

2. E. de 96



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**



**EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA**

**CARACTERIZACION DEL PIGMENTO ROJO  
DE LA JIOTILLA ESCONTRIA CHIOTILLA**

**T E S I S**  
**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE**  
**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**  
**P R E S E N T A**  
**ROSALINA SUSANA PIMENTEL GARCIA**

**MEXICO, D. F.**

**1984**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## INDICE

	Página
CAPITULO 1 INTRODUCCION Y OBJETIVOS	3
CAPITULO 2 ANTECEDENTES	3
-HISTORIA DE LOS COLORANTES DE ALIMENTOS	3
-LEGISLACION DE LOS COLORANTES	4
-ESTRUCTURA DE LAS BETALAINAS	8
-ESTABILIDAD DE LA BETANINA	13
-ASPECTOS GENERALES SOBRE <u>ESCONTRIA CHIOTILLA</u>	17
CAPITULO 3 MATERIALES Y METODOS	19
-OBTENCION Y TRATAMIENTO DE MUESTRAS	19
-FERMENTACION	19
-DISEÑO DE LA COMPOSICION DE UN MEDIO DE CULTIVO	21
-CUANTIFICACION ESPECTROFOTOMETRICA	22
-MEDICION DE CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS	22
-MEDICION DE pH	23
-DETERMINACION DE SOLIDOS TOTALES	23
-DETERMINACION DE AZUCARES REDUCTORES	23
-HIDROLISIS ENZIMATICA	23
-EXTRACCION ACUOSA DE BETACIANINAS	23
-CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRESION (HPLC)	24
-COMPARACION DE LA ESTABILIDAD ENTRE LOS PIGMENTOS DE JIOTILLA Y LOS DE BETABEL	24
a) EFECTO DE LA TEMPERATURA	24
b) EFECTOS DE LUZ, AIRE Y N <sub>2</sub>	26

	Página
CAPITULO 4 RESULTADOS Y DISCUSION	27
-FERMENTACION	27
-CUANTIFICACION ESPECTROFOTOMETRICA	27
-CRECIMIENTO DE <u>CANDIDA UTILIS</u>	27
-AZUCARES REDUCTORES	30
-PECTINASA	30
-EXTRACCION ACUOSA	30
-CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRESION (HPLC)	34
-COMPARACION DE LA ESTABILIDAD ENTRE LOS PIGMENTOS DE JIOTILLA Y LOS DE BETABEL	34
a) EFECTO DE LA TEMPERATURA	34
b) EFECTO DE LUZ, AIRE Y N <sub>2</sub>	39
CAPITULO 5 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	45
CAPITULO 6 BIBLIOGRAFIA	47
-APENDICE	49

## 1.- INTRODUCCION Y OBJETIVOS

Es bien conocido el daño que producen los colorantes sintéticos, de aquí que después de muchos estudios se acierta a echar mano de nuestros valiosos recursos naturales; siendo de esta manera uno de los objetivos de esta investigación extraer el colorante de un fruto silvestre que pertenece a la familia de las cactáceas, llamado comúnmente "jiotilla" (Escontria chiotilla).

Los objetivos de este trabajo consistieron en concentrar los pigmentos de jiotilla y betabel, a través de una fermentación, para después evaluar su estabilidad de dichos pigmentos, tanto de muestras fermentadas como no fermentadas. Se estudió el comportamiento de los pigmentos a pH 3,5 y 7 a temperaturas de 50, 75 y 95°C; así como a exposiciones de luz, aire y N<sub>2</sub>. Finalmente se analizó el perfil, de los pigmentos fermentados y no fermentados, por cromatografía líquida de alta presión (HPLC).

## 2.- ANTECEDENTES

El color es un factor importante, ya que es el primer contacto que se tiene con los alimentos; de forma tal que el consumidor lo juzga primeramente por su apariencia (color, forma etc.) y a continuación por su textura y sabor.

Casi todos los alimentos ya sea en forma natural, como procesada, tienen un color característico y bien definido por el cual el consumidor los identifica; debido a esto, los fabricantes de alimentos usan colorantes naturales y artificiales para normalizar sus productos y evitar el desconcierto del público al encontrar que el color del alimento varía día a día.

La utilización de colores en alimentos, se remonta a épocas antiguas por ejemplo, las especias y los condimentos así como colorantes son usados desde hace 3000 años (IFT Expert Panel and Food Safety, 1980). Los colorantes utilizados en esa época probablemente provenían de minerales, plantas y animales.

En los siglos XVIII y XIX fabricantes inescrupulosos empezaron a explotar las características que presentan los colorantes, para vender alimentos de una calidad dudosa. De esta manera los vinos franceses eran coloreados con fucsina. Dinitrocresol se utilizó para colorear: macarrones, licores y mantequilla. Por otro lado se utilizó anilina para blanquear harina.

A los encurtidos les daban un color verde agradable por sulfato de cobre. Algunos dulces eran coloreados por sales de plomo y cobre altamente tóxicas, lo cual repercutió en problemas de salud hasta que se empezaron a legislar los colorantes para evitar su efecto nocivo o bien descontinuar el uso de los evidentemente tóxicos.

En Inglaterra se aprobó la primera Acta de Alimentos y Drogas en 1860. Y le siguieron otros países europeos que limitaron el uso de colorantes en alimentos, permitiendo solo aquéllos que respetaran aplicaciones específicas.

En E.U.A. los colorantes de alimentos fueron controlados en 1886 y en este nuevo siglo el Departamento de Agricultura (Bureau of Chemistry) de los Estados Unidos de América se dedicó a investigar el uso apropiado de los colorantes existentes, gran parte fué supervisado bajo la dirección del Dr. Bernhard C. Hesse, quién trató de obtener información de los fabricantes de Alemania, Inglaterra, Bélgica y U.S.A., acerca de colorantes usados, en la cual encontró opiniones contradictorias, posteriormente revisó los datos de pruebas toxicológicas realizadas en conejos, perros y humanos; de estos compuestos, siendo aceptados solamente siete colores, finalmente su uso fué legalizado bajo la acta de drogas y alimentos puros de 1906 bajo las siglas FD&C y son los siguientes:

NOMBRE COMUN	NOMBRE FDA
Ponceau 3R	FD&C Rojo No. 1
Amaranto	" Rojo No. 2
Eritrosina	" Rojo No. 3
Naranja 1	" Naranja No. 1
Naftol amarillo	" Amarillo No. 1
Verde claro	" Verde No. 2
Indigotina	" Azul No. 2

A través de cierto tiempo se observó que el uso de los colorantes acrecentaba causando grandes problemas como cáncer y efectos nocivos sobre la reproducción animal; de aquí que hubo que tomar medidas drásticas para controlarlos; y así fué como en Estados Unidos a partir de 1938 se requiere que todos los colorantes de alimentos sean probados en animales bajo la supervisión de

la F.D.A. Los colorantes sintéticos FD&C, que se usan en la Unión Americana con permiso gubernamental, se conocen como colores certificados y el proceso de certificación consiste en realizarles análisis químicos, bioquímicos, toxicológicos y médicos, los cuales deben garantizar la salud de los consumidores. (Hushke, 1981; Jefries, 1970).

El organismo que se encarga de la legislación de alimentos en los Estados Unidos es la "FOOD AND DRUG ADMINISTRATION" (FDA) y sus regulaciones y decisiones se publican en el Federal Register, bajo el título 21 de alimentos y drogas. En México se cuenta con la Dirección de Alimentos y Bebidas de la Secretaría de Salubridad y Asistencia, la cual, por lo general adopta varias de las disposiciones de la FDA.

