y ciencias del agua*, 5(3), 115-123.
9. Martínez Romero, M. K., Murcia Igua, D. A., & Suárez Boyacá, Y. H. (2015). Evaluación de un Sistema de Biorremediación de aguas residuales porcícolas en la finca El Porvenir, Vereda Suncunchoque, sector La Laja, Ubate – Cundinamarca, y su reutilización con fines agroambientales. (Trabajo de Graduación presentado como requisito parcial para optar al título de

- Ingeniero(a) en Agroecología), Corporación Universitaria Minuto de Dios, Bogotá D.C., Colombia.
10. Saval, S. (2012). Aprovechamiento de residuos agroindustriales: Pasado, presente y futuro. Revista de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, AC, 14-46.
 11. Menéndez Navarro, A. (2003). El papel del conocimiento experto en la gestión y percepción de los riesgos laborales.
 12. Conesa Fernandez-Vitoria, V. (2010). Guía metodológica para la evaluación de impacto ambiental. Madrid. España: Mundi-Prensa.
 13. CITMA, 2012. Metodología para la ejecución de los Diagnósticos Ambientales, para la obtención del Reconocimiento Ambiental Nacional (RAN).
 14. OFICINA NACIONAL DE NORMALIZACIÓN. Agua potable. Requisitos Sanitarios. Obligatoria. NC 827: 2017. La Habana. Cuba.
 15. Farmacopea Europea (Ph. Eur. 7ma Edición). 2011.
 16. CECMED. Anexo 06 de la Regulación No. 16 Buenas Prácticas Ingenieras para la Producción de Aguas de Uso Farmacéutico. La Habana, Cuba, 2012.
 17. OFICINA NACIONAL DE NORMALIZACIÓN. Seguridad y Salud del Trabajo. Sustancias Nocivas en el Aire de la Zona de Trabajo . Evaluación de la Exposición Laboral. Requisitos Generales, en el apartado 6. Requisitos generales de los métodos e instrumentos para la medición de las concentraciones de las sustancias nocivas. NC 872: 2011. La Habana, Cuba.
 18. Informe Técnico: 2015 Monitoreo de variables ambientales (ruido y gases). GEOCUBA.
 19. Informe Técnico: 2018 Monitoreo de variables ambientales (ruido y gases) GEOCUBA.
 20. Informe Técnico: 2019 Monitoreo de variables ambientales (ruido y gases) GEOCUBA.
 21. OFICINA NACIONAL DE NORMALIZACIÓN. Vertimiento de aguas residuales a las aguas terrestres y al alcantarillado. Especificaciones. (obligatoria). NC 27:2012. La Habana. Cuba.
 22. OFICINA NACIONAL DE NORMALIZACIÓN. Seguridad y Salud en el Trabajo- Ruido en el Ambiente Laboral-Requisitos Higiénicos sanitarios Generales. NC: 871:2011. La Habana. Cuba.

Effect of growth regulators Albite and Lebame with phyto-lamp in the synthesis of yacon active compounds

Yarelys Herrera Díaz¹ and Elena V. Romanova²

1. Cuban Research Institute on Sugarcane By-Products (ICIDCA). P.O. Box 4026, 11000, Havana, Cuba.

2. Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University).

*yarelysherrera8@gmail.com

ABSTRACT

Yacon (*Smallanthus sonchifolius*), a root crop of South American origin, is considerably rich in health-related substances, such as antioxidants and fructooligosaccharides (FOS). To increase the productivity, biochemical value of yacon plants and their resistance to diseases, modern biological preparations, such as growth regulators are recommended. In this work, the influence of biological preparations – Albite (Russia) and Lebame (Cuba) on the growth and development of yacon's plants, as well as the content of pigments and antioxidants in the leaves were studied. The use of growth regulators Albite and Lebame, and the use of phytolamp had a positive impact on the increasing intensity of the photosynthetic apparatus and leaf growth biomass of plants yacon.

Key words: yacon, *Smallanthus sonchifolius*, Albite, Lebame, phytolamp, growth regulators, active compounds.

RESUMEN

Yacón (*Smallanthus sonchifolius*), tubérculo de origen sudamericano, es considerablemente rico en sustancias relacionadas con la salud, como antioxidantes y fructooligosacaridos (FOS). Para aumentar la productividad, el valor bioquímico de las plantas de yacón y su resistencia a enfermedades, son recomendadas preparaciones biológicas de reguladores de crecimiento. En este trabajo se estudió la influencia de los biopreparados: Albite (Rusia) y Lebame (Cuba) en el crecimiento y desarrollo de las plantas de yacón, así como el contenido de pigmentos antioxidantes en las hojas. El uso de los reguladores de crecimiento, Albite y Lebame, tuvo un impacto positivo que incrementó la intensidad del aparato fotosintético y el crecimiento de la masa foliar de las plantas de yacón.

Palabras clave: yacón, *Smallanthus sonchifolius*, Albite, Lebame, fitolámpara, reguladores de crecimiento, compuestos activos.

INTRODUCTION

Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) is a root crop native to the Andean region, that has been introduced and cultivated in Russia its capability to adapt to different climatic regions, altitudes and soils (Caetano (1) and Gins (2)). Yacon yields fruit-like tubers, crunchy and juicy with a relatively sweet taste, that are usually consumed raw or cooked as a sweet, juicy vegetable (Gins, (3)).

Yacon is also considered a functional food due to its chemical composition, that are beneficial to human health (Caetano (1), Gins (3) and de Moura (4)). These health benefits are associated with phenolic compounds, antioxidants and health promoting carbohydrates. The antioxidant capacity of yacon was evaluated between 23 and 136 $\mu\text{mol/g}$ trolox equivalent of the dry matter, and total phenolic compounds represent 0.79 % to 3.08 % of the dry matter (Caetano (1) and Khajehei (5)).

Carbohydrates' content in yacon roots is dominated by inulin and fructooligosaccharides (FOS), and their health benefits are heightened by studies, that show, that they can reduce glycemic index, body weight and the risk of colon cancer (Caetano (1), Khajehei (5) and de Almeida (6)). They are classified as prebiotic food that resist digestion and absorption in gastrointestinal tract (small intestine); are fermented by the gut (large intestine) microbiota, and stimulates the growth and activity of beneficial bacteria in the lower-gut towards a healthier composition (Caetano (1), de Moura (4) and Dwivedi (7)). Studies also show that the composition of FOS and other bioactive compounds is influenced by the cultivar (de Almeida (6)), thus highlighting the importance of breeding cultivars with higher content of FOS, phenolic compounds and antioxidants.

Due to the benefits of yacon' bioactive compounds and their dependency to cultivars' characteristics, it is crucial to gain better understanding of these health benefits, and breeding methods of bioactive compounds rich yacon plants.

The present study aims to use of growth regulators Albite and Lebame, and the use of phytolamp had a positive impact on the increasing intensity of the photosynthetic apparatus and leaf growth biomass of plants yacon.

MATERIALS AND METHODS

Research and field experiments were carried out in 2017 - 2018 years in the All-Russian Research Institute of Vegetable Breeding and Seed Production (VNISSOK) and in the Agricultural Technology Institute People's Friendship University in open and protected ground. Phenological observations and biometric measurements and the others analyses were carried out in accordance with the guidelines for the study of green crops, developed in VNISSOK.

RESULTS AND DISCUSSION

Comparison of biometric characteristics of yacon plants from 10/03/2017 to 30/03/2018 under different growing conditions (different doses of nutrition and under the influence of different light rays) (Table 1).

Table 1. Biometric characteristic of yacon plants from 25/11/2017 to 30/03/2018 under different growing conditions

Indicators		Under phytolamp	Under the white lamp	Control under daylight
Height. cm	Control	-	-	22 ± 1.5
	Lebame	20 ± 1.5	16 ± 1.3	27 ± 1.7
	Albite	29 ± 1.7	29 ± 1.7	44 ± 3.5
Number of leaves	Control	-	-	7 ± 5.3
	Lebame	7 ± 4.5	6 ± 3.4	7 ± 4.5
	Albite	7 ± 5.0	7 ± 5.0	7 ± 5.0
Leaf blade width. cm	Control	-	-	6 ± 4.5
	Lebame	9 ± 6.5	7 ± 5.0	6 ± 4.5
	Albite	10 ± 8.5	7 ± 4.5	6 ± 4.5

Based on the data obtained in this table, we can make the following conclusion:

1. The tallest plants themselves were obtained using the optimal dose of Albite, especially when using daylight.
2. The largest number of leaves was obtained at optimal dose of Albite, especially under fluorescent light and phytolamp.
3. Width of the leaf blade of plants more imposing was obtained under phytolamp and at the optimal dose of Albite.

Table 2. The content of photosynthetic pigments in the leaves of the yacon when grown in different types of lighting and biological products

Sample	Chlorophyll	Carotenoid	CCA, H ₂ O	CCA, C ₂ H ₅ OH
	mg/r			
Yacon control	1.12	0.41	0.54	0.61
Yacon control + Lebame	1.39	0.45	0.57	0.66
Yacon + white lamp + Lebame	1.71	0.54	0.67	0.78
Yacon + phytolamp + Lebame	1.95	0.66	0.74	0.79
Yacon control + Albite	1.15	0.38	0.56	0.63
Yacon + white lamp + Albite	1.43	0.46	0.60	0.72
Yacon + phytolamp + Albite	1.79	0.56	0.72	0.79

* standard deviation did not exceed 5 % of the average.

As follows from the experimental data obtained earlier and now, the radiation spectrum of irradiators equipped with white light lamps, it is advisable to optimize the led emitters taking into account the activation of biosynthesis of biologically active substances and antioxidants, as well as depending on the type, variety and stage of development.

The exposure of plants yacon light phytolamp significantly increases the content of photosynthetic pigments and hydrophilic low molecular weight antioxidants in the leaves in comparison with fluorescent lamps and fluorescent light (control).

Ascorbic acid is a strong antioxidant and is found in products of plant origin, which is a set of all low-molecular metabolites with antioxidant activity involved in the protective and regulatory reactions of the cell. The results observed that plants with higher concentrations of ascorbic acid were flooding (Table 3).

Table 3. The content of ascorbic acid in the leaves of the yacon when grown in different types of lighting and biological products

Sample	Ascorbic acid (mg %)
Yacon control	12.32
Yacon control + Lebame	14.08
Yacon + white lamp + Lebame	17.60
Yacon + phytolamp + Lebame	19.36
Yacon control + Albite	17.60
Yacon + white lamp + Albite	22.88
Yacon + phytolamp + Albite	19.36

The main function of the antioxidant metabolome in the cell is to neutralize the active forms of oxygen and free radicals that occur in large quantities under the action of abiogenic and biogenic stressors, and the formation of resistance to oxidative stress.

The results observed that the plants treated with al and Lebame turned out to be producers of high concentration of ascorbic acid in comparison with the control, and according to Gins M. S., (3), especially those who grew up under the phytolamp.

CONCLUSIONS

- Albite, in a concentration of 5 ml per 1 liter, has a stimulating effect on increasing the intensity of the photosynthetic apparatus of the leaves, the growth of plant biomass, the further processes of growth and development of plants, and can be used as an element of progressive technology of cultivation of yacon.
- Lebame, in a concentration of 10 ml per 1 liter, has a stimulating effect on increasing the concentration of ascorbic acid.
- Use phytolamp is more effective in stimulating plant growth because phytolamp emit blue and red spectrums of light of great intensity, while the fluorescent lamp also has light of both spectra, but most of the light is generated by the blue spectrum.

REFERENCES

1. Caetano, B.F.R. *et al.* Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) as a Food Supplement: Health-Promoting Benefits of Fructooligosaccharides. // Nutrients. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 2016. Vol. 8, № 7, 436.
2. Gins, M.S. *et al.* Improving the quality of vegetable crops as a functional food // Dostizheniya Nauk. i tekhniki APK. 2011. Vol. 3. P. 34–36.(in russian)
3. Gins, M.S. *et al.* Fructosans and phenolic compounds of yacon // Veg. Crop. Russ. Jieneon'entateinmento, 2015. № 3–4. P. 118–122. (in russian).
4. Moura de, N.A. *et al.* Protective effects of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) intake on experimental colon carcinogenesis // Food Chem. Toxicol. 2012. Vol. 50, № 8. P. 2902–2910.
5. Khajehei, F. *et al.* Yacon (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. & Endl.) as a Novel Source of Health Promoting Compounds: Antioxidant Activity, Phytochemicals and Sugar Content in Flesh, Peel, and Whole Tubers of Seven Cultivars // Molecules. 2018. Vol. 23, № 2. P. 278.
6. Almeida de, Paula H.A., Abranches M.V., de Lucas Fortes Ferreira C.L. Yacon (*Smallanthus Sonchifolius*): A Food with Multiple Functions // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. Taylor & Francis, 2015. Vol. 55, № 1. P. 32–40.
7. Dwivedi S. *et al.* Plant prebiotics and human health: Biotechnology to breed prebiotic-rich nutritious food crops // Electron. J. Biotechnol. Elsevier, 2014. Vol. 17, № 5. P. 238–245.

Estudio preliminar de producción de enzima dextranasacarasa recombinante Dsr-F- Δ SP- Δ GBD en cultivo discontinuo

Keyla Tortoló-Cabañas¹, Catherine Sain-Hubert²⁻³, Elisabeth Bodo²⁻³, Ruben Werquin²⁻³, Benoit Moreau⁴, Amanda Montes-Álvarez¹ y Reinaldo Fraga-Vidal^{1*}

1. Departamento de Alcohol, Levadura y Alimento Animal, Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA). Vía Blanca 804 y Carretera Central, San Miguel del Padrón, La Habana, Cuba.