Los estudios de los colorantes deben incluir:

- 1) Determinación de toxicidad aguda vía oral en ratas
- 2) Toxicidad aguda intraperitoneal en ratones y un mínimo de 60 días de pruebas de toxicidad mediante alimentación con el colorante
- 3) Suministro prolongado crónico de colorantes en el alimento de 2 especies de roedores generalmente ratas y ratones (una de las especies debe constar de hembras preñadas)
- 4) Suministro de colorante en el alimento de una especie diferente a los roedores (usualmente perro)
- 5) Un estudio teratológico
- 6) Un estudio de reproducción múltiple.

Con todos estos requerimientos solo 7 FD&C colorantes son permitidos en los alimentos y son :

FD&C Verde No. 3

FD&C Azul No. 1

FD&C Rojo No. 3

FD&C Azul No. 2

FD&C Rojo No. 40

FD&C Amarillo No. 5

FD&C Amarillo No. 6

Las regulaciones para los aditivos alimentarios permitidos en México se encuentran en el reglamento de aditivos para alimentos, emitido por el Sector Salud del Gobierno Federal y publicado en el Diario Oficial del 15 de febrero de 1958. (Secretaria de Salubridad y Asistencia 1958). Resaltando el hecho que esto no ha sido actualizado. En el artículo 12 se mencionan los colorantes organo-sintético permitidos en México, para utilizarlos en alimentos siendo:

Amarillo No. 5	(Tartrazina)
Amarillo No. 6	(Sunset FCF)
Azul No. 2	(Indigotina)
Rojo No.1	(Ponceau 3R)
Rojo No. 2	(Amaranto)
Rojo No. 3	(Eritrosina)
Rojo No. 4	(Ponceau 5x)
Rojo No. 5	(Carmosina)
Rojo No. 6	(Ponceau 4R)
Violeta No. 1	(Violeta lana 5 BN)

Los colorantes artificiales FD&C son derivados del alquitrán de hulla y pertenecen a la clase de colorantes azoicos, nitrosados de pirazolona, indigoídes, xanteno, antraquinona, quinolina y tiazina. (Viades, 1979)

El uso del colorante Rojo FD&C No. 1 (Ponceau 3R) demostró que su ingestión, durante períodos largos sería perjudicial para la salud pública y se canceló su registro provisional para su uso en alimentos, drogas y cosméticos.

El Rojo No. 2 (Amaranto) fué aprobado para su uso en una emisión del 13 de julio de 1907 por el Departamento de Agricultura de U.S.A. donde estudios de toxicidad aguda y crónica, hechos durante los años setentas con animales de laboratorio no revelaron efectos adversos, pero en 1970 se publicaron resultados por investigadores rusos, que concluyeron que el amaranto es capaz de producir cáncer y efectos nocivos sobre la reproducción animal. Posteriormente la FDA inició un estudio de toxicidad crónica por ingestión de este colorante con ratas preñadas a las cuales diariamente se les administró diferentes dosis de 7.5, 15, 30, 100 y 200 mg/Kg (por medio de un tubo estomacal) observándose la muerte de fetos que ocurrió en todas las dó-

sis, excepto en la de 7.5 ng/Kg de peso (Viades, 1979; Villegas, 1979).

La FDA nombró un Comité Consultivo de Toxicología para que analizara todos los datos y estudios disponibles sobre el FD&C Rojo No. 2. Este comité rechazó el estudio previo debido a que la dosis de prueba no se mantuvo constante y el grado de extensión de autólisis del tejido hacían difícil la evaluación patológica, por lo que no se podía demostrar en forma concluyente la toxicidad del colorante. Así mismo en 1980 se rechazó una petición de registro permanente de FD&C Rojo No. 2 debido a que la información disponible era insuficiente para demostrar que el colorante era de uso seguro en alimentos.

Investigadores canadienses consideraban un inadecuado control experimental e indicaron que no hay explicación de por qué la aparición de tumores solo se daba en ratas hembras y que este hecho, siguiendo un razonamiento lógico, podía utilizarse como evidencia de que en ratas machos el Amaranto previene la aparición de cáncer.

Además, los científicos canadienses señalan que según sus propios estudios, el FD&C Rojo No. 2 no es mutágeno y esta es una característica que generalmente se presenta aunada a los efectos teratogénicos; por otra parte la estructura química del amaranto no es semejante a la de otros colorantes que se ha encontrado producen cáncer. Como resultado de estas consideraciones el Ministro Canadiense de Salud y Bienestar Nacional, decidió en 1976 continuar con el uso de FD&C Rojo No. 2 en alimentos y en la misma posición están Suecia, Dinamarca, Alemania Occidental, Japón y los Países miembros de la Comunidad Económica Europea.

Por otra parte, Canadá ha rehusado permitir el uso en alimentos del FD&C Rojo No. 40, después de que datos proporcionados por la Oficina de Salud Pública demostraron que su seguridad era insuficiente.

Sin embargo el Rojo No. 40 ha sido aprobado en forma permanente para usarlo en alimentos en E.U.A. ese mismo año (1974) y es en la actualidad el único color rojo certificado que se admite en E.U.A. para cualquier uso en alimentos.

## ESTRUCTURA DE LAS BETALAINAS

El orden Centrospermae, está compuesto por las familias: Chenopodiaceae, Amaranthaceae, Portulacaceae, Nictaginaceae, Phytolaccaceae, Stegnosperma-ceae, Aizoaceae, Basellaceae, Cactaceae y Didieraceae. (Piattelli y Minale, 1964). Dentro de este orden se encuentran las betacianinas (rojas) y beta-xantinas (amarillas); siendo los pigmentos responsables del color en el betabel (Beta vulgaris). Ellas colectivamente son conocidas como betalainas. La betacianina más abundante en betabel es la betanina (Fig.No 1) y se encuentra en una proporción de 75% a 95%.

Otras betacianinas en betabel son: betanidina (Fig. No. 2), probetanina y sus C-15 isómeros. (Cuadro No. 1). La estructura general de las betalainas deriva de un aminoácido (Fig.No. 3) y un aldehído (Fig.No. 4) llamado ácido betalámico (Buchi, et al 1978).

La estructura de la betanina fué descubierta por Dreiding y sus colaboradores y la relación entre betacianinas y betaxantinas fué establecida firmemente por la interconversión química de la betanidina e indicaxantina (Fig.No. 5) a través del ácido betalámico.

Las betacianinas se pueden hidrolizar con ácidos o enzimas y formar los aglicones llamados betacianidinas. A su vez los aglicones de las betacianinas son diastereoisómeros y se les dieron los nombres de betanidina e isobetanidina. (Fennema, 1976; Mabry y Dreiding, 1968). (Fig.No. 6).

Químicamente, la betanidina es un alcaloide y en sustancias naturales de este tipo, se la ha dado la expresión de "cromo alcaloide" (Peterson y Joslyn, 1960).

El proceso de hidrólisis catalizado con enzimas, da origen a la betanidina exclusivamente. La betanidina tiene dos átomos de carbono asimétricos, uno en C-2 y otro en C-15. La betanidina y la isobetanidina, tienen configuración -S en el C-2 y la diferencia entre ambos aglicones depende de la configuración en el C-15, de modo que la betanidina tiene configuración -S y la isobetanidina tiene configuración -R (Fennema, 1976).

La betanina en solución con agua presenta una absorción máxima a 536-538 nm; Schwartz y Von Elbe, en 1980 determinaron su absorbancia molar ( $\epsilon$ ) con un valor de 60500 litro mol<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>; convirtiendo la absorbancia molar, al coeficiente ideal de extinción ( $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ ) se obtiene un valor de 1120% mol<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> (Nilsson, 1970), que se usa para calcular la concentración real de la

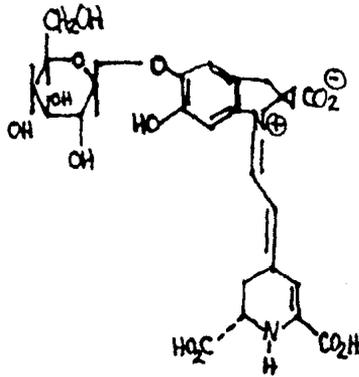


FIG. NO. 1 BETANINA

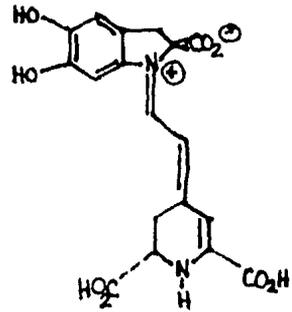


FIG. NO. 2 BETANIDINA

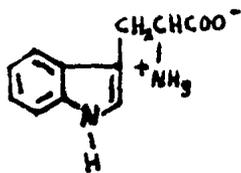


FIG. NO. 3 TRIPTOFANO

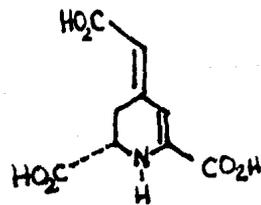


FIG. NO. 14 ACIDO BETALAMICO

CUADRO No. 1

Clasificación de todas las Betacianinas Encontradas en Frutas, Flores, Hojas, Raíces de Betabel y Cactus. \*

Pigmento	E $\frac{1 \text{ cm}}{1\%}$ **	$\lambda$ máx (nm H <sub>2</sub> O)	Movilidad Electroforética	
			pH 4.5 ***	pH 2.4 ****
1.- Amarantina		536	1.16	1.00
2.- Isoamarantina		536	1.16	1.00
3.- Betanina	1120	538	1.00	1.00
4.- Isobetanina	1120	538	0.93	0.93
5.- Iresinina-I		538	1.17	1.00
6.- Iresinina-II		538	1.17	1.00
7.- Filocactina	740	538	1.25	1.00
8.- Celosianina		544-546	1.26	1.11
9.- Isofilocactina	740	538	1.14	0.93
10.- Isocelosianina		542-544	1.26	1.11
11.- Buganvilleina-I		538-540	0.96	0.94
12.- Buganvilleina-II		540-542	0.90	0.92
13.- Gomprelina-I		535-537	1.00	0.96
14.- Betanidina	1290	542-546	1.00	0.70
15.- Buganvilleina-III		540-542	1.00	0.94
16.- Buganvilleina-IV		540-542	0.96	0.81
17.- Isobetanidina	1290	542-546	0.87	0.70
18.- Gomprelina-II		536-538	0.91	0.89
19.- Oleracina-I		534-536	0.80 0.72	0.72
20.- Oleracina-II		534-536	0.80	0.72
21.- Gomprelina-III		536-538	0.91	0.89
22.- Buganvilleina-V		540-542	0.84	0.81
23.- Buganvilleina-VI		544-546	0.84	0.81
24.- Buganvilleina-VII		544-546	0.84	0.81
25.- Gomprelina-IV		540-542	0.80 0.72	0.72
26.- Prebetanina		540-542	1.34	1.78
27.- Buganvilleina-VIII		544-546	0.84	0.81
28.- Isoprebetanina		540-542	1.21	1.78

Pigmento	E $\frac{1 \text{ cm}}{1\%}$ **	$\lambda$ máx (nm H <sub>2</sub> O)	Movilidad Electroforética	
			pH 4.5 ***	pH 2.4 ****
29.- Buganvileina-IX		544-546	0.84	0.81
30.- Gomprenina-V		542-544	0.80	0.72
31.- Buganvileina-X		544-546	0.84	0.81
32.- Gomprenina-VI		542-544	0.80	0.72
33.- Rivianina		541-543	1.34	1.78
34.- Buganvileina-XI		544-546	0.84	0.81
35.- Gomprenina-VII		542-544	0.80	0.72
36.- Buganvileina-XII		548-550	0.66	0.52
37.- Gomprenina-VIII		540-542	0.80	0.72
38.- Buganvileina-XIII		549-551	0.66	0.52
39.- Buganvileina-XIV		550-552	0.66	0.52
40.- Buganvileina-XV		544-546	0.51	0.37
41.- Buganvileina-XVI		544-546	0.51	0.37
42.- Mesembriantemina		540-542	0.48	0.28

I, II y III

\* (Piattelli y Minale 1964)

\*\* para los pigmentos que se desconoce su valor de E  $\frac{1 \text{ cm}}{1\%}$  se asume que es de 1000.\*

\*\*\* Movilidades Electroforéticas relativas a betanina con formato de piridina 0.05 M.

\*\*\*\* con ácido fórmico 0.1 M.

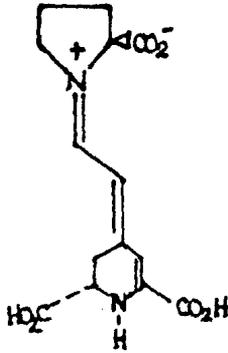


FIG.NO. 5 INDICAXANTINA

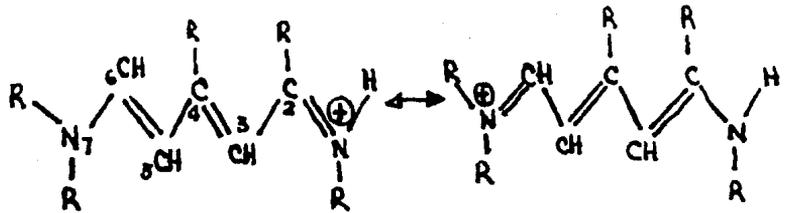


FIG.NO.7 IMPORTANCIA DE LOS RADICALES PARA EL COLOR DE LAS BETALAINAS

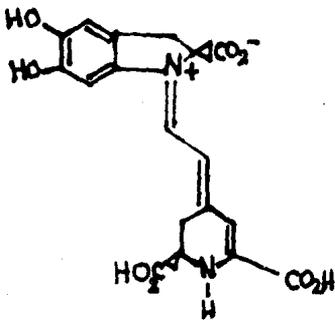


FIG.NO. 6 ISOBETANIDINA

betanina . El color de la betalaina se debe a la resonancia de su estructura; sí R o R' no extienden la resonancia, el compuesto es amarillo (betaxantinas); sí R o R' (Fig.No. 7) sí extienden la resonancia, el color será rojo.

En la familia Cactaceae, es la betanina la que se encuentra en mayor cantidad; la filocactina se encuentra en una menor cantidad y ésta presenta en agua un coeficiente ideal de extinción ( $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ ) = 740 y una  $\lambda$  máxima = 538 nm (Piattelli, et al 1964; Piattelli e Imperato, 1969). (Fig.No. 8).

Los pigmentos amarillos (Piattelli, et al 1964 y Piattelli, Minale 1964) primero conocidos como flavocianinas y después llamados betaxantinas, son poco atractivos, ya que son difíciles de purificar debido a su sensibilidad a agentes químicos (Singer y Von Elbe, 1980) además su tiempo de vida media es menor.

Dentro de las betaxantinas en betabel, Piattelli; et al (1965), determinó dos estructuras dandóles el nombre de vulgaxantina I y II (Figs. No. 9 y 10). La indicaxantina, -que fué el primer pigmento amarillo aislado por Piattelli- es el responsable del color amarillo de las frutas del cactus Opuntia ficus indica. La diferencia entre estas betaxantinas y la indicaxantina, radica en la prolina la cual es reemplazada por los aminoácidos glutamina para vulgaxantina I y ácido glutámico para vulgaxantina II. (Piattelli, et al 1965).

Los pigmentos de las betalainas son afectados por varios factores incluyendo luz, pH, temperatura, oxígeno, metales, etc.; todas son solubles en agua lo que amplía su uso en los alimentos (Pasch y Von Elbe, 1979).