*reynaldo.fraga@icidca.azcuba.cu

2. Biotechnology Unit (Meurice R & D), Brussels, Belgium.

3. Department of Bioprocess Development and Applied Microbiology (LABIRIS), Brussels, Belgium.

4. Department of Green Chemistry and Biobased Products (HEPH-Condorcet) Ath, Belgium.

RESUMEN

Se evaluó el efecto de la agitación a 300 y 500 rpm sobre el crecimiento de *Bacillus megaterium* MS941 (pRFBm1) y la producción de una variante truncada de la enzima dextranasacarasa DSR-F- Δ SP- Δ GBD de 145 kDa, en fermentación discontinua, en un biorreactor con medio 2XYT, se mantuvo constante el suministro de oxígeno en 30 %. Al trabajar con una agitación de 300 rpm, el crecimiento microbiano fue dos veces mayor en comparación con la condición a 500 rpm. Igualmente, la producción de DSR-F- Δ SP- Δ GBD se favoreció y se obtuvieron valores de 49,87 UI.L⁻¹ en la fracción celular y 124,6 UI.L⁻¹ en la fracción sobrenadante.

Palabras clave: dextranasacarasa, fermentación, velocidad de agitación, DSR-F- Δ SP- Δ GBD.

ABSTRACT

The effect of agitation at 300 and 500 rpm on the growth of *Bacillus megaterium* MS941 (pRFBm1) and the production of a dextransucrase truncated variant enzyme DSR-F- Δ SP- Δ GBD of 145 kDa, in discontinuous fermentation in a bioreactor with 2XYT medium, keeping the oxygen supply constant at 30 %, was evaluated. When working with an agitation of 300 rpm the microbial growth was 2 fold higher compared to the condition at 500 rpm. Likewise, the production of DSR-F- Δ SP- Δ GBD was favored, obtaining values of 49, 87 IU.L⁻¹ in the cellular fraction and 124,6 IU.L⁻¹ in the supernatant fraction.

Key words: dextransucrase, fermentation, stirring rate, DSR-F- Δ SP- Δ GBD.

INTRODUCCIÓN

B. megaterium ha adquirido un creciente interés para la producción de proteína extracelular (1,2). En comparación con otros hospederos más reconocidos como *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* exhibe muchas ventajas que lo posicionan a la vanguardia de nuevos proyectos investigativos. Tal es el caso de la producción de proteínas recombinantes, donde se han obtenido buenos rendimientos (3-6).

Las dextranasacarasas son enzimas extracelulares, que pueden encontrarse también asociadas a la célula (7), producidas por bacterias pertenecientes al género *Leuconostoc* y se emplean para

sintetizar varios tipos de glucanos con diferentes tamaños y estructuras (8); por ejemplo, la dextrana que es un polímero ampliamente usado en la industria farmacéutica y de los cosméticos (9,10).

Adicionalmente, cuando se trabajan procesos microbianos el mezclado del fluido afecta la fisiología celular y la producción de metabolitos (11), por ello es necesario evaluar las mejores condiciones que garanticen buenos resultados. De ahí que el objetivo de este trabajo sea la evaluación preliminar del crecimiento de la cepa *B. megaterium* MS941 (pRFBm1), que porta el gen que codifica para la variante truncada de la enzima dextranasacarasa DSR-F- Δ SP- Δ GBD, y su producción en fermentaciones discontinuas, a dos velocidades de agitación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismo empleado

La cepa utilizada para todos los estudios es *Bacillus megaterium* MS941_(pRFBm1), perteneciente a la Colección de Cultivos Microbianos del ICIDCA, que está modificada genéticamente para la producción de una variante truncada de la enzima dextranasacarasa DSR-F- Δ SP- Δ GBD de 145 kDa, inducida por la presencia de xilosa en el medio de cultivo. Es una cepa deficiente de la proteasa alcalina NprM (1), con resistencia a la tetraciclina portada por el plásmido pRFBm1.

La cepa es mantenida en glicerol al 15 % (v/v), a -80 °C. Generalmente, durante el desarrollo de los experimentos se mantiene mediante siembras periódicas en placas de LB agar, con tetraciclina cuya composición consiste en extracto de levadura (5 g.L⁻¹), triptona (10 g.L⁻¹), NaCl (10 g.L⁻¹) y tetraciclina (10 µg.mL⁻¹); todos los componentes, a excepción del antibiótico, fueron esterilizados a 121 °C, durante 20 minutos. La tetraciclina fue añadida al medio estéril a partir de una solución a 10 000 µg.mL⁻¹ en alcohol absoluto. Posterior a una incubación a 37 °C, durante 24 horas, se conservaron los cultivos en refrigeración, a temperaturas entre 2 y 5 °C.

Preparación de los inóculos

A partir de una placa con medio LB agar con tetraciclina se transfiere una colonia a un matraz de 500 mL de capacidad nominal, que contiene 50 mL de medio 2XYT (Extracto de levadura 10 g.L⁻¹; Triptona 16 g.L⁻¹; NaCl 5 g.L⁻¹ y tetraciclina de 10 µg.mL⁻¹, preparado en Tris-HCl 100 mM, pH 6.4) durante 16 h, a 37 °C y 175 rpm.

Crecimiento de *B. megaterium* MS941 (pRFBm1) y producción de enzima dextranasacarasa (DSR-F- Δ SP- Δ GBD)

Se evaluó el comportamiento de la cepa *B. megaterium* MS941 (pRFBm1), en cuanto a crecimiento microbiano y producción de la enzima dextranasacarasa DSR-F- Δ SP- Δ GBD, en modo de operación discontinuo. Se inocularon los fermentadores BIOSTAT C Plus de 10 L de capacidad nominal, con volumen efectivo de 5 L, con una relación de inoculación de 1 % (v/v).

La fermentación se llevó a cabo en medio 2XYT, durante 24 h, se mantuvo el pH a 6,5 y la temperatura en 37 °C, hasta el momento de realizar la inducción, que queda establecida cuando el cultivo alcanza valores de densidad óptica a 600nm (DO_{600nm}), entre 0.3 y 0.4. La inducción consiste en la adición de xilosa, a una concentración de 0.5 % (v/v), a partir de este momento se disminuye la temperatura hasta 25 °C hasta la hora final del proceso. La saturación de oxígeno se mantuvo en 30 % y se evaluó el efecto de la agitación a 300 y 500 rpm en el crecimiento microbiano y la producción de la enzima dextranasacarasa

Determinación del crecimiento

El crecimiento de la cepa *B. megaterium* MS941 (pRFBm1) se determinó mediante la medición de la densidad óptica a 600 nm, en espectrofotómetro

Determinación de materia seca gravimétrica (MSG)

Se tomó una muestra por triplicado del caldo fermentado y se centrifugó a 10 000 x g, durante 10 minutos, para separar la biomasa producida. Se lavó esta biomasa con agua destilada y se centrifugó nuevamente. La biomasa se colocó en la estufa a 105 °C por un tiempo de 24 h, para garantizar la sequedad total de la muestra.

Los resultados se expresaron como ganancia neta de biomasa, que se determina por la diferencia entre las horas finales e iniciales de la fermentación.

Electroforesis en geles de poliacrilamida

Para la detección cualitativa de la presencia de la enzima dextranasacarasa DSR-F- Δ SP- Δ GBD se empleó un sistema XCellSureLock™ Mini-Cell, con geles (3-8 % Bis Tris Gel). Utilizando antioxidante, tampón de corrida, agente reductor y tampón de carga NuPAGE (Invitrogen). El tampón de carga se preparó con el agente reductor y, posteriormente, se mezcló con la muestra en proporción 1:3, respectivamente. Se aplicaron en el gel 25 μ L de muestra y la electroforesis se llevó a cabo durante, aproximadamente, 1 h a 150 Volts. Al finalizar, para detectar formación de dextrana, el gel fue sometido a 3 lavados, durante 20 minutos en agitación orbital con una solución tampón de 50 mMNaAc (pH 5.4), Tritón X-100 0.1 % (v/v), CaCl_2 0.05 g.L⁻¹, posteriormente se sumergió en una solución de sacarosa al 10 % (p/v) en el mismo tampón y se incubó a 30 °C durante toda la noche; se visualizó, a simple vista, la aparición de bandas de dextrana de color blanco. Para colorearlas se empleó el reactivo de Schiff. En todas las corridas electroforéticas se incluyó el patrón de proteínas de alto peso molecular (PageRulerPrestainedProteinLadder, ThermoScientific).

Determinación de actividad enzimática dextranasacarasa

Las fracciones celulares se suspendieron en una solución tampón acetato de sodio 50 mM (pH 5.4), CaCl_2 0.05 g.L⁻¹, Tritón X-100 0.1 % (v/v) y se mantuvieron en congelación a -20 °C hasta el momento de realizar el análisis.

Las reacciones enzimáticas se ensayaron a 40 °C, en tampón acetato de sodio 20 mM (pH 5.4), CaCl_2 a 0.05 g.L⁻¹, Triton X-100 0,1 % (v/v) y una solución de sacarosa a 100 g.L⁻¹, en un volumen total de reacción de 5 mL. Se determinó la fructosa liberada, mediante Kit enzimático ENZYTEC (12).

Se define como 1 unidad internacional (UI) la cantidad de enzima que cataliza la liberación de 1 μ mol de fructosa, en un minuto, bajo las condiciones ensayadas.

Procesamiento estadístico de los resultados

Los resultados fueron procesados, primeramente, por el programa Microsoft Excel 2010. Los valores de ganancia neta de biomasa, adicionalmente fueron analizados mediante ANOVA Simple, con el empleo del programa Statgraphics Centurion versión XVI.II.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En estudios anteriores se ha evaluado la temperatura del proceso y se ha establecido como la mejor condición la combinación entre 37 y 25 °C, empleada en este trabajo para la producción de

DSR-F- Δ SP- Δ GBD recombinante, sin producir graves afectaciones en el crecimiento celular (datos no mostrados).

Se conoce que la agitación es un parámetro que garantiza la homogeneización en el biorreactor, tanto de nutrientes como de la temperatura y el pH fijado, durante el proceso. Pudiera pensarse que a mayor agitación se verán favorecidas las respuestas de interés, en este caso, crecimiento microbiano y producción de enzima. Sin embargo, una agitación excesiva puede resultar inconveniente para ambas. En este sentido, hay autores que refieren que la agitación puede crear fuerzas de corte que producen cambios morfológicos, así como variaciones en el crecimiento de algunos microorganismos (13). Por ello, es necesario estudiar las condiciones óptimas en cada caso.

En la figura 1 se presentan las curvas de crecimiento de la cepa *B. megaterium* MS941 (pRFBm1) ante las velocidades de agitación evaluadas (300 y 500 rpm), medidas como el incremento en la densidad óptica a 600 nm. Se observa que el microorganismo alcanza mayores valores de densidad óptica cuando la agitación en el fermentador se mantiene en 300 rpm. Para ambas condiciones de trabajo, durante las 3 primeras horas el cultivo se mantiene en fase de adaptación. Luego se comporta con un discreto incremento hasta la hora 8 o 10 y, a partir de entonces, se perfila la fase exponencial, la cual se hace más evidente para la condición de 300 rpm, sin haber concluido esta, al menos durante las 24 horas del estudio.

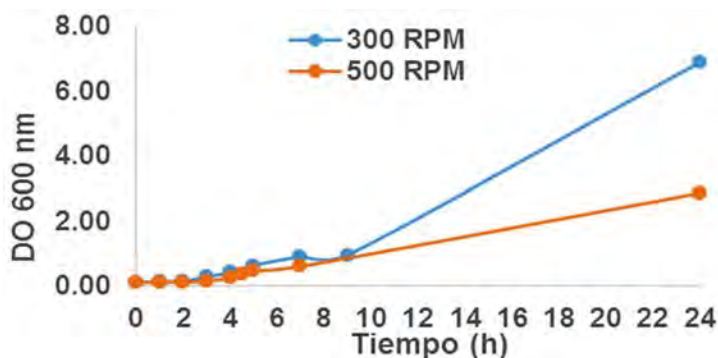


Figura 1. Crecimiento de *B. megaterium* MS941 (pRFBm1) en cultivo discontinuo, a 300 y 500 rpm, manteniendo la saturación de oxígeno en 30 %.

El resultado anterior es corroborado con la determinación de la materia seca gravimétrica, expresada en la figura 2 como la ganancia neta de biomasa, la cual contempla la diferencia entre la hora final e inicial del cultivo. En este caso la ganancia neta de biomasa, al trabajar en la condición de 300 rpm, duplica a la que se obtiene a 500 rpm, por lo que es favorable la disminución de la agitación en este proceso.



Figura 2. Representación de la ganancia neta de biomasa expresada sobre la base de la materia seca gravimétrica.

Adicionalmente, los valores medios de la ganancia neta de biomasa, expresados en base seca fueron analizados mediante un procedimiento de ANOVA Simple, para detectar o no la existencia de diferencias significativas entre ellos. En la figura 3, se presenta el gráfico de medias, correspondiente a dicho análisis. Según estos resultados se puede plantear que existen diferencias significativas

entre las condiciones de agitación evaluadas, con un valor-P menor que 0.05 (0.0001), con un nivel de confianza de 95 %, al aplicar la prueba de múltiples rangos, con el método de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher.

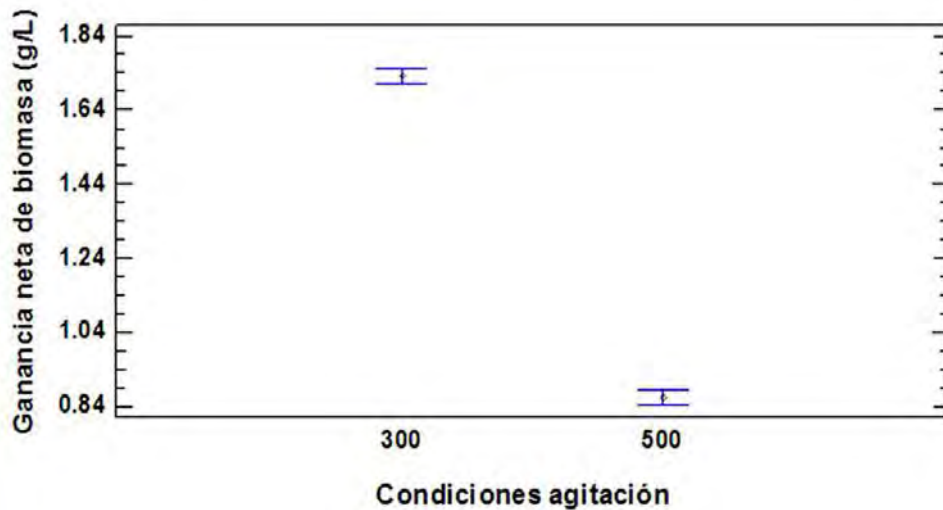


Figura 3. Gráfico de medias, con empleo del método de LSD de Fisher.

Según Potumarthi *et al.* (14), el crecimiento y la producción de proteasas alcalinas en *Bacillus licheniformis* NCIM-2042, se afectaron al trabajar a velocidades de agitación por encima de 300 rpm, al cabo de 72 horas de cultivo, incluso cuando se evaluaron diferentes niveles de aireación en el mismo sistema (1, 2 y 3 vvm) (14).

En la figura 4 se muestra el zimograma para ambas fracciones celulares (biomasa y sobrenadante). La fracción biomasa (figura 5A) se empleó 10 veces concentrada, razón por la cual la banda correspondiente es más intensa que las que se obtienen para la fracción sobrenadante (figura 5B). Resulta evidente la degradación proteolítica sufrida por la DSR-F- Δ SP- Δ GBD, en la fracción sobrenadante (figura 5B), a pesar de que la cepa empleada carece de la proteasa extracelular NprM (1). Malten *et al.* (5) encontraron el mismo fenómeno al emplear este hospedero para producir la dextranasacarasa DSR-S. Es de destacar la detección de una banda a la altura de los 65 kDa, para la fracción biomasa, cuando se trabaja a 300 rpm y 30 % de pO_2 (línea 1 figura 5A) y una banda a la altura de los 50 kDa en la fracción sobrenadante, al trabajar a 500 rpm y 30 % de pO_2 ; para ambos casos, la aparición de dichas bandas demuestra la presencia activa de lo que pudiera ser una dextranasacarasa de menor peso molecular, aunque es necesario demostrar dicha teoría.

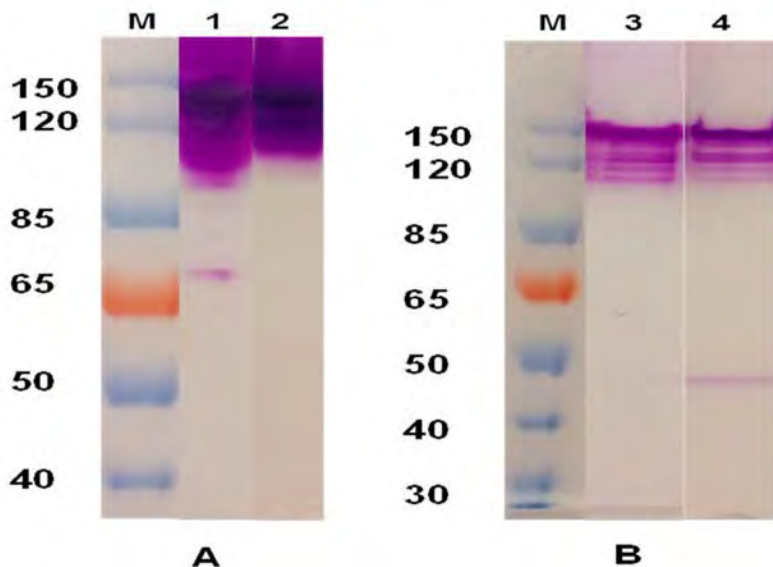


Figura 4. Zimograma para las fracciones biomasa (A), concentrada 10 veces y sobrenadante (B) con agitación a 300 y 500 rpm y el porcentaje de saturación de oxígeno (pO_2) al 30 %. La línea M representa el patrón de peso molecular en ambos geles. Línea 1, biomasa de condición 300 rpm y 30 % pO_2 . Línea 2, biomasa de condición 500 rpm y 30 % pO_2 . Línea 3, sobrenadante de condición 300 rpm y 30 % pO_2 , y, línea 4, sobrenadante de condición 500 rpm y 30 % pO_2 .

La figura 5 muestra la cuantificación de la actividad enzimática en las fracciones biomasa y sobrenadante, para las condiciones de agitación evaluadas en este estudio. En el caso de la fracción biomasa, la actividad detectada se corresponde con la enzima asociada a la pared celular de la cepa de *B. megaterium* MS941 (pRFBm1).

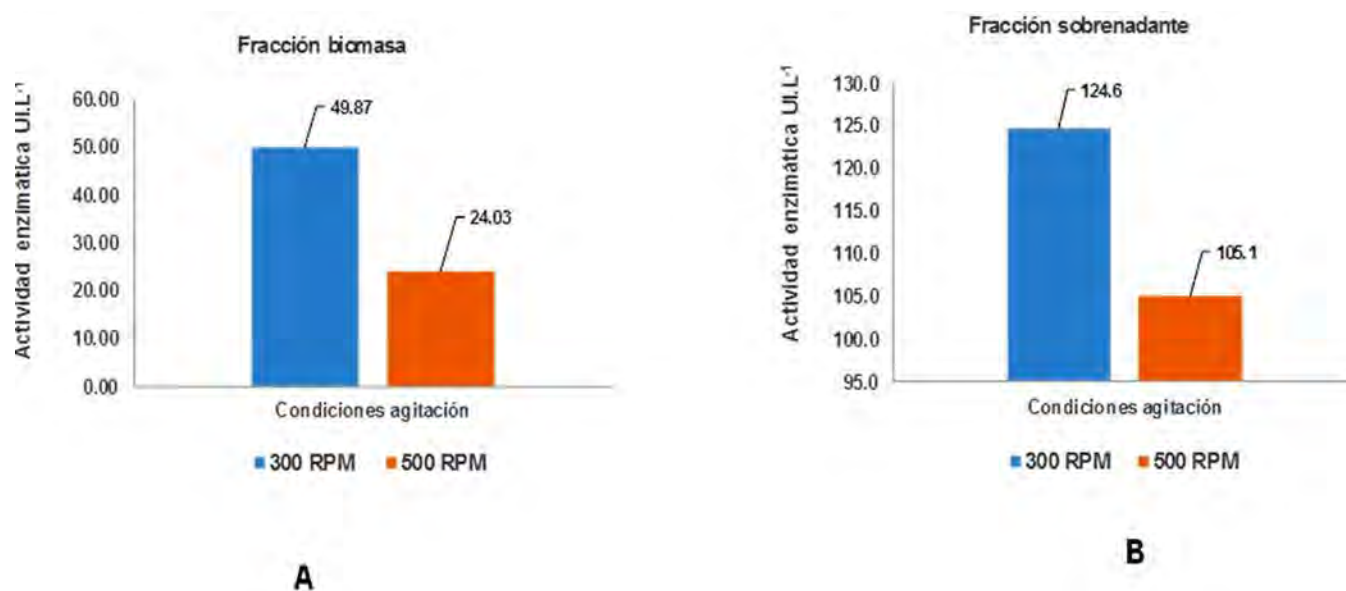


Figura 5. Actividad enzimática dextranasacarasa DSR-F- Δ SP- Δ GBD, expresada en UI.L⁻¹ para las fracciones biomasa y sobrenadante con agitación a 300 y 500 rpm y el porcentaje de saturación de oxígeno (pO₂) al 30 %.

Tal y como se muestra en la figura, a la condición de agitación de 300 rpm, se consiguen mayores valores de actividad enzimática DSR-F - Δ SP- Δ GBD, tanto en la fracción asociada en la biomasa como en el sobrenadante. En el caso de la fracción biomasa los niveles de enzima expresados en UI.L⁻¹ son casi dos veces superiores a 300 rpm. Sin embargo, para la fracción sobrenadante, la superioridad de esta condición resulta más bien ligera.

Conviene destacar que el modo de fermentación por lotes no es el más comunicado en la literatura para la obtención de enzimas dextranasacarasas, sino que los mejores resultados son informados al emplear sistemas de fermentación incrementados. Tal hecho es demostrado por Malten *et al.* (5), que emplean un cultivo discontinuo incrementado para alcanzar elevadas densidades celulares (80 g.L⁻¹) y, por consiguiente, detectan mayores actividades enzimáticas (28600 U.L⁻¹) en un sistema, a partir de *B. megaterium* MS941, produciendo la dextranasacarasa DSR-S, a pesar de trabajar a 500 rpm y 37 °C, durante, 36 horas de cultivo.

A pesar de que los niveles de enzima obtenidos asociados a la biomasa son inferiores (2.5 veces) a los del sobrenadante, al trabajar a 300 rpm, estos últimos no se consideran del todo positivos, lo que coincide con informes de Hollman *et al.* (15), los cuales consideran que el tamaño de esta proteína (180 kDa) puede dificultar su secreción al medio de crecimiento, a pesar de que la variante truncada de DSR-F (DSR-F- Δ SP- Δ GBD) es más pequeña (145 kDa), este mismo hecho pudiera también estar limitando la secreción al sobrenadante de la enzima.

CONCLUSIONES

El aumento de la agitación en el proceso de fermentación discontinuo, bajo las condiciones de estudio, afecta el crecimiento de la cepa *B. megaterium* MS941, tanto como a la producción y secre-

ción de la enzima dextranasacarasa DSR-F- Δ SP- Δ GBD, por lo que se considera conveniente trabajar a velocidades de agitación de 300 rpm. Las mayores concentraciones de enzima se obtienen en la fracción sobrenadante, aunque se detecta la enzima asociada a la biomasa. Estos resultados sugieren emprender nuevos estudios para determinar la velocidad de agitación óptima para el crecimiento de la cepa y la producción de la enzima de interés; así como la relación de este parámetro con la aireación del sistema.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wittchen, K.D., Meinhardt, F. Inactivation of the major extracellular protease from *Bacillus megaterium* DSM319 by gene replacement. Appl. Microbiol. Biotechnol. 42: p. 871-877, 1995.
2. Schmidt, F.R. Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. Appl. Microbiol. Biotechnol. 65: p. 363-372, 2004.
3. Burger, S.; Tatge, H.; Hofmann, F.; Genth, H.; Just, I., Gerhard, R. Expression of recombinant *Clostridium difficile* toxin A using the *Bacillus megaterium* system. Biochem Biophys Res Commun 307: p. 584-588, 2003.
4. Barg, H.; Malten, M.; Jahn, M.; Jahn, D. Protein and vitamin production in *Bacillus megaterium*. In: Barredo, J.L. (Ed.), Microbial Processes and Products. Humana Press, Totowa, NJ, USA, pp: 165-184, 2005.
5. Malten, M.; Hollman, R.; Deckwer, W.; Jahn, D. Production and secretion of recombinant *Leuconostoc mesenteroides* dextranase DsrS in *Bacillus megaterium*. Biotechnol Bioeng 89: p. 206-218, 2005
6. Biedendieck, R.; Beine, R.; Gamer, M.; Jordan, E.; Buchholz, K.; Seibel, J. Export, purification, and activities of affinity tagged *Lactobacillus reuteri* levansucrase produced by *Bacillus megaterium*. Appl Microbiol Biotechnol 74: p. 1062-1073, 2007.
7. Leemhuis, H.; Pijning, T.; Dobruchowska, J.M.; van Leeuwen, S.S.; Kralj, S.; Dijkstra, B.W.; Dijkhuizen, L. Glucansucrases: Three-dimensional structures, reactions, mechanism, α -glucan analysis and their implications in biotechnology and food applications. Journal of Biotechnology 163: p. 250-272, 2013.
8. Seymour, F.R.; Knapp, R.D. Structural analysis of dextrans from strains of *Leuconostoc* and related genera that contain 3-O- α glucosylated-D-glucopyranosyl residues at the branched points or in consecutive linear position. Carbohydr Res 81: p. 105-129, 1980.
9. Alsop, R.M. Industrial production of dextrans. In Progress in industrial microbiology. Pp. 1-44. Amsterdam, 1983.
10. Dols, M.; Remaud-Simeon, M.; Willemot, R.M.; Vignon, M.; Monsan, P. Characterization of the different glucosyltransferase activities excreted in glucose, fructose or sucrose medium by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299. Appl Environ Microbiol 64: p1298-1302, 1998.
11. Enfors, S.O.; Jahic, M.; Rozkov, A.; Xu, B.; Hecker, M.; et al. Physiological responses to mixing in large scale bioreactors. Journal of Biotechnology 85: p175-185, 2001.
12. Protocolo de actividad enzimática, Kit ENZYTEC.
13. Mittal, G.S. Food Biotechnology: Techniques and Applications. Lancaster: Technomic Publishing Co., New York, 1992.
14. Potumarthi, R.; Subhakar, CH.; Jetty, A. Alkaline protease production by submerged fermentation in stirred tank reactor using *Bacillus licheniformis* NCIM-2042: Effect of aeration and agitation regimes. Biochemical Engineering Journal 34: p 185-192, 2007.
15. Hollman, R.; Malten, M.; Biedendieck, R.; Yang, Y.; Wang, W.; Jahn, D.; Deckwer, W.D. *Bacillus megaterium* as a Host for Recombinant Protein Production. Eng. Life. Sci 6: p 470-474, 2006.

Determinación de alcoholes superiores por cromatografía de gases en destilados

Dacelis Borroto-Mato*, Magdalena Lorenzo-Izquierdo, Roxana García-Gutiérrez y Nancy Herrera-Marrero
Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA).

Vía Blanca 804 y Carreta Central, San Miguel del Padrón, La Habana, Cuba.