La actividad de agua ( $a_w$ ) también influye en la estabilidad de la betanina; Pasch en 1975 encontró que el tiempo de vida media de este pigmento es casi 4 veces mayor cuando  $a_w = 0.37$  que cuando  $a_w = 1.0$  (Pasch y Von Elbe, 1975).

Por lo que la ausencia de luz, pH óptimo, reduciendo la exposición del oxígeno atmosférico y disminuyendo la actividad de agua, contribuirá a aumentar el tiempo de vida media.

Ahora que considerando la estructura de la betanina, el mecanismo de regeneración quizá envuelve un ataque nucleofílico por agua en el C-11, hidrolizando el sistema conjugado. Esto es la causa de la formación de productos intermedios de degradación como el ciclodopa y ácido betalámico. La formación del ácido betalámico para betanina ha sido reportado como la

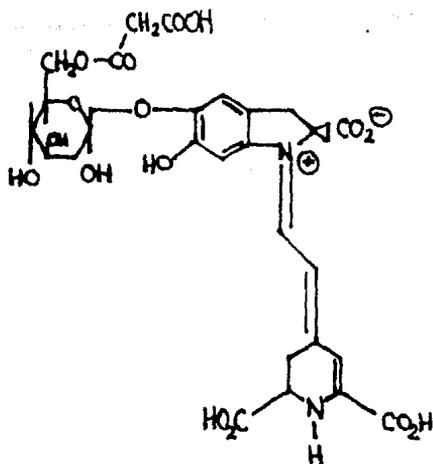


FIG. NO. 8 FILOCACTINA

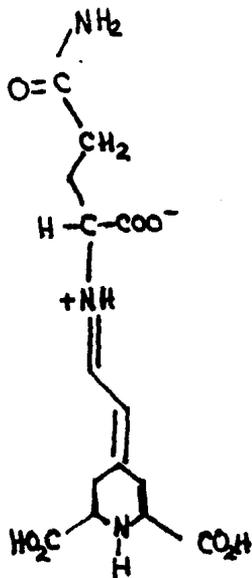


FIG. NO. 9 VULGAXANTINA I

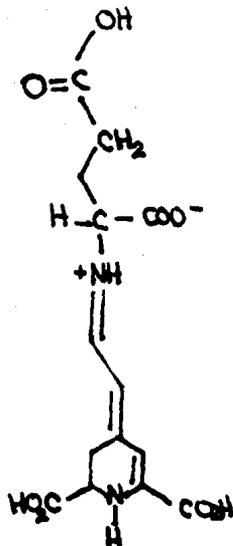


FIG. NO. 10 VULGAXANTINA II

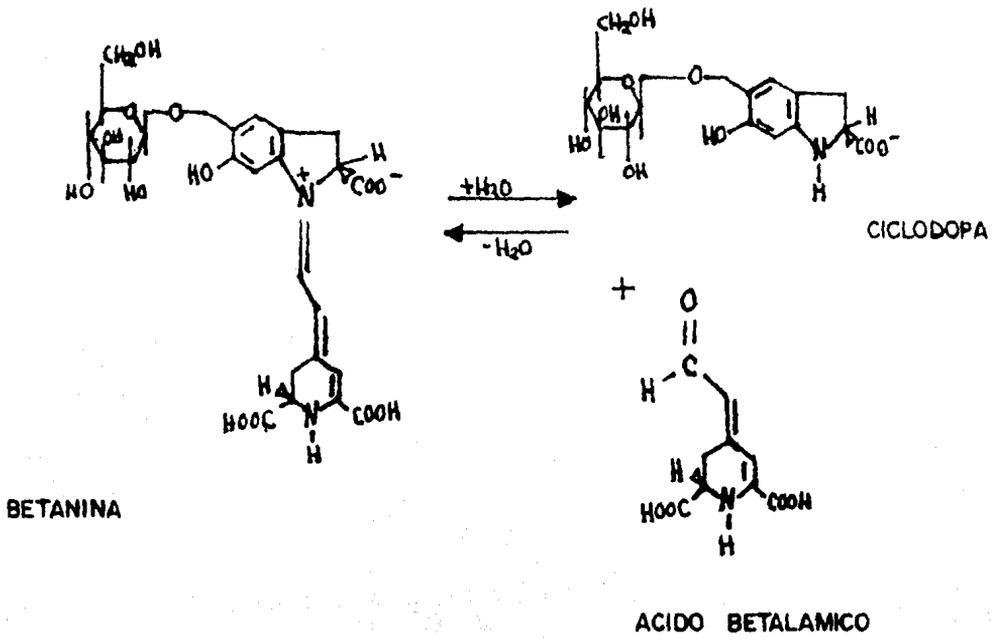
probable llave intermediaria en la degradación de betanina. La regeneración del proceso quizá envuelve una condensación de Schiff de la amina nucleofílica del ciclodopa con el aldehído del ácido betalámico. Esta regeneración le ocurre más lentamente a pH 3.75 comparado con un pH de 6. La baja regeneración del proceso a bajo pH quizá puede ser explicado por la protonación del amino ciclodopa, reduciendo su nucleofilicidad y así impidiendo la condensación de la reacción. La cinética de este proceso de regeneración necesita un futuro estudio y la proposición de un mecanismo bajo esta investigación (Von Elbe, et al 1981). (Fig.No. 11).

Ya que la purificación parcial de los concentrados de colorante de betabel comercialmente contenían solo: 0.2 - 1% (peso húmedo) de betacianinas, (Adams, et al 1976), esta baja concentración de pigmento requería adicionar grandes cantidades a los alimentos para obtener el tono deseado. Entonces Adams, et al 1976 sugirió una fermentación, ya que el 80% de los sólidos del betabel consisten en carbohidratos fermentables y compuestos nitrogenados, siendo de esta forma razonablemente acompañados disminuyendo los sólidos totales proporcionalmente al incremento de la concentración de betacianina sobre una base sólida. Candida utilis fué escogida como el microorganismo de la fermentación por su utilización enteramente de una gran variedad de sustratos de carbono y nitrógeno, además de que no degrada el colorante, mientras que otros microorganismos, como Hansenula polymorpha, Candida boidini, Neurospora crassa, asimilan tanto sólidos totales como colorante (Villegas, 1979).

Con la fermentación se elimina el sabor característico del betabel, y las células resultantes de ésta pueden ser utilizadas como suplemento en diferentes alimentos principalmente para animales (Adams, et al 1976).

La fermentación (Adams, et al 1976) fue mantenida a 30°C y pH 5 con solución de NaOH y HCl; los carbohidratos y proteínas fermentables fueron asimilados aproximadamente después de 6.5 horas y se determinó como posible factor limitante al fósforo. Después de la fermentación se observó una disminución de aroma del betabel así como mayor solubilidad en agua. De esta forma en concentrado de betacianinas tiene aplicaciones como colorante de alimentos .

En otras investigaciones de Shih y Wiley en 1981 demostraron la existencia de enzimas decolorantes que oxidan las betacianinas, que se encuentran en los tejidos del betabel.



**FIG. NO. II Mecanismo propuesto para la degradación y regeneración de betanina**

El sistema enzimático actúa estrechamente entre los componentes sub-celulares del tejido del betabel a la temperatura de 40°C y un pH de 3.4. La distribución de enzimas decolorantes en betabel fue examinada por Shih y Wiley 1981 usando extractos preparados de enzima para las porciones epidermial y central encontrando que la porción epidermial del betabel contiene más actividad enzimática que la porción central. Esto indica que la localización del sistema de la enzima decolorante de betalaínas es asociado con la acumulación de pigmento en lugares alrededor del área epidermial.