*dacelis.borroto@icidca.azcuba.cu

RESUMEN

La producción de aguardiente se ha visto afectada en las fábricas debido a la elevada concentración de alcoholes superiores en destilados. En este trabajo se determinaron alcoholes superiores totales en destilados tanto a nivel industrial como a nivel de laboratorio. El método empleado fue la cromatografía de gases. Fueron evaluadas 9 muestras de destilados para el análisis a nivel industrial y 4 muestras de destilados a nivel de laboratorio, formuladas con 4 mieles tributarias. Estas últimas fueron identificadas como: I, II, III y IV (Proceso (mezcla de mieles), Ifraín Alfonso, Melanio Hernández y Uruguay), de acuerdo con el ingenio de procedencia de las mieles tributarias. Los alcoholes superiores 1-propanol y 2-metil-1-butanol, se detectaron en una menor cuantía en los destilados industriales, este hecho nos advierte sobre la necesidad de su cuantificación mediante la cromatografía de gases.

Palabras clave: alcoholes superiores, destilados, cromatografía de gases.

ABSTRACT

Production of spirits has been affected in factories due to high concentration of higher alcohols in distillates products. In this work, total higher alcohols were determined in fermentations both at industrial level and at laboratory level. Method used was gas chromatography. Ninedistillates samples were evaluated for analysis at industrial level and four distillates samples at laboratory level formulated with four tributary molasses. These molasses were identified as I, II, III and IV (Process (mixture of molasses), Ifraín Alfonso, Melanio Hernández and Uruguay) according to origin of tributary molasses. Higher alcohols 1-propanol and 2-methyl-1-butanol were detected to a lesser extent in industrial distillates, this fact warns us about the need for their quantification by gas chromatography.

Key words: higher alcohols, distillates and gas chromatography.

INTRODUCCIÓN

En la fermentación alcohólica son producidos junto con el etanol, muchos compuestos denominados mayoritarios. Entre éstos, algunos de los más importantes resultan los alcoholes superiores: 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 2-metil-1-butanol y 3-metil-1-butanol, separados en las columnas rectificadoras en forma de aceite de fusel (alcoholes con más de dos átomos de carbono) (1). En una segunda etapa de destilación las concentraciones de esos compuestos pueden ser controlados en sus intervalos de concentración para que los productos finales clasifiquen como alcoholes o aguardientes (2).

En el proceso de transformación de azúcares en alcohol, elevadas concentraciones de melazas o siropes pueden afectar la supervivencia de levaduras que tienen diferentes tolerancias a las concentraciones de azúcares y de etanol y no pueden realizar la fermentación en tal medio. Los azú-

cares empleados en la fermentación suelen ser: dextrosa, maltosa, sacarosa y lactosa (azúcar de la leche). El número de levaduras es contado en el laboratorio, o en la industria, mediante cámaras de conteo de Neubauer (3).

Se ha demostrado que dentro de los factores que pueden determinar la composición de la fracción aromática (especialmente los alcoholes superiores) de fermentaciones derivadas de jugos y melazas provenientes de la fabricación de azúcar de caña (4), se encuentran: la cepa *Saccharomyces cerevisiae* empleada, y la relación carbono-nitrógeno, específicamente nitrógeno amínico y amoniacal presentes en el medio de fermentación.

La cuantificación del etanol producido en la fermentación no solamente nos informa sobre la biosíntesis del metabolito primario más importante de esta fermentación, sino también nos permite realizar importantes cálculos que evalúan de forma integral la eficiencia de un sistema: rendimientos en fermentación en base a azúcares suministrados y/o consumidos, índice de consumo de miel y productividad del sistema.

Para evaluaciones que incluyan la fracción aromática, de igual forma los valores de los componentes mayoritarios, deben referirse al grado alcohólico de la fermentación de la cual provienen, pues la generación de estos, está estrechamente relacionada con la síntesis de etanol.

El objetivo de este trabajo es determinar la concentración de alcoholes superiores totales en destilados, tanto a nivel industrial como a nivel de laboratorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Detección de alcoholes superiores totales en destilados a nivel industrial

Fueron evaluadas 9 muestras de destilados de destilerías del Grupo Empresarial AZCUBA, procedentes de diversas regiones del país (tabla 1), colectadas en la campaña 2014-2015. Estas muestras procedieron de destilerías con diferentes esquemas tecnológicos, en cuanto a importantes parámetros operacionales en el área de fermentación (disponibilidad de sistemas de enfriamiento, capacidades instaladas para la propagación desde el laboratorio, volumen efectivo de operación en la sala de fermentadores, así como el tipo de materia prima que procesan durante la campaña (jugo de filtros, miel B, miel final o mezcla de estos sustratos).

Estos fermentados fueron destilados según el procedimiento descrito en la norma para grado alcohólico (5) determinando así su grado alcohólico por densimetría digital y alcoholes superiores por el método cromatográfico descrito.

Detección de alcoholes superiores en destilados obtenidos a nivel de laboratorio

Fueron analizados fermentados a nivel de laboratorio (300 mL) realizados según metodología de Fundora (6), formuladas con 4 mieles tributarias de la Destilería "Paraíso" colectadas en la campaña 2014-2015. Las muestras fueron identificadas como I, II, III y IV, de acuerdo con el ingenio de procedencia de las mieles tributarias.

Estos fermentados fueron igualmente destilados, según el procedimiento descrito en la norma para grado alcohólico (5) y se determinó así su grado alcohólico, por densimetría digital y, alcoholes superiores, por el método cromatográfico descrito.

Método cromatográfico

Se empleó un cromatógrafo de gases modelo GC-17A (SHIMADZU, Japón, Kioto) con columna capilar CP-WAX 10 (60 m. x 0.25 mm d.i. 0.25 μ m espesor de película) con detector de llama (FID) y equipado con inyector automático. El gas portador que se usó fue el hidrógeno 128 kPa; el volumen

Tabla 1. Fermentados a partir de fermentadores finales de destilerías.
Grupo empresarial AZCUBA. Campaña 2014-2015

Muestras	Destilería/Provincia	Descripción tecnológica. Área fermentación			
		Enfriamiento	Propagación*	Materia prima	Volumen operacional
HDu	UEB Heriberto Duquesne / Villa Clara	Presente	Ausente	Jugos de filtro, mezcla mieles B y final	101 m ³
MH1	UEB M. Hernández / Sancti Spíritus	Presente	Presente	Miel final	258 m ³
MH2	UEB M. Hernández / Sancti Spíritus	Presente	Presente	Miel final	258 m ³
MH3	UEB M. Hernández / Sancti Spíritus	Presente	Presente	Miel final	258 m ³
MH4	UEB M. Hernández / Sancti Spíritus	Presente	Presente	Miel final	258 m ³
HMo	UEB H. Molina / Mayabeque	Ausente	Ausente	Miel B	179 m ³
JRa	UEB J. Rabí / Matanzas	Ausente	Ausente	Miel final	131 m ³
ACo	UEB A. Colina / Granma	Presente	Presente	Miel B	180 m ³
AGu	UEB A. Guiteras / Las Tunas	Ausente	Presente	Miel final	210 m ³

* Posean o no capacidades instaladas para la propagación de levaduras a partir de laboratorio con cepas seleccionadas (Presente), o en su defecto (Ausente) propagan a partir de levaduras secas activas comerciales.

de inyección fue de 1 µl Split 1:25 y las temperaturas de la columna: 40 °C por 10 min 40 °C a 70 °C a 5 °C/min, del inyector 150 °C y del detector 250 °C.

Como patrones se utilizaron acetaldehído, acetal, acetato de etilo, metanol, 1-propanol, 1-butanol, 2-metil-1-propanol, 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol y como estándar interno 1-pentanol, reactivos de la firma Sigma-Aldrich, EE.UU, con una pureza superior a 99 %. Estas son firmas productoras regidas por sistemas de gestión de la calidad certificados, según las normas ISO, con certificado de pureza y libre de otras impurezas de congéneres del etanol. El agua para el análisis cumplió con la norma (7).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Alcoholes superiores en destilados industriales

La técnica desarrollada por cromatografía de gases fue aplicada a destilados industriales, colectados en 9 destilerías del sistema AZCUBA, durante la campaña 2014-2015. En la figura 1, de manera representativa, se muestran los cromatogramas superpuestos de dos de los destilados, en los que se pudieron identificar los compuestos presentes, mediante su comparación con los identificados en los cromatogramas de cada una de las concentraciones de la curva patrón elaborada.

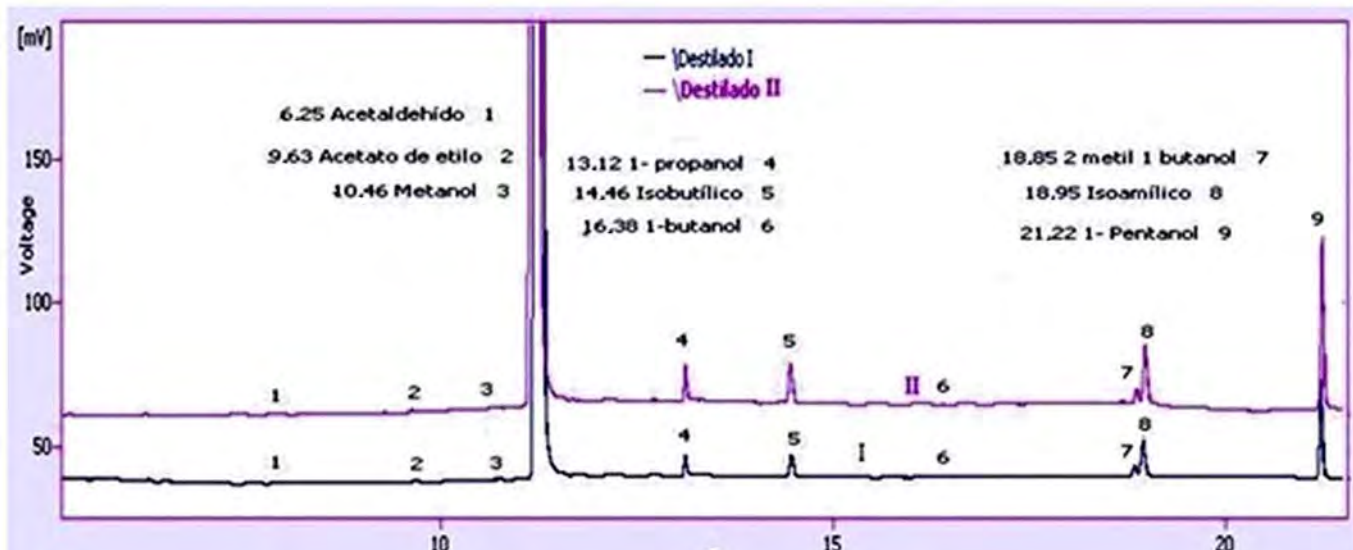


Figura 1. Cromatogramas superpuestos de los destilados con los congéneres y alcoholes superiores identificados, incluyendo los tiempos de retención.

También se pudieron cuantificar cada uno de estos compuestos, mediante el método del estándar interno, que tiene como ventaja que compensa las pequeñas variaciones que se producen en la respuesta cromatográfica, durante la realización de los experimentos y ambos (patrón y componente) sufren las mismas desviaciones en la misma extensión, este método considera la diferencia que existe entre las respuestas específicas de cada componente. La tabla 2 refleja la cuantificación de componentes volátiles mayoritarios en los 9 destilados industriales, obtenidos por destilación simple de fermentados.

Tabla 2. Componentes volátiles mayoritarios en muestras de destilados industriales. detectados mediante cromatografía de gases expresados en g/100 L AA

Destilerías	acetal-dehído	acetato de etilo	Meta-nol	1-pro-panol	2-metil-1-pro-panol	2-metil 1-butanol	3-metil-1-butanol	CT	AST
H. Duquesne	4.9	19.3	3.0	46.2	69.1	52.0	296.5	492.8	463.8
M. Hernández	17.2	14.3	2.0	79.2	109.6	71.3	293.8	590.2	553.9
H. Molina	14.6	16.0	0.7	60.3	180.8	79.6	355.8	707.7	676.5
J. Rabí	5.1	16.0	1.9	58.4	62.6	33.8	209.4	387.2	364.2
A. Colina	6.8	12.6	0.1	41.6	79.3	48.1	272.5	461.0	441.5
A. Guiteras	15.9	36.6	12.1	91.1	80.2	36.1	169.8	441.8	377.1
M. Hernández (2015)	6.1	33.2	1.3	107.8	60.5	43.2	209.1	461.2	420.6
M. Hernández 2015 sulfato F4 grado 4.9	15.6	9.1	2.0	43.7	56.6	40.0	152.1	319.1	292.4
M. Hernández 2015 sulfato F6 grado 4.8	5.9	5.3	3.6	40.5	54.6	33.6	136.4	279.9	265.0

Leyenda: AST (alcoholes superiores totales: suma de 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 2-metil 1-butanol y 3-metil-1-butanol). CT (congéneres totales: suma de todos los componentes).

Alcoholes superiores en destilados obtenidos a nivel de laboratorio

La fracción de alcoholes superiores totales (AST) representó en estos destilados un 93 % de la totalidad de componentes volátiles mayoritarios cuantificados.

La contribución porcentual individual dentro de la totalidad de congéneres detectados se refleja en la figura 2, en la que se grafican los valores promedio obtenidos para cada componente mayoritario.