Los efectos sobre los controles de la fermentación: pH, hidrólisis enzimática, ultrafiltración antes y durante la fermentación del betabel condujeron a determinar una gran reducción de sólidos en su jugo con la mínima degradación de betacianina pero Adams; et al 1976, concluyó que un tratamiento con pectinasa antes de la fermentación no reduce los sólidos totales después de ésta.

- ASPECTOS GENERALES SOBRE ESCONTRIA CHIOTILLA .

Clasificación Taxonómica:

Reino	-Vegetal
Sub-Reino	-Embryophyta Siphonogama (fanerógamas)
División	-Angiospermae (Angiospermas)
Clase	-Dicotyledonese (Dicotiledóneas)
Sub-Clase	-Dalipétalas
Orden	-Cactales
Familia	-Cactaceae
Sub- Familia	-Cereoideae
Tribu	-Pachycereae
Sub-Tribu	-Pterocereinae
Género	-Escontria
Especie	-chiotilla

Las cactaceas son nativas del continente americano, en el que actualmente se encuentran distribuidas desde Canadá, a una latitud de 56°N, hasta el estrecho de Magallanes en América del Sur. Escontria chiotilla es originaria y exclusiva de México (Britton, 1963).

Los frutos de Escontria chiotilla se conocen vulgarmente como quiotilla o "jiotilla", esta es una cactacea arborescente de 3 a 4 metros de altura; presenta tronco grueso y corto (de aproximadamente 40 cm de diámetro), ramas muy numerosas y rígidas de color verde oscuro. Posee espinas radiales rectas, dirigidas a veces hacia abajo con una longitud de 1 cm y también espinas centrales, rectas ligeramente aplanadas, de color grisáceo, con la punta más oscura. (Bravo-Hollis, 1978) .

Las flores se encuentran en la terminación de las ramas, las cuales miden 3 cm de longitud con pigmentos interiores amarillos y sus estambres del mismo color. Sus frutos son globosos, escamosos, color café rojizo, de aproximadamente 3.5 cm de diámetro, con pulpa purpurina, dulce comestible; las semillas son negras de 1.5 mm de anchura. Su crecimiento es lento por lo que su rendimiento no es apreciable a menos que se promueva su cultivo. (Britton, 1963).

Escontria chiotilla se encuentra distribuida en Puebla, Oaxaca, Guerrero y Michoacán. Ha sido colectada en Tehuacan, Calipan y Acatlán, Puebla; en Cuicatlán, Sierra Mixteca y en Totolapan, Oaxaca; en el cañón del Zopilote, Guerrero y en la zona de la presa del Infiernillo Michoacán. Los ejemplares de la región de la presa Infiernillo poseen ramas más robustas y espinas centrales más cortas. Las asociaciones que forman se llaman "quiotillales".

Este producto natural beneficia a los habitantes de dichas regiones, y se vende durante los meses de junio y julio en los mercados regionales; son muy agradables y con ellos pueden prepararse mermeladas, conservas, aguas frescas, etc. (Bravo-Hollis, 1978).

### 3.- MATERIALES Y METODOS

#### -OBTENCION Y TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Se utilizaron frutos de E. chiotilla recolectados en julio y agosto de 1983 pertenecientes a la región de Izúcar de Matamoros. Se almacenaron manteniéndose a una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ , descongelándose a temperatura ambiente en el momento de efectuar las pruebas. También se trabajó con betabeles de variedad no clasificada comercial obtenidas en mercados urbanos.

#### -FERMENTACION

La cepa de Candida utilis fué donada por el Instituto de Investigaciones Biomédicas (Laboratorio de Biotecnología). Sembrándose en un medio sólido descrito por Adams y Von Elbe (1977) a pH 5.4 (Apendice No. 1) se incubó por 24 horas a  $30^{\circ}\text{C}$  para ser transferido a un medio líquido estéril por 18 horas a la misma temperatura obteniéndose el inóculo deseado. Asimismo las resiembras del microorganismo Candida utilis para las subsecuentes fermentaciones fueron realizadas de forma semejante.

Para obtener el extracto diluido se agregó 2.5 lt de agua destilada a un kilogramo de jiotilla; se molió en una licuadora (Mabe) por espacio de tres minutos. El extracto obtenido por dilución se centrifugó a 10,000 rpm durante 30 min, en un aparato modelo IECHT Centrifuge Damon /IEC Division Equipar S.A. Separadamente se prensó un kilogramo de jiotilla obteniéndose 580 ml de extracto.

Se procedió a realizar por duplicado la fermentación del extracto diluido y prensado agregando 10 ml de inóculo por 100 ml de extracto, para obtener un volumen total de 250 ml en cada matraz.

Durante la fermentación se hicieron cuatro variaciones de sales de la forma siguiente:

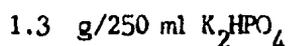
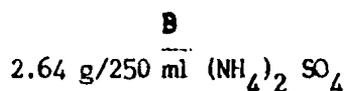
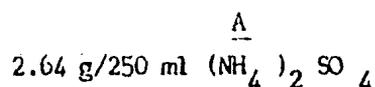
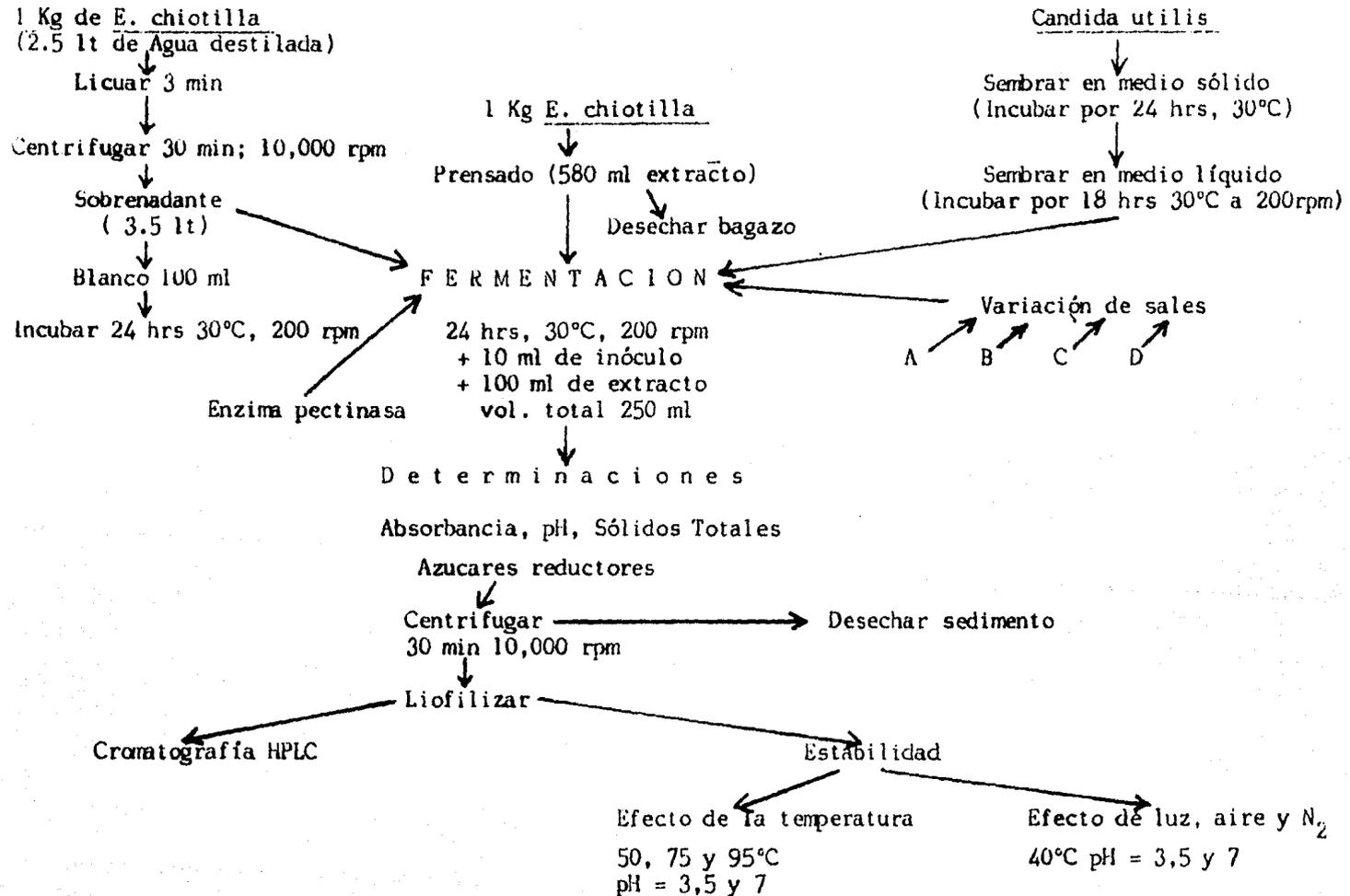