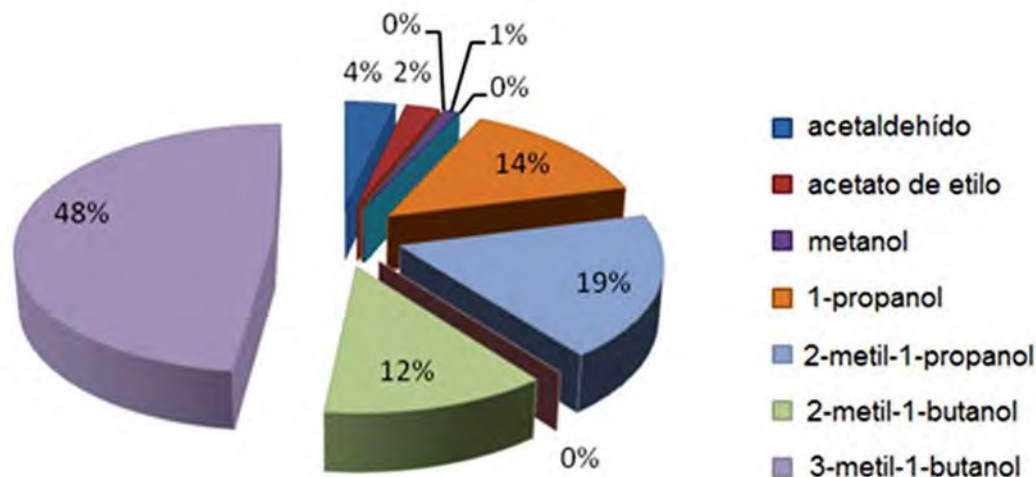


Figura 2. Contribución porcentual de congéneres dentro de la fracción aromática, determinada por cromatografía de gases en los destilados.

Pudieron considerarse representativos los aportes de los alcoholes 3-metil-1-butanol, 2-metil-1-propanol, 1-propanol y 2-metil-1-butanol (en orden descendiente de contribución) y resultó significativo el aporte del 3-metil-1-butanol, que representó cerca del 50 % de la contribución en la fracción aromática, hecho que fija su incidencia sobre la determinación de alcoholes superiores totales.

Aunque los alcoholes 1-propanol y 2-metil-1-butanol se detectaron en una menor cuantía en los destilados industriales, se consideraron representativos dentro de la fracción (>10 %). Los compuestos acetal, 2-butanol y 1-butanol que se presentan en la curva patrón no fueron detectados bajo las condiciones cromatográficas que establece el análisis.

Teniendo en cuenta la composición mayoritaria de la fracción de alcoholes superiores sobre los congéneres totales (figura 2), se muestran solo los resultados para estos componentes, al ser evaluados los fermentados a nivel de laboratorio, por cromatografía gaseosa.

El experimento demostró que la miel tributaria puede ser un factor que incida sobre la formación de los alcoholes superiores totales determinados cromatográficamente (AST): sumatoria de alcoholes 3-metil-1-butanol, 2-metil-1-propanol, 1-propanol y 2-metil-1-butanol. Se detectaron tres grupos de homología para (AST), entre las mieles ensayadas: destacó la miel I, como la de menor síntesis (217.23 g/100 L AA) y las mieles III y IV con concentraciones significativamente mayores (por encima de 350.00 g/100 L AA).

Al particularizar sobre la contribución individual de los alcoholes fusel en esta sumatoria (AST); resultó que, de forma proporcionada, la miel I mostró valores significativamente menores para cada uno de los compuestos contribuyentes, con respecto a las otras 3 mieles evaluadas (figura 3), contrastando con que la miel III propició una mayor formación de cada uno de los alcoholes superiores cuantificados.

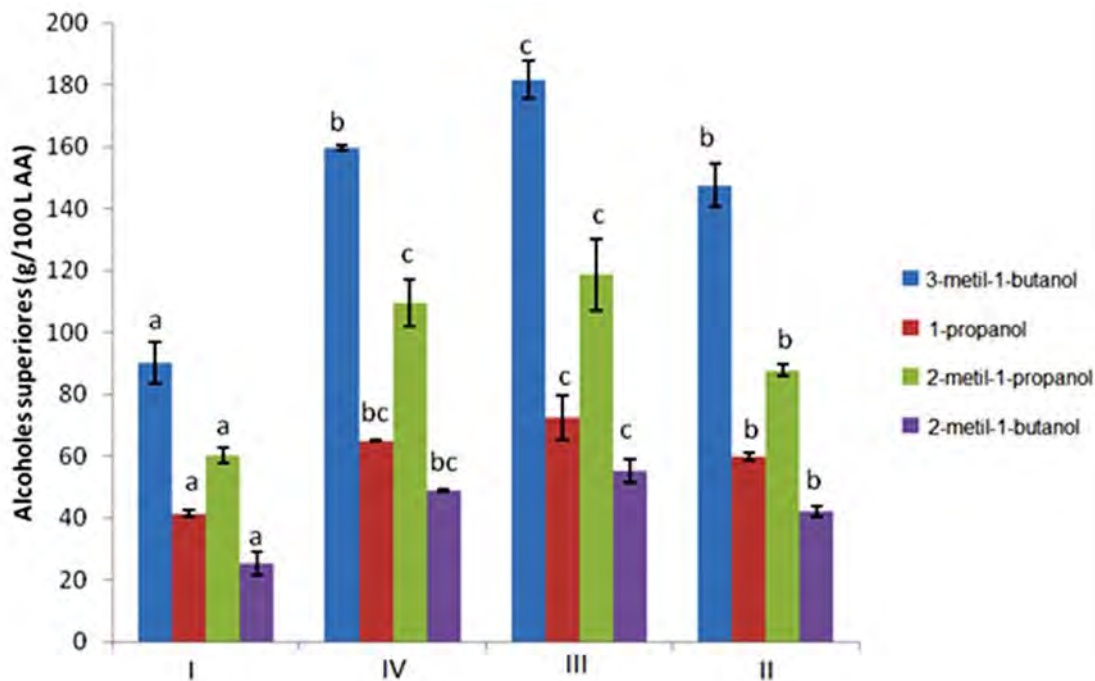


Figura 3. Contribución de alcoholes fusel mayoritarios en la fracción de alcoholes superiores totales, en fermentaciones a nivel de laboratorio con 4 mieles tributarias a Destilería M. Hernández. Letras diferentes denotan diferencias significativas.

Tanto el 1-propanol como el 2-metil-1-butanol mostraron idénticos patrones para las cuatro mieles, en cuanto a los grupos de homología, de acuerdo con el análisis estadístico realizado. La composición porcentual de estos alcoholes, detectada en fermentaciones a menor escala, se correspondió con el patrón observado a nivel industrial en destilerías del Grupo Empresarial AZCUBA.

Estos resultados, en cuanto a la fracción de alcoholes fusel en la composición de destilados a nivel de laboratorio, evidenciaron la sensibilidad y precisión de la técnica cromatográfica para la detección del perfil de síntesis de alcoholes superiores en este tipo de matrices.

Debemos comentar que las fábricas que producen aguardiente para formulación de rones, como por ejemplo la Destilería M. Hernández, a la cual tributan estas mieles, poseen un esquema productivo que evalúa, de forma preliminar, los vinos fermentados al terminar cada fermentador y solo se destinan a la columna de destilación para aguardiente los fermentados que cumplan con los requisitos normados.

La cuantificación por cromatografía gaseosa del alcohol 1-propanol posee un importante valor analítico teniendo en cuenta que llegó a representar aproximadamente un 14 % de la fracción de congéneres totales en los destilados (figura 2).

Conocer la concentración del 1-propanol es determinante dentro de los parámetros de calidad para aguardientes cubanos, según la Resolución del MINAL No. 135/01 (8), que señala dentro de los requisitos tecnológicos para los destilados de fermentados de jugos y mieles finales obtenidas, a partir de la producción de azúcar de caña cultivada y procesada en Cuba, que la relación entre alcoholes superiores debe comportarse según:

$$3\text{-metil-1-butanol} < 2.5 (2\text{-metil-1-propanol} + 1\text{-propanol})$$

En cuanto al cumplimiento de esta premisa, las 4 mieles tributarias mantuvieron este criterio para el perfil aromático, que solo puede dilucidarse a través de técnicas cromatográficas.

CONCLUSIONES

- Los alcoholes 1-propanol y 2-metil-1-butanol se detectaron en una menor cuantía en los destilados industriales pero se consideraron representativos dentro de la fracción (>10 %), de ahí la necesidad de su cuantificación empleando la cromatografía gaseosa.
- El experimento demostró que la miel tributaria puede ser un factor que incida significativamente sobre la formación de los alcoholes superiores en la fracción aromática de los destilados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Estévez, R., ed. 2014b. Manual Tecnológico Industria Alcohólica Cubana. Vol.: 7 Fermentación. La Habana, Cuba: ICIDCA.pp.40.
2. Estévez, R. 2015. Análisis y evaluación del índice de eficiencia en destilerías Plan 2015. ICIDCA.La Habana, Cuba.
3. Alexander, W.G., *et.al.*2016. Efficient engineering of marker-free synthetic allotetraploids of *Saccharomyces*. Fungal Genet Biol:pp.10-17doi:10.1016/j.fgb.2015.11.002.Epub 2015 Nov 7.PMID:26555931. 08/02/16.
4. Scott, D. 2012. Diseño de modelos de calibración multivariada para la determinación de metanol en roncs cubanos a partir de Espectroscopia UV- visible Ingenieril, Ingeniería Química, Instituto Superior Politécnico José Antonio Echeverría.Ingeniero Químico.pp.93.
5. NC-790. 2010. Bebidas alcohólicas determinación del grado alcohólico — métodos de referencia: 1- grado alcohólico por picnometría y 2- grado alcohólico por densimetría digital. Oficina Nacional de Normalización. pp. 1-11.
6. Fundora, N., *et. al.* 2005.Identificación y caracterización fermentativa de cepas de levadura aisladas en la Destilería “A. Guiteras”.Revista ICIDCA.La Habana, Cuba.Vol.: 2.pp.46-50.
7. NC-ISO/IEC3696. 2004. Agua para uso en análisis de laboratorio-Especificación y método de ensayo.Oficina Nacional de Normalización.pp.1-12.
8. MINAL. 2001. Resolución 135 Aguardiente. MINAL.La Habana, Cuba.Vol.:2.Alimenticia.

Evaluación de la efectividad de diferentes métodos de conservación para las cepas de *Rhizobium* sp 3 y *Lactobacillus rhamnosus* LB/103-1-5

Marlyn Pérez-Rodríguez*, Yanelly Díaz-Pérez, Natividad Oliva-Llanes, Direilis Díaz-García, Eulalia Gómez-Santiesteban, Ana Nelis San Juan-Rodríguez, Vivian León-Fernández y Daisy Dopico-Ramírez

Unidad Empresarial de Base (UEB) Bioprocesos Cuba 10. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA). Pablo Noriega, CP 33500. Quivicán. Mayabeque, Cuba.

*marlyn.perez@icidcamy.azcuba.cu

RESUMEN

La Unidad Empresarial de Base (UEB) Bioprocesos Cuba 10, del Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA), tiene entre sus prioridades la creación de bancos de células que le permitan el mantenimiento y conservación, a largo plazo, de los microorganismos que se utilizan para la investigación, desarrollo y producción de bioproductos. Así se garantiza el material biológico necesario para el sostén de estas líneas de trabajo, con ese objetivo se realizó el estudio que se expone. Para establecer los bancos de cepas del *Rhizobium* sp 3 y *Lactobacillus rhamnosus* LB/103-1-5 en glicerol, se utilizó el método de conservación por congelación ó criopreservación a -70 °C y el método alternativo de conservación en suelo estéril, a temperatura ambiente, se seleccionó para la cepa *Rhizobium* sp. El estudio se inició con la ejecución de los protocolos de trabajo, definidos para las cepas objeto de estudio, su aplicación permitió la conservación adecuada de las cepas *Rhizobium* sp 3 y *Lactobacillus rhamnosus* LB/103-1-5, para mantener las propiedades de viabilidad, homogeneidad y pureza de los bancos establecidos. Se obtuvo una mejor respuesta en los bancos de células crioconservados con un 20 % de glicerol (criopreservante) a -70 °C, también se pudo corroborar la eficacia del método de conservación en suelo estéril para la cepa *Rhizobium* sp 3.

Palabras clave: *Rhizobium*, *Lactobacillus*, conservación, glicerol.

ABSTRACT

The Basic Business Unit Bioprocesos Cuba 10, ICIDCA, has among its priorities the creation of cell banks that allow the long-term maintenance and conservation of microorganisms used for research, development and production of bioproducts. In this way, the biological material necessary to support these lines of work is guaranteed, with that objective the study that is exposed was carried out. To establish the *Rhizobium* sp 3 and *Lactobacillus rhamnosus* LB / 103-1-5 strains banks in glycerol, the freezing or cryopreservation method was used at -70 ° C and the alternative method of conservation in sterile soil at room temperature, was selected for the *Rhizobium* sp. The study began with the execution of the working protocols defined for the strains under study and the application of these methods allowed the adequate conservation of the *Rhizobium* sp 3 and *Lactobacillus rhamnosus* LB / 103-1-5 strains, maintaining the properties of viability, homogeneity and purity of established banks. It was obtained a better response in the banks established with 20 % glycerol (cryopreservative) at -70 ° C, as well as the efficacy of the conservation method in sterile soil for the *Rhizobium* sp 3 strain.

Key words: *Rhizobium*, *Lactobacillus*, conservation, glycerol.

INTRODUCCIÓN

La conservación de microorganismos de interés industrial es una técnica básica en todo el proceso. La conservación ha de estar encaminada al mantenimiento de las cepas altamente productivas durante largos períodos de tiempo sin que se produzcan cambios fenotípicos, especialmente en las características relacionadas con la producción de los metabolitos secundarios de interés (1).

Los tres objetivos que hay que alcanzar para conservar correctamente las cepas microbianas en los laboratorios de microbiología son: que el cultivo a conservar sea puro y evitar que se produzcan contaminaciones durante el proceso de conservación; que durante el tiempo de conservación sobrevivan, al menos, el 70 u 80 % de las células y, por último, que estas células permanezcan genéticamente estables (1,2).

Con el fin de dar respuesta a estas necesidades se han desarrollado, a través de los años, diferentes métodos para el mantenimiento y conservación de organismos como bacterias y hongos, entre los que se encuentran la liofilización, congelación, transferencia periódica, suspensión en agua destilada estéril, en capa de aceite mineral, desecación en papel de filtro, desecación en suelo, arena, silicagel, entre otros; con los que se busca detener el crecimiento de las células microbianas sin causar pérdida de viabilidad. Además de mantener la estabilidad y pureza de los organismos preservados (3-5). Por otro lado, la elección de un método u otro depende del tipo de microorganismo a preservar, del tiempo que se deseen mantener conservados los cultivos, de los recursos del laboratorio, así como el entrenamiento del personal encargado (6,7).