Fig.No.12 DIAGRAMA DE ANALISIS DE LA FERMENTACION Y ESTABILIDAD DE LOS PIGMENTOS DE ESCONTRIA CHIOTILLA



C2.64 g/250 ml  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.3 g/250 ml  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0.22 g/250 ml  $\text{CaCl}_2$ D2.64 g/250 ml  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.3 g/250 ml  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0.22 g/250 ml  $\text{CaCl}_2$ 0.09 g/250 ml  $\text{MgSO}_4$ 0.16 g/250 ml  $\text{FeSO}_4$ 

En otra variación , se utilizó enzima pectinasa al 1% al inicio de la fermentación. (Pectic Enzyme, Food Industry Department Ciba Geygy Corporation Greensboro , N.C. 274709) Finalmente se consideró un blanco ausente de inóculo, sales y de enzima.

Durante las fermentaciones se mantuvo la temperatura a 30°C y agitación mecánica (200 rpm) constantes, en un incubador New Brunswick Scientific, N.J., U.S.A., Modelo G-27.

Durante las primeras ocho horas de fermentación se tomaron muestras de 15 ml cada 2 horas. A cada una de las muestras se les midió: pH, absorbancia, sólidos totales, azúcares reductores.

Al final las muestras fueron liofilizadas en un aparato: UNI/TRAP, Modelo 10-100 The Virtis Company Gardiner N.Y. 12525. (Fig.No. 12)

#### -DISEÑO DE LA COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

En un intento para enriquecer el medio de cultivo de la Escontria chiotilla (extracto diluido y prensado) y obtener el mayor rendimiento de betacianina, esto se realizó adicionando las siguientes sales:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  ,  $\text{CaCl}_2$  ,  $\text{FeSO}_4$  ,  $\text{MgSO}_4$  , según los cálculos siguientes:

74 g/l de azúcar en Escontria chiotilla ----- 37 g/l Biomasa

Fuente de Carbono es = 0.5 g Biomasa /g Carbohidrato

Fuente de Nitrógeno = 3.5 g Biomasa /g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

$\frac{37 \text{ g/l Biomasa}}{3.5 \text{ g Biomasa /g } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4}$  = 10.57 g/l  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

3.5 g Biomasa /g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Fuente de fósforo = 7.1  $\frac{37}{7.1} = 5.2$  g/l de  $K_2HPO_4$

Fuente de magnesio = 100  $\frac{37}{100} = 0.37$  g/l de  $MgSO_4$

Fuente de calcio = 54.4  $\frac{37}{54.4} = 0.680$  g/l de  $CaCl_2$

Fuente de fierro = 100.5  $\frac{37.6}{100.5} = 0.365$  g/l  $FeSO_4$

#### -CUANTIFICACION ESPECTROFOTOMETRICA

Se tomaron 8 ml de los extractos fermentados de las muestras procediéndose a centrifugar por 30 min a 10,000 rpm; después se tomó un ml del sobrenadante y se aforó a 25 ml con agua destilada. La medición de la concentración del colorante se obtuvo empleando el método espectrofotométrico desarrollado por Nilsson en 1970 en el cual la betanina presenta una absorción máxima entre las  $\lambda$  535 y 540 y un coeficiente ideal de extinción ( $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ ) = 1120 (Piattelli; et al, 1964 y Piattelli e Imperato, 1969). Se utilizó un espectrofotómetro Perkin Elmer, Modelo Hitachi 200.

#### -MEDICION DE LA ABSORBANCIA DE LA SUSPENSION CON MICROORGANISMOS

Se tomó un ml de cada uno de los caldos fermentados se aforaron a 10 ml con agua destilada y se realizaron las lecturas de absorbancia en espectrofotómetro a 540 nm. El crecimiento del microorganismo Candida utilis se determinó con una curva estandar de peso seco vs. absorbancia. Como precaución se utilizó la fase logarítmica de crecimiento.

En esta fase se tomaron alícuotas de 1ml de caldo de cultivo para determinar posteriormente el peso. Separadamente se pesaron las membranas Millipore tipo HA, 0.45  $\mu\text{m}$  de orificio, y 4.6 cm de diámetro, previamente secadas en estufa hasta peso constante (80°C por 24 hrs).

Conocido el peso de las membranas se filtraron las alícuotas del cultivo. Después, las membranas con biomasa se secaron a 80°C en estufa hasta peso constante (24 hrs, aproximadamente). Finalmente, el peso de biomasa seca de Candida utilis se obtuvo por diferencia (Apéndice No. 2)

#### - MEDICION DE pH

Se llevó a cabo en un potenciómetro Sargent-Welch Scientific Company U.S.A., Modelo LSX.

#### -DETERMINACION DE SOLIDOS TOTALES

Se determinó por el Método de Sólidos Totales para frutas. (A.O.A.C. pág 362, 1980).

#### -DETERMINACION DE AZUCARES REDUCTORES TOTALES

Se realizaron por el Método volumétrico de Lane-Eynon (A.O.A.C., 1980). Se reportaron como azúcar invertido.

#### -HIDROLISIS ENZIMATICA

A un extracto, preparado en forma semejante que el destinado a la fermentación y sustituyendo el agua destilada por una solución buffer de fosfatos a pH 5, se le adicionó enzima pectinasa (Pectic Enzyme, Food Industry Department Ciba Geygy Corporation Greensboro, N.C. 274709) al 1%, incubando por espacio de dos horas a una temperatura de 40°C. Se midió la absorbancia a  $\lambda$  máxima = 538 nm, para conocer la cantidad de betaninas por el Método de Nilsson, 1970, las determinaciones se realizaron cada 10 min.

#### -EXTRACCION ACUOSA DE BETACIANINAS

Se pesaron 65 g de jiotilla agregando en cada extracción 300 ml de agua destilada, esto se molió en una licuadora (Mabe) y se centrifugó a 10,000 rpm por espacio de 3 min; se tomó un ml de este sobrenadante y se aforó a 25 ml con agua destilada para después leer la absorbancia correspondiente a la concentración de betacianinas en el espectrofotómetro a  $\lambda = 538$  nm (Nilsson, 1970), el residuo del centrifugado se volvió a moler con el mismo volumen de agua y se repiten de esta forma los pasos hasta que la muestra no de lectura. Para Escontria chiotilla se hicieron 5 extracciones en el caso del betabel se pesaron 325 g de muestra y se adicionaron 500 ml de agua en cada extracción; se realizaron 6 extracciones.