Sobre la base de estos aspectos y la disponibilidad técnica que existe en la UEB Bioprocesos Cuba 10, se realizó un estudio de varios métodos de conservación para garantizar la disponibilidad del material biológico que se utiliza en la investigación, desarrollo y producción de dos bioproductos: BIOENRAIZ y PROBICID.

Para la producción del BIOENRAIZ®, se parte de la cepa *Rhizobium* sp, cepa autóctona aislada de suelos de caña de azúcar y seleccionada de un total de 23 cepas. El BIOENRAIZ® es un bioestimulante cuyos componentes activos son los AIA, producidos por la bacteria *Rhizobium* sp. Este ejerce una acción positiva sobre la formación de las raíces y favorece la germinación, se utiliza como fitohormona en los procesos de enraizamiento en viveros de reproducción por esquejes o vitroplántulas, sustituye al químico Actiguard de Novartis, a otras hormonas de Abbot, Ecoscience y Bayery, al indolacético y otros indoles que hoy se importan en forma de reactivo, para ser usados en las biofábricas (8).

El PROBICID, se define como un aditivo alimentario microbiano, que beneficia al animal hospedero, mejorando el balance microbiano del tracto gastrointestinal (TGI), que eleva el sistema inmune, participa activamente en la supresión de patógenos, mejora la asimilación de alimentos poco digeribles y disminuye las sustancias tóxicas, influye en la conversión eficiente del alimento para el crecimiento y/o la producción, y contribuye, además, a una significativa disminución de la morbilidad y mortalidad (9).

Por la necesidad de contar con métodos de conservación que garanticen la preservación de estas cepas, dada su importancia económica, la disponibilidad del equipamiento, la conservación de las cepas y sus características se seleccionó el método de conservación por congelación o criopreservación a -70 °C. Heckly, citado por Perry (10), indica que ante estas bajas temperaturas, la viabilidad celular es casi independiente del período de almacenamiento; además, se cree que los individuos criopreservados, siguen siendo genéticamente estables. Esto ha sido respaldado en los resultados reportados por diferentes autores: Alfonso *et al.* (11), Parra *et al.* (12), Arencibia *et al.* (1), entre otros.

Como método alternativo se eligió la conservación en suelo estéril, a temperatura ambiente, para lo cual se seleccionó la cepa *Rhizobium* sp. El estudio se inició con la ejecución de los protocolos de trabajo, definidos para las cepas objeto de estudio.

Para el mantenimiento de un banco como este, los cultivos deben permanecer puros y homogéneos. Los criterios para evaluar el método seleccionado fueron la viabilidad y pureza microbiana. Lo expuesto anteriormente, constituye el objetivo de este trabajo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas objeto de estudio

- *Rhizobium* sp 3
- *Lactobacillus rhamnosus* LB/103-1-5.

Confección de los bancos de cepas

Para la confección de los bancos de cepas del *Rhizobium* sp 3 en glicerol, se partió de un cultivo fresco crecido en placas con medio agar YMA, incubado a 30 °C, por 48 horas. De las placas crecidas se tomaron la mayoría de las colonias, para ser inoculadas en medio YMA líquido. El cultivo se creció en zaranda a 30 °C, con una agitación de 150 r.p.m., durante 16 h. Al cultivo crecido, una vez verificada su pureza, le fue añadida una solución de glicerol al 20 y al 30 %, para el estudio de los bancos, a diferentes concentraciones de glicerol y se distribuyeron en alícuotas de 1 mL por vial, que se almacenaron a -70 °C.

El banco de cepas del *Rhizobium* sp 3 en suelo estéril, método de conservación alternativo seleccionado, se elaboró a partir de un cultivo fresco crecido en placas con medio agar YMA, incubado a 30 °C, entre 48 y 72 horas. De las placas crecidas se tomaron la mayoría de las colonias, las cuales fueron descargadas en agua desmineralizada estéril. Una vez verificada la pureza por tinción de gram, se distribuyó en alícuotas de 1 mL en tubos con 3 g de tierra estéril, los cuales fueron incubados a 30 °C, por 10 días. Al concluir el período de incubación los tubos fueron almacenados a temperatura ambiente.

Los bancos de cepas del *Lactobacillus rhamnosus* LB/103-1-5 en glicerol, fueron confeccionados a partir de la siembra del microorganismo en medio agar MRS, incubado a 37 °C, de 48 a 72 horas. De las placas crecidas se tomaron la mayoría de las colonias para ser inoculadas en caldo MRS, incubadas a 37 °C, por 16 horas. Al cultivo crecido, una vez verificada su pureza, le fue añadida una solución de glicerol al 20 y 30 %, para el estudio de los bancos a diferentes concentraciones de glicerol y se distribuyeron en alícuotas de 1 mL por vial, que se almacenaron a -70 °C.

Para la recuperación de los microorganismos criopreservados, se tomó un criovial de cada cepa bacteriana, sometido a una temperatura de 37 °C, en baño serológico, con agua destilada, hasta su descongelación por, aproximadamente, cinco minutos (13).

En la realización de los estudios de estabilidad de los bancos, se tomó como tiempo de referencia un año y se controló para evaluar la eficacia del método de conservación en estudio, mediante la medición de la pureza y la viabilidad de cada banco.

Evaluación de la eficacia del método de conservación

Como variables de respuesta seleccionadas para evidenciar la efectividad de estos métodos y evaluar si los organismos conservaban sus características fenotípicas, genotípicas y el potencial industrial, se utilizaron las pruebas de viabilidad y pureza.

Verificación de la viabilidad de los bancos

La verificación de la viabilidad de los bancos se llevó a cabo mediante diluciones seriadas de 10^{-1} hasta 10^{-6} , en solución salina (NaCl 0.9 %) y se sembraron en los medios específicos, según el método descrito por Pérez *et al.* (14).

Las placas se incubaron a la temperatura de 30 °C, durante el tiempo definido para cada microorganismo; después de este tiempo se contaron las colonias y se calculó la viabilidad de los bancos. El número de viables se definió como la cantidad de unidades formadoras de colonias (UFC), contadas en cada traza (número de colonias promedio) multiplicada por 10 (volumen de la alícuota) y por el inverso del factor de dilución, para definir las como UFC/mL. Las especificaciones de calidad de los bancos se definieron para una viabilidad límite, en un orden por debajo de la viabilidad de partida del banco creado.

Verificación de la pureza microbiológica, mediante crecimiento en placa de medios indicadores

Para la verificación de la pureza se toman viales de cada uno de los bancos transfiriendo su contenido a un tubo con 9 mL de caldo triptona soya, que se incubó a 35 ± 2 °C, durante 7 días. Posteriormente, se llevan a cabo diluciones seriadas en solución salina peptonada y se realiza la siembra en superficie, en placas con medio agar triptona soya, que se incuban en posición invertida a 35 ± 2 °C, durante 72 horas. A las placas crecidas se les realizó tinción de Gram, según describió Kuneman *et al.* (15) y se analizaron por inspección visual al microscopio estereoscópico.

Como criterio de pureza microbiológica se tomó la morfología de las colonias y sus habilidades de crecimiento en los diferentes medios de cultivo, así como la homogeneidad de las células por tinción de Gram.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudio de estabilidad de los bancos de cepas del *Rhizobium* sp 3

Los resultados del control establecido para los bancos de cepa del *Rhizobium* sp 3 en glicerol, a diferentes concentraciones, se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Comportamiento de la viabilidad y pureza de la cepa *Rhizobium* sp 3 conservada en glicerol al 20 y al 30 %

Días	20 % Glicerol (Ufc/ml)	Pureza	30 % Glicerol (Ufc/ml)	Pureza
0	2.50E+10	Cultivo puro	1.60E+10	Cultivo puro
15	1.90E+10	Cultivo puro	1.55E+10	Cultivo puro
30	1.60E+10	Cultivo puro	1.05E+10	Cultivo puro
45	1.48E+10	Cultivo puro	1.15E+10	Cultivo puro
60	1.40E+10	Cultivo puro	1.20E+10	Cultivo puro
90	1.30E+10	Cultivo puro	1.10E+10	Cultivo puro
120	2.00E+10	Cultivo puro	1.55E+10	Cultivo puro
150	2.10E+10	Cultivo puro	1.25E+10	Cultivo puro
180	2.15E+10	Cultivo puro	1.60E+10	Cultivo puro
210	2.05E+10	Cultivo puro	1.50E+10	Cultivo puro
240	2.20E+10	Cultivo puro	1.35E+10	Cultivo puro
270	2.25E+10	Cultivo puro	1.55E+10	Cultivo puro
300	2.20E+10	Cultivo puro	1.60E+10	Cultivo puro

Los controles realizados para ambos bancos confirmaron que el método de conservación seleccionado cumple con los indicadores establecidos, lo cual corrobora los resultados reportados por Díaz Alcántaras (16). En la figura 1 se puede observar que para los dos bancos estudiados la viabilidad se mantuvo en el mismo orden en que estos fueron creados, que es un indicativo de la efectividad del método.

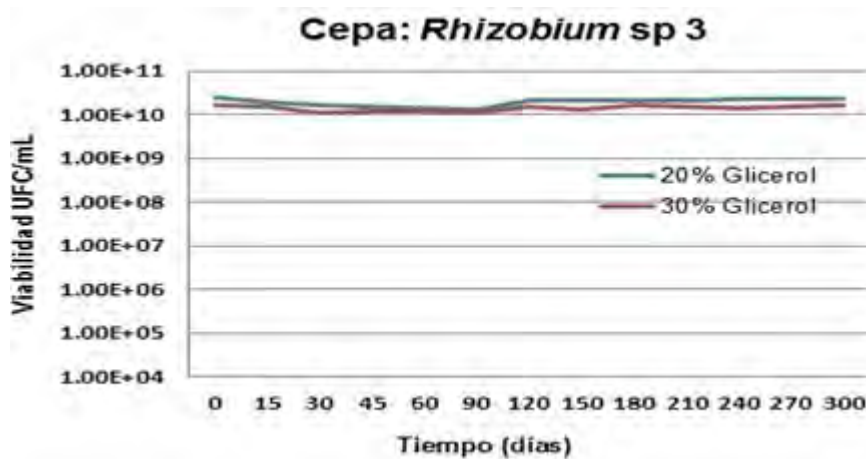


Figura 1. Viabilidad de la cepa del *Rhizobium* sp 3 conservada en glicerol (20 y 30 %), por período de un año.

Mediante el uso del software Statgraphics Centurion se realizó un análisis estadístico para determinar si existen diferencias significativas entre los porcentajes de glicerol aplicados. Para ello se realizó una comparación de líneas de regresión UFC mL versus tiempo (días) por porcentaje de glicerol.

De este análisis se obtuvo el modelo ajustado de regresión lineal para describir la relación entre UFC mL, tiempo en días y porcentaje de glicerol. La representación gráfica de las ecuaciones del modelo ajustado para cada porcentaje de glicerol se muestra en la figura 2.

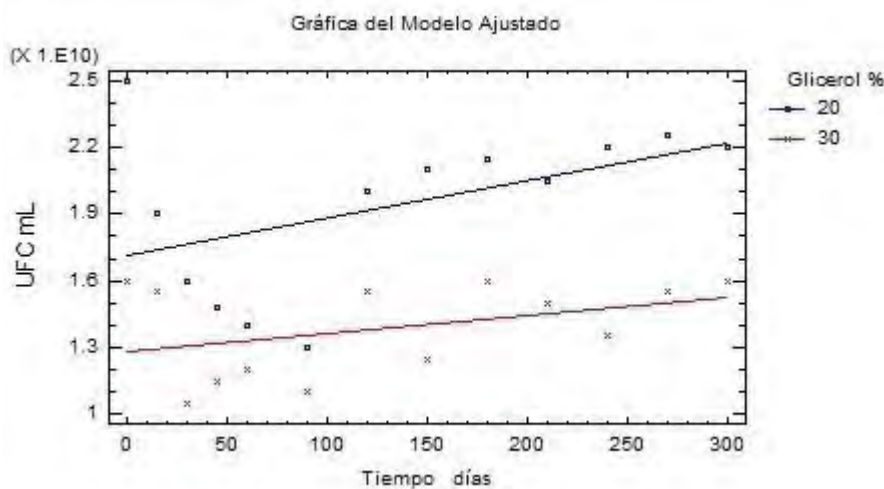


Figura 2. Modelo ajustado de los bancos de cepa del *Rhizobium* sp 3 a diferentes niveles del criopreservante empleado (glicerol al 20 y 30%).

El valor-P obtenido, para el modelo ajustado, fue de 0.0003 (menor a 0.05), lo que indica que existe una relación estadísticamente significativa entre las variables, con un nivel de confianza del 95.0 %.

El análisis ANOVA para variables (tabla 2), permite evaluar la significancia estadística de los términos en el modelo. Dado el valor-P para los interceptos es menor que 0.01, existen diferencias estadísticamente significativas entre los interceptos para los diferentes porcentajes de glicerol, con un nivel de confianza del 99 %.

Tabla 2. ANOVA adicional para variables según el orden de introducción

Fuente	Suma de cuadrados	GI	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Tiempo días	3.8499E19	1	3.8499E19	4.79	0.0394
Intercepto	1.92794E20	1	1.92794E20	24.01	0.0001
Pendientes	4.39354E18	1	4.39354E18	0.55	0.4673
Modelo	2.35686E20	3			

Por el análisis realizado, se concluye que existen diferencias estadísticamente significativas, para los diferentes porcentajes de glicerol aplicados en los bancos de cepa de *Rhizobium* sp 3; el banco donde se aplicó un 20 % de glicerol, tuvo una mejor respuesta en cuanto a los niveles de viabilidad, durante el tiempo de estudio (1 año).