## -CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRESION (HPLC)

Las muestras obtenidas después de la fermentación (jiotilla y betabel) y antes de ella fueron inyectadas en un aparato HPLC marca Waters, con bomba A-600, inyector UFK, módulo RCM 100 y con un detector U.V.-visible; utilizando la técnica de Schwartz y Von Elbe 1980. La muestra no se cuantificó pues esa determinación se realizó específicamente para conocer y comparar cualitativamente los pigmentos de ambas muestras antes y después de la fermentación y así poder concluir si se trata de pigmentos semejantes.

## -COMPARACION DE LA ESTABILIDAD ENTRE LOS PIGMENTOS DE JIOTILLA Y LOS DE BETABEL

Efecto de la temperatura.

Se emplearon extractos fermentados de jiotilla y betabel (446 mg/100 ml H<sub>2</sub>O y 420.6 mg/100 ml H<sub>2</sub>O, respectivamente). Se utilizaron soluciones amortiguadoras a pH 3,5 y 7, tomando alícuotas de un ml de extracto aforándose a 100 ml con la solución amortiguadora de fosfatos respectiva (MacIlvane, 1921) se hicieron duplicados. Los tubos se colocan en baños de agua a temperaturas controladas de 50,75 y 95°C.

Las absorbancias se registraron a 538 nm, a intervalos de tiempo particulares para cada pH de los extractos, se realizó un mínimo de 5 determinaciones en cada curva de calentamiento. Se evaluo por duplicado.

La degradación de los pigmentos rojos se estudió determinando el decremento en absorbancia a una longitud de onda de 538 nm y posteriormente calculando el % relativo de absorbancia (%RA) de la manera siguiente :

$$\%RA = \frac{\text{Absorbancia al tiempo } X (\lambda 538 \text{ nm})}{\text{Absorbancia al tiempo } 0 (\lambda 538 \text{ nm})} \times 100 \text{ ----- ( 1 )}$$

Los valores de %RA, a cada temperatura de tratamiento (50, 75 y 95°C), se graficaron en papel semilogarítmico contra tiempo de calentamiento. La relación lineal obtenida indica que la degradación de los pigmentos rojos sigue una cinética de primer orden.

Se calculó la ecuación de regresión, obteniendo los valores de ordenada al origen, pendiente (tiempo de vida media) y coeficiente de correlación ( $r^2$ ) en cada caso, de las rectas obtenidas al graficar %RA contra el tiempo, de

acuerdo al modelo lineal del tipo :

$$\text{Log. (\%RA)} = \text{Log } A - mt \quad \text{-----} ( 2 )$$

A = ordenada al origen

m = pendiente

t = tiempo de calentamiento

El valor de la constante de velocidad k se obtuvo multiplicando el valor de la pendiente m por  $-2.303$  (Von Elbe, et al 1974) .

El conocimiento del orden de reacción permitió expresar la velocidad de degradación en términos de tiempos de vida media ( $t^{\frac{1}{2}}$ ), los cuales se calcularon a partir de la ecuación de regresión, dispuesta para una cinética de reacción de primer orden, en la forma siguiente:

$$t^{\frac{1}{2}} = \frac{\ln}{k} \quad \text{-----} ( 3 )$$

donde:

$t^{\frac{1}{2}}$  = tiempo de vida media

El valor D o tiempo de reducción decimal se define como el tiempo en minutos a una temperatura constante, necesario para destruir 90% de la concentración original; en este caso particular, los pigmentos rojos. En otras palabras, el valor D representa el tiempo en minutos, a una temperatura constante, necesario para cubrir un ciclo logarítmico en una gráfica de degradación térmica. Los valores D en cada caso particular se calcularon de la manera siguiente, utilizando los valores de la recta ajustada en donde:

$$\text{Pendiente} = -\frac{1}{D}; \quad D = -\frac{1}{\text{Pendiente}} \quad \text{-----} ( 4 )$$

El valor Z representa la temperatura requerida (en °F) para producir una disminución decimal en D. Los valores Z de cada caso se obtuvieron de las pendientes de las rectas trazadas al graficar el logaritmo decimal de los valores D, contra las temperaturas.

$$\text{Pendiente} = -\frac{1}{Z}; \quad Z = -\frac{1}{\text{Pendiente}} \quad \text{-----} ( 5 )$$

Evidentemente a mayor resistencia térmica de los pigmentos, se obtuvo un mayor valor D, ya que tomará más tiempo llevar a cabo la reducción del 90% de la concentración.

De la misma manera se puede decir que a valores altos de Z se obtuvo una mayor estabilidad térmica de los pigmentos en cuestión.

Efectos de luz, el aire y  $N_2$ .

Se prepararon muestras de la misma forma descrita en el subcapítulo relativo al efecto de la temperatura (Pág. 24), cubriéndose los tubos con papel de aluminio para la prueba de obscuridad, cuando se requirió  $N_2$ , éste se burbujeo durante un intervalo de 5 seg. La luz utilizada fué proporcionada por una lámpara de 75 watts, la cual mantenía una temperatura constante de  $40 \pm 2^\circ C$  en el interior de una caja de cartón de 40 cm de largo, por 30 cm de ancho y 39 cm de altura. La distancia entre las muestras y la lámpara era de 35 cm, se registraron las absorbancias a 538 nm de cada muestra a diferentes intervalos de tiempo en un espectrofotómetro; las exposiciones a la luz fueron en presencia de  $O_2$  y de  $N_2$ .

Las muestras se expusieron a cada uno de los siguientes tratamientos por duplicado:

- a) Luz y aire
- b) Luz y nitrógeno
- c) Obscuridad y nitrógeno

#### 4.- RESULTADOS Y DISCUSION

##### -FERMENTACION

De las fermentaciones obtenidas por extracción-dilución y por prensado de jiotilla, la que mejores resultados presentó fue la experiencia con extracto prensado, en la presencia de la variación D de sales; ya que obtuvo un peso seco de biomasa de 0.0372 g y un contenido de betacianinas en los sólidos totales de 3.0708% (Fig.No. 13); mientras que para el extracto diluido en las mismas condiciones de fermentación solo se obtuvo el 0.15% de betacianinas y un peso seco de 0.0231 g (Apéndice No. 6). Pero aún con estos resultados se consideró que la fermentación no fue buena por el escaso crecimiento de Candida utilis y la escasa concentración de betacianinas.

Probablemente se debió al contenido de mucílago de la jiotilla que pudo interferir en la fermentación. (Bravo-Hollis, 1978; Adams, et al 1976).

##### -CUANTIFICACION ESPECTROFOTOMETRICA

El espectro de absorbancia obtenido (Fig.No. 14) es semejante al encontrado en la literatura para betacianinas (pigmentos rojos), donde el máximo se alcanzó alrededor de 538 nm, absorbancia característica de betaninas y filocactina, que son las betacianinas particularmente asociadas a cactaceas (Piattelli, 1964) y debido a que en este trabajo no se determinó exactamente el tipo de betacianinas; se asume el valor de  $E \frac{1\%}{1\text{cm}} = 1120$  como valor de referencia para evaluar la cinética de degradación de estos pigmentos.

Es posible que sea otro valor de coeficiente de extinción (E) sin embargo, el comportamiento de este valor de referencia fué ordenado y lógico; además los valores de E difieren poco para betacianinas (Cuadro No. 1) (Piattelli y Minale, 1964). El otro máximo de absorbancia observado alrededor de 485 nm, corresponde a los pigmentos amarillos, como la indicaxantina. (Piattelli, et al 1964).