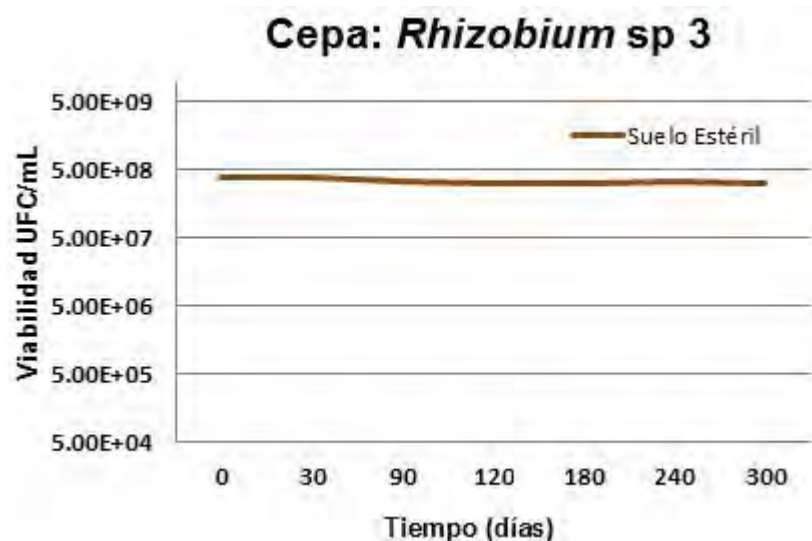
Conservación del *Rhizobium* sp 3 en suelo estéril

En relación con el estudio del banco de *Rhizobium* sp 3 en suelo estéril, método alternativo seleccionado, sus resultados se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Comportamiento de la viabilidad y pureza de la cepa *Rhizobium* sp 3 conservada en suelo estéril

Días	Suelo estéril (UFC/mL)	Pureza
0	3.90E+08	Cultivo puro
30	3.80E+08	Cultivo puro
90	3.35E+08	Cultivo puro
120	3.25E+08	Cultivo puro
180	3.10E+08	Cultivo puro
240	3.30E+08	Cultivo puro
300	3.10E+08	Cultivo puro

Como se puede observar, en el seguimiento realizado al banco (figura 3), se logró mantener en el mismo orden la viabilidad, durante el tiempo fijado para el estudio, lo que indica que el método de conservación empleado es eficaz. Estos resultados se comprobaron mediante los ensayos realizados en relación con la pureza y los niveles de viabilidad obtenidos.

**Figura 3.** Viabilidad de la cepa del *Rhizobium* sp 3 conservada en suelo estéril por período de un año.

Estudio de estabilidad de los bancos de cepa del *Lactobacillus rhamnosus* LB/103-1-5

Los resultados obtenidos del control establecido para los bancos de cepa del *Lactobacillus rhamnosus* LB/103-1-5, a diferentes porcentajes de glicerol como agente crioprotector, se exponen en la

tabla 4 y en la figura 4. Como se puede observar, se logró obtener un elevado nivel de supervivencia para ambos bancos, lo que indica la efectividad del método de conservación y confirma los resultados reportados por Brizuela (9) en la conservación del *Rhizobium* a -70 °C

Tabla 4. Comportamiento de la viabilidad y pureza de la cepa *Lactobacillus rhamnosus* LB/103-1-5, conservada en glicerol al 20 y 30 %

Días	20 % Glicerol (UFC/mL)	Pureza	30 % Glicerol (UFC/mL)	Pureza
0	1.50E+09	Cultivo puro	1.00E+09	Cultivo puro
15	1.40E+09	Cultivo puro	1.00E+09	Cultivo puro
30	9.00E+08	Cultivo puro	1.00E+09	Cultivo puro
60	1.60E+09	Cultivo puro	1.20E+09	Cultivo puro
90	1.30E+09	Cultivo puro	1.10E+09	Cultivo puro
120	8.90E+08	Cultivo puro	9.70E+08	Cultivo puro
150	1.50E+09	Cultivo puro	9.50E+08	Cultivo puro
180	1.10E+09	Cultivo puro	9.00E+08	Cultivo puro
210	1.10E+09	Cultivo puro	8.90E+08	Cultivo puro
240	1.20E+09	Cultivo puro	1.10E+09	Cultivo puro
270	1.40E+09	Cultivo puro	1.10E+09	Cultivo puro
300	9.50E+08	Cultivo puro	8.00E+08	Cultivo puro
330	5.30E+08	Cultivo puro	5.90E+08	Cultivo puro
360	7.90E+08	Cultivo puro	4.10E+08	Cultivo puro

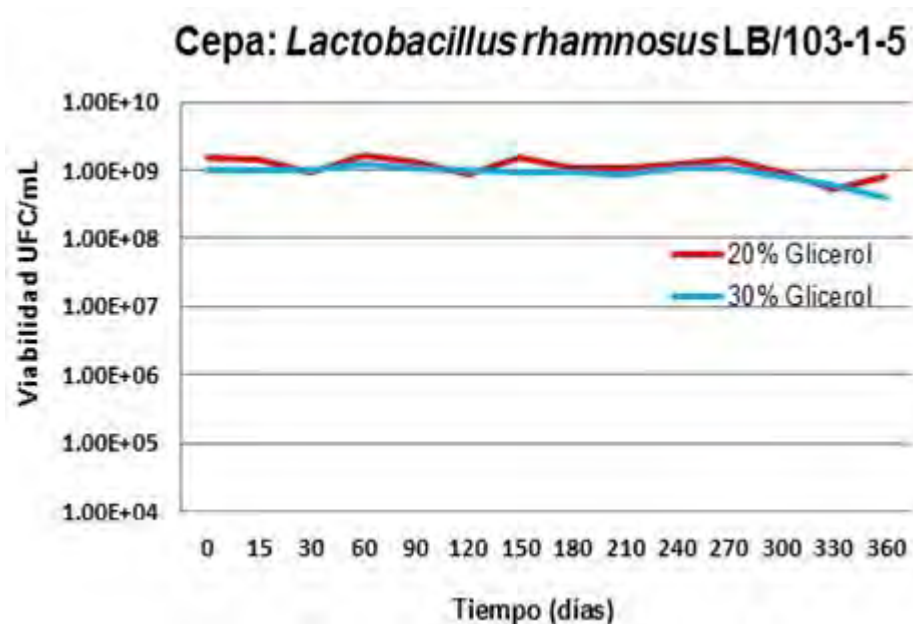


Figura 4. Viabilidad de la cepa *Lactobacillus rhamnosus* LB/103-1-5 conservada en glicerol (al 20 y 30 %), por período de un año.

En el análisis estadístico realizado para determinar si existen diferencias significativas entre los porcentajes de glicerol aplicados, se ejecutó una comparación de líneas de regresión UFC mL versus tiempo (días) por porcentaje de glicerol. La representación gráfica de las ecuaciones del modelo ajustado para cada valor de porcentaje de glicerol se muestra en la figura 5.

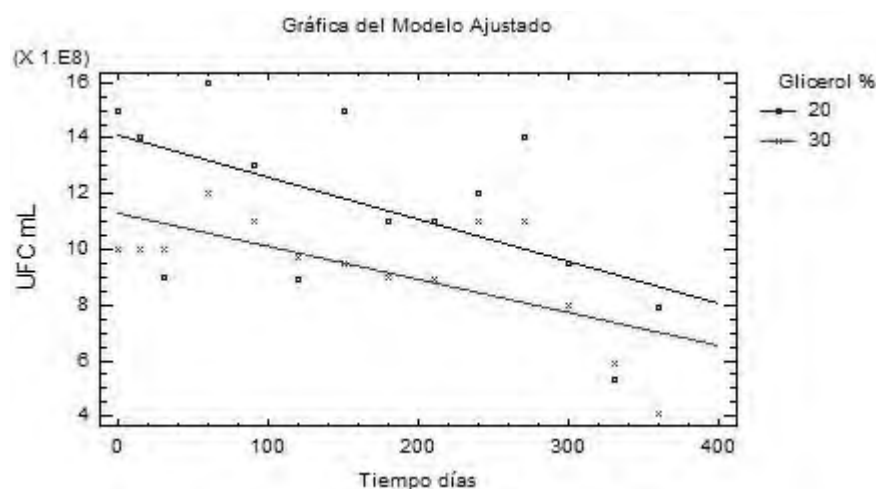


Figura 5. Ajuste del modelo para la conservación de la cepa *Lactobacillus rhamnosus* LB/103-1-5 a los porcentajes de glicerol empleados (glicerol al 20 y 30%).

El valor-P obtenido, para el modelo ajustado, fue de 0.0014 (menor a 0.05), lo que indica que existe una relación estadísticamente significativa entre las variables, con un nivel de confianza del 95.0 %.

El análisis ANOVA para variables (tabla 5), permite evaluar la significancia estadística de los términos en el modelo. Dado que el valor-P para los interceptos es menor que 0.05, existen diferencias estadísticamente significativas, entre los interceptos para los diferentes porcentajes de glicerol con un nivel de confianza del 95 %.

Tabla 5. ANOVA Adicional para variables, según el orden de introducción

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Tiempo días	6.81373E17	1	6.81373E17	13.91	0.0010
Interceptos	3.54375E17	1	3.54375E17	7.24	0.0128
Pendientes	1.11296E16	1	1.11296E16	0.23	0.6379
Modelo	1.04688E18	3			

Del análisis realizado se puede concluir, que existen diferencias estadísticamente significativas, para los diferentes porcentajes de glicerol aplicados en los bancos de cepa de *Lactobacillus rhamnosus* LB/103-1-5; el banco donde se aplicó un 20 % de glicerol tuvo una mejor respuesta en cuanto a los niveles de viabilidad obtenidos en el tiempo estudiado (1 año).

CONCLUSIONES

Según los resultados del estudio realizado, se pueden plantear las siguientes conclusiones:

1. Se establecieron y controlaron los bancos de cepa del *Rhizobium* sp y *Lactobacillus rhamnosus* LB/103-1-5, con el método de conservación de congelación a -70 °C y como agente criopreservante el glicerol al 20 y al 30 %.
2. Se estableció el banco de cepa del *Rhizobium* sp en suelo estéril como método de conservación alternativo.
3. La eficacia de los métodos de conservación empleados, se midió mediante el empleo de los ensayos de viabilidad y pureza en los bancos objeto de estudio, por un período de un año.
4. La viabilidad de los bancos objeto de estudio se mantuvo por encima del valor establecido para el control de calidad y el cultivo puro.

5. Se demostró que existen diferencias estadísticamente significativas para los dos niveles de glicerol aplicados, en los bancos de cepa de *Rhizobium* sp 3 y el banco donde se aplicó un 20 % de glicerol, tuvo una mejor respuesta en cuanto a los niveles de viabilidad obtenidos en el tiempo estudiado.
6. En los bancos de cepa *Lactobacillus rhamnosus* LB/103-1-5, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas para los diferentes porcentajes de glicerol aplicados, el banco donde se aplicó un 20 % de glicerol tuvo una mejor respuesta en cuanto a los niveles de viabilidad obtenidos en el tiempo estudiado.
7. Se pudo comprobar que el método de conservación en suelo estéril de la cepa *Rhizobium* sp 3 fue eficaz y se mantuvo la pureza del banco y la viabilidad en el mismo orden en que se creó.
8. Los resultados de este estudio demuestran que los métodos de conservación empleados para las bacterias estudiadas son eficaces, ya que permiten obtener bancos de células estables, según los criterios evaluativos establecidos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Arencibia, D. F.; Rosario, L. A.; Gámez, R. 2008. I Taller Científico de los Laboratorios LIO-RAD, VI Taller de Colecciones de Cultivos Microbianos y otros Materiales Biológicos. Finlay Ediciones. ISBN: 978-959-7076-20-9.
2. Juarros, E.; Tortajada, C.; García, M.D.; and Uruburu F. 2000. Storage of stock cultures of filamentous fungi at -80°C : effects of different freezing-thawing methods. Microbiología SEM. 9, 28-33.
3. Gato, Y. 2010. Métodos de conservación y formulación de *Trichoderma harzianum* Rifai. Revista Fitosanidad. 14(3), 189–195
4. García, M.; Uruburu, F. 2000. La conservación de cepas microbianas. Actualidad SEM, 30, 12–16.
5. Sarmiento, Y.; Hazel, A.; Cárdenas, D. 2013. Evaluación de la estabilidad de *Trichoderma* sp y *Azotobacter* sp conservados por diferentes métodos Revista Colombiana de Biotecnología. XV (1), 150–158.
6. Rico, M.; Piattoni, C.; González, C.; Monela, R.; Latorre, M.; Lura, M. 2004. Viabilidad de cepas fúngicas conservadas mediante diferentes métodos. Revista FABICIB. 8, 163– 172.
7. Weng, Z.; Olvido, E.; Álvarez, I. 2005. Conservación de microorganismos: ¿Qué debemos conocer? Revista Cubana de Higiene y Epidemiología. 43(3), 1–4.
8. San Juan, A.; Gómez, E.; Guevara, Y.; Pérez, M.; Fraga, R.; León, V.; et al. 2017. Producción de bioproductos en la UEB Bioprocesos Cuba 10. Un aporte a la seguridad alimentaria sostenible. Premio Innovación Tecnológica. CITMA Mayabeque.
9. Brizuela, M. A. 2003. “Selección de Cepas de Bacterias Lácticas para la Obtención de un Preparado con Propiedades Probióticas y su Evaluación en Cerdos” Tesis de Opción del Grado Científico de Doctor en Ciencias Veterinarias. Biblioteca del Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar.
10. Perry, S. F. 1995. Freeze-Drying and Cryopreservation of Bacteria. En J. G. Day, & M. R. Mc Lellan. (Ed.), Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols (Primera ed., págs. 21-30). New Jersey: Humana Press Inc.
11. Alfonso, M.; González, N.; López, N. 2015. Viabilidad y características culturales, tintoriales, morfológicas y bioquímicas de una colección bacteriana. Revista Cubana de Medicina Militar. 44(1):105-111.

12. Parra, S. L.; Pérez, M. M.; Bernal, M.; Suarez, Z.; Montoya, D. 2006. Implementación y evaluación de dos métodos de conservación y generación de la base de datos del banco de cepas y genes del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (IBUN). Nova - publicación científica ISSN:1794-2470 vol.4 No. 5 enero - junio de 2006:1-116
13. Castañeda, R. A.V. 2015. Pruebas de viabilidad a cinco cepas bacterianas criopreservadas y estudio para la liofilización de las mismas, evaluando tres compuestos protectores, pertenecientes al banco genético del laboratorio de microbiología de la facultad del medio ambiente y recursos naturales de la universidad distrital Francisco José de Caldas. Tesis de Grado. Facultad de ciencias y educación Proyecto curricular de licenciatura en biología. Bogotá D.C. p. 25.
14. Pérez-Reytor, D.C.; Domínguez, I.; Sosa, A.E. 2002. Evaluación del método de siembra en placa “traza de la dilución” en el control de calidad de bancos de *Escherichia coli* K12. Biotecnología Aplicada. 19:169-73.
15. Kuneman, E.W.; Allen, S.D. 1992. Diagnóstico Microbiológico. Tercera Edición. Editorial Médica Panamericana. Argentina.
16. Díaz Alcántara, C.A. 2010. Aislamiento, caracterización y selección de *rhizobia* autóctonos que nodulan habichuela roja (*Phaseolus vulgaris* L.), en la República Dominicana. Tesis Doctoral. Universidad de León.

Implementación del sistema medioambiental por la norma 14001:2015, integrado al Sistema Calidad-Inocuidad en Bodegas Vigía

Maricela Vega-Batista*, Idania Blanco-Carvajal, Eric Estrada-Medina, Carlos Molina-Maqueira, Arlyn Reyes Linares y Dayamí Hernández-Salcedo
Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar, (ICIDCA).
Vía Blanca 804 y Carretera Central, San Miguel del Padrón, La Habana, Cuba.
[*maricela.vega@icidca.azcuba.cu](mailto:maricela.vega@icidca.azcuba.cu)

RESUMEN

Todas las organizaciones repercuten sobre el medio ambiente y generan un impacto ambiental. Hoy en día la sociedad demanda que estas se impliquen en su cuidado y la respuesta la constituyen los Sistemas de Gestión Ambiental, como una oportunidad para mejorar su comportamiento.

En este trabajo se resume la implementación del Sistema de Gestión Ambiental, integrado al Sistema de Calidad-Inocuidad en Bodegas Vigía y se toma como base la elaboración de un Plan de Acción Ambiental, en el que se identifican y evalúan los aspectos e impactos ambientales que se generan del proceso productivo del Ron Vigía y las medidas de mitigación necesarias que garanticen una gestión acorde con las políticas y estrategias ambientales del sector azucarero y del país.

Para la obtención de información se realizó una revisión documental de los procedimientos del área. Se evaluó la disposición de los residuos y se tuvo en cuenta su clasificación, así como el tipo de tratamiento empleado en cada caso.

Palabras clave: medio ambiente, impacto ambiental, programa ambiental.

ABSTRACT

All organizations have an impact on the environment, generating an environmental impact. Nowadays society demands that these be involved in their care and the response is the Environmental Management Systems, as an opportunity to improve their behavior.

This paper summarizes the implementation of the Environmental Management System, integrated into the Quality-Safety System at Bodegas Vigía, based on the preparation of an Environmental Action Plan where the environmental aspects and impacts generated by the process are identified and evaluated. productive of the Ron Vigía and the necessary mitigation measures that guarantee a management according to the environmental policies and strategies of the sugar sector and the country.

To obtain information, a documentary review of the procedures of the area was carried out. The disposal of waste was evaluated taking into account its classification, as well as the type of treatment used in each case.

Key words: environment, environmental impact, environmental program.

INTRODUCCIÓN

Todas las organizaciones, como consecuencia de su actividad, repercuten sobre el medio ambiente y generan, en mayor o menor medida, un impacto ambiental. En la actualidad, la sociedad demanda a las organizaciones que se impliquen en su cuidado y la respuesta a estas exigencias la

han visto en los Sistemas de Gestión Ambiental, como una oportunidad para mejorar su comportamiento (1).

La implantación de un sistema de gestión ambiental permite a la organización identificar aquellos aspectos ambientales derivados de su actividad que puedan tener un impacto sobre el medio ambiente y, en consecuencia, establecer las acciones pertinentes para actuar sobre ellos y minimizar su impacto.

- Aspecto ambiental: elemento de las actividades, productos o servicios de una organización que puede interactuar con el medio ambiente.
- Impacto ambiental: cualquier cambio en el medio ambiente, sea adverso o beneficioso, como resultado total o parcial de los aspectos ambientales.

El Instituto Cubano de las Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA), ha trazado una Estrategia Ambiental en aras de incluir la dimensión ambiental en su gestión empresarial. Es interés de la alta dirección integrar el Sistema de Gestión Ambiental (SGA) al Sistema de Gestión Calidad-Inocuidad (SGCI), certificado desde el año 2011, con alcance a la producción de ron en Bodegas Vigía.

Es objetivo fundamental de este trabajo la implementación del Sistema de Gestión Ambiental en Bodegas Vigía, según la NC ISO 14001:2015 (2), tomando como base la elaboración de un Plan de Acción Ambiental en el que se identifican y evalúan los aspectos e impactos ambientales que se generan del proceso productivo del Ron Vigía y las medidas de mitigación necesarias, que garanticen una Gestión Ambiental acorde con las políticas y estrategias ambientales del sector azucarero y del país.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se consultaron documentos como: Guía para la implementación de la NC-ISO 14001, Metodología para la ejecución de los diagnósticos ambientales en el marco del proceso de obtención del Reconocimiento Ambiental Nacional (RAN) del Centro de Información, Gestión y Educación Ambiental (CIGEA) (3) y conferencias impartidas por el Grupo de Trabajo Estatal de Bahía de La Habana (4).

Como técnicas de investigación para recopilar la información se emplearon las siguientes:

- La observación y revisión documental: levantamiento de campo, tomando evidencias gráficas y la revisión de la documentación técnica elaborada por el área.
- El método análisis estadístico e histórico: técnicas analíticas utilizadas en la determinación de los parámetros de control evaluados para comprobar la eficiencia de la gestión integrada de los residuales líquidos.

Se realizó una auditoría interna por parte de auditores del ICIDCA, para evaluar la implementación del sistema.

Identificación de los aspectos ambientales

Para llevar a cabo la identificación de los aspectos ambientales se consideraron los elementos que dependen de la gestión empresarial. El carácter significativo se estableció de acuerdo con criterios ambientales tales como: escala, severidad, duración del impacto, tipo, tamaño, frecuencia de su aspecto ambiental asociado.

Para determinar la magnitud de los impactos ambientales, se realizó una evaluación por el método cualitativo y se tuvo en cuenta la probabilidad de ocurrencia de estos y su severidad o consecuencia sobre el medio ambiente.

A partir de los valores obtenidos en la evaluación cualitativa de la magnitud de los impactos ambientales, se procedió a su tipificación; además, se realizó una valoración general de éstos para su gestión posterior, según se ilustra en la tabla 1.

Tabla 1. Tipificación de los aspectos e impactos ambientales

Escala cualitativa	Valor	Tipificación (+, -)	Valoración general (aspectos e impactos negativos)
Muy Alto	5	Severo	Paro de la actividad para tomar las acciones correctivas inmediatas que requieren de inversión para mitigar el impacto.
Alto	4	Importante	Acciones inmediatas para mitigar y minimizar el impacto, se requiere de inversión para la recuperación de los aspectos ambientales afectados a largo plazo.
Medio	3	Moderado	Acciones preventivas y correctivas para la prevención o mitigación del impacto.
Bajo	2	Tolerable	Acciones preventivas para la prevención del impacto.
Muy Bajo	1	Trivial	No se requiere acción específica.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el mes de octubre de 2018, se realizó una auditoría interna a todos los procesos que conforman el SGCI del ICIDCA y se incluyó la revisión del cumplimiento de los requisitos de la norma de medio ambiente para verificar el estado de la implementación y su funcionamiento en Bodegas Vigía. A partir de los resultados de la auditoría, se determinaron oportunidades de mejora para la ejecución de acciones necesarias, con vistas a la implementación del Sistema de Gestión Ambiental, según la NC ISO14001:2015.

Partiendo de la información recopilada en la Revisión Ambiental Inicial (RAI) y con la participación de las personas familiarizadas con las actividades, se realizó un análisis de todas las etapas del proceso productivo del Ron Vigía (figura 1) con la finalidad de identificar los impactos ambientales. Fue necesario determinar los aspectos ambientales asociados a dichos impactos, con el objetivo de poder mantener un control sobre estos.

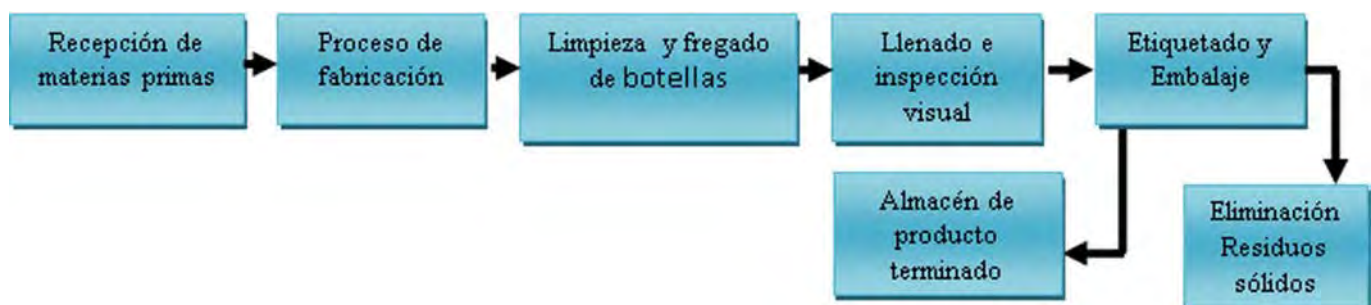


Figura 1. Etapas del proceso productivo del ron Vigía.

Se elaboró un plan de acción ambiental (figura 2), que recoge toda la información de la evaluación realizada. Este programa está dirigido a la mejora continua del desempeño ambiental de Bodegas Vigía y no solo a la solución de los problemas existentes, constituye una descripción documentada

de los medios que la empresa destina a lograr los objetivos y metas ambientales y cada una de las acciones contempladas en él está subordinada a las metas ambientales declaradas. También, se definieron los recursos necesarios para la implementación, las fechas de cumplimiento y las personas responsables de cada acción propuesta.

Actividades/ Productos/Servicios	Aspectos	Impactos reales y potenciales	Clasificación			Evaluación	Acciones para Mitigar el impacto	Responsable	Fecha de cump. de las medidas	Indicador	Recursos
			Carácter del impacto	Evaluación del riesgo							
				Probabilidad	Severidad	Índice de evaluación del riesgo					

Figura 2. Plan de acción ambiental.

Se pudo identificar un total de 25 aspectos relacionados con: las emisiones al aire, vertidos al agua (6), descargas al suelo, el uso de la energía y los residuos; cuya clasificación resultó entre moderadas y tolerables. Se definieron un total de 30 acciones que deben ser controladas a través de los 10 indicadores establecidos, que se analizarán para poder interpretar lo que está ocurriendo y tomar decisiones que contribuyan con el mejoramiento del desempeño en Bodegas Vigía y facilitar la integración de la gestión ambiental con otros procesos.

Se modificaron los documentos del SGCI para incluir los requisitos de la norma NC-ISO 14001:2015. Entre dichos documentos se encuentran cuatro procedimientos (Higiene del personal, Preparación y respuesta ante emergencias y Control de la Producción y Trazabilidad, Ambiente de trabajo, acceso, saneamiento, reglas de seguridad y control de plagas) y 3 registros asociados a dichos procedimientos. Se definió el cronograma de capacitaciones para la formación del personal en temas medioambientales y en los cambios realizados a la documentación.

CONCLUSIONES

Los datos recopilados en la etapa de identificación y evaluación de los impactos ambientales, constituyeron una fuente importante para la elaboración del Plan de Acción Ambiental, que sirvió de guía para la implementación del Sistema de Gestión Ambiental en Bodegas Vigía, según la NC ISO 14001:2015 y contribuir a su mejor desempeño ambiental.

De los 25 aspectos ambientales identificados y evaluados ninguno resultó significativo y se definieron un total de 30 acciones que deberán ser controladas a través de los 10 indicadores establecidos.

La integración de ambos sistemas de gestión se evitó la duplicidad de documentos y permitió racionalizar el uso de los recursos, mantener políticas y objetivos organizacionales integrados y mejorar la imagen de la empresa.

Se definió el cronograma de capacitaciones para la formación del personal en temas medioambientales, toma de conciencia de los directivos y trabajadores y en los cambios realizados a la documentación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Identificación y Evaluación de Aspectos Ambientales. Ihobe, Junio 2009, España. 18 pág. Mayo 2018.
2. NC ISO: 14001:2015. "Requisitos y Metodologías para el diagnóstico ambiental". 50 pág. Octubre 2017.
3. Metodología para la ejecución de los diagnósticos ambientales en el marco del proceso de obtención del reconocimiento ambiental nacional (RAN) del CIGEA, 2012. 23 pág. Mayo 2018.
4. Conferencias impartidas por el Grupo de Trabajo Estatal de Bahía de la Habana. Enero 2018. 14 pág.
5. NC 27:2012. "Vertimiento de aguas residuales a las aguas terrestres y al alcantarillado. Especificaciones". Octubre 2017.
6. NCTS 827:2012 "Agua potable. Requisitos Sanitarios". 12 pág. Mayo 2018.