##### -CRECIMIENTO DE CANDIDA UTILIS

Por medio de la absorbancia a  $\lambda$  540 nm se cuantificó el aumento del creci-

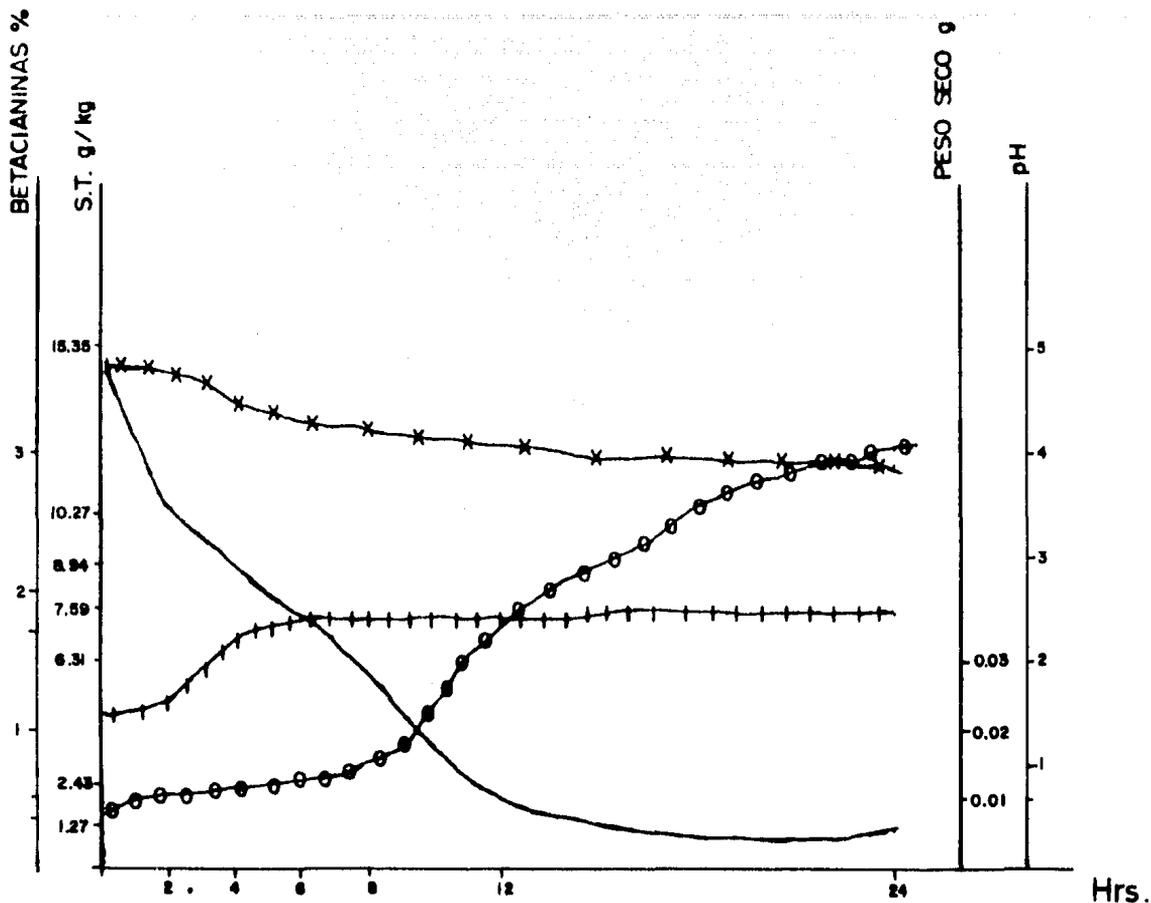


FIG.13 CURSO DE LA FERMENTACION DEL EXTRACTO DE E. CHIOTILLA CON CANDIDA UTILIS.

SOLIDOS TOTALES	g/kg	—————
BETACIANINAS	%	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
PESO SECO	g	
pH		X X X X X X X X X

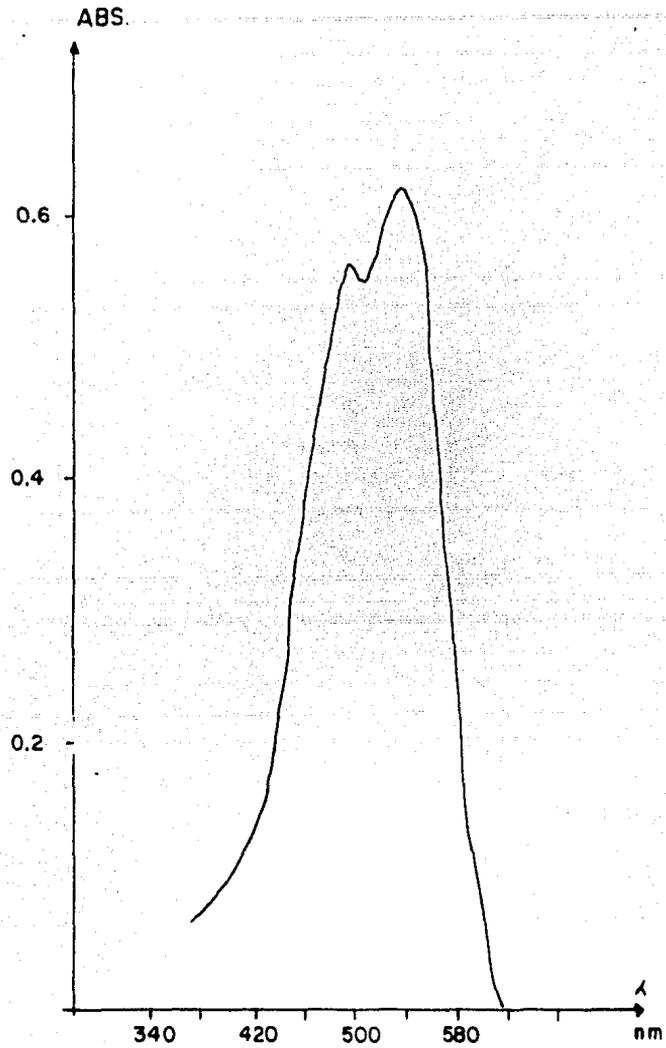


FIG 14 EXPECTRO DE ABSORCION DE LOS PIGMENTOS DE E.CHIOTILLA DURANTE LA FERMENTACION

miento de Candida utilis, reportándose en peso seco. (Apéndice No. 2). En la Fig. No. 13 se observa el máximo crecimiento que ocurre en el intervalo de 2-4 hrs de fermentación, siendo bajo las mejores condiciones en un extracto prensado de Escontria chiotilla enriquecido, observándose una ligera disminución de pH: 4.8-4.5.

#### -AZUCARES REDUCTORES

Se obtuvieron 7.36 g /100 g de azúcares reductores totales en Escontria chiotilla disponibles para su consumo por Candida utilis durante la fermentación. Conociendo este dato se procedió a hacer un enriquecimiento del medio con sales para obtener un mejor crecimiento de la levadura. No obteniendo buenos resultados. El contenido de azúcares reductores varía con el grado de madurez de Escontria chiotilla. La disminución de éstos a través de la fermentación, nos sirve como un parámetro de la misma (Fig.No. 15).

#### -PECTINASA

Se observó un ligero aumento en la concentración de betacianinas después de 50 min de incubación. En los siguientes 50 min se presentó una disminución paulatina, ocasionada por la temperatura de 40°C, a pesar de que se cuidó el pH de 5, que es óptimo tanto para la actividad de la enzima, como para la estabilidad de los pigmentos. Comparando valores de actividad enzimática con un blanco, se observa un incremento de 3.7% en la concentración de betacianinas; valor que no puede ser considerado como significativo (Fig.No. 16).

#### -EXTRACCION ACUOSA

La extracción acuosa en Escontria chiotilla fué de 298 mg de betacianinas /Kg de jiotilla y para Beta vulgaris de 1131 mg de betacianinas /Kg de betabel; lo que implica que solamente se obtuvo un 25% de rendimiento de la jiotilla con respecto del betabel, siendo tal vez este factor el más crítico para su eventual explotación. En la Fig.No. 17 se observa el número de extracciones acuosas realizadas, indicando la cantidad en mg de cada caso.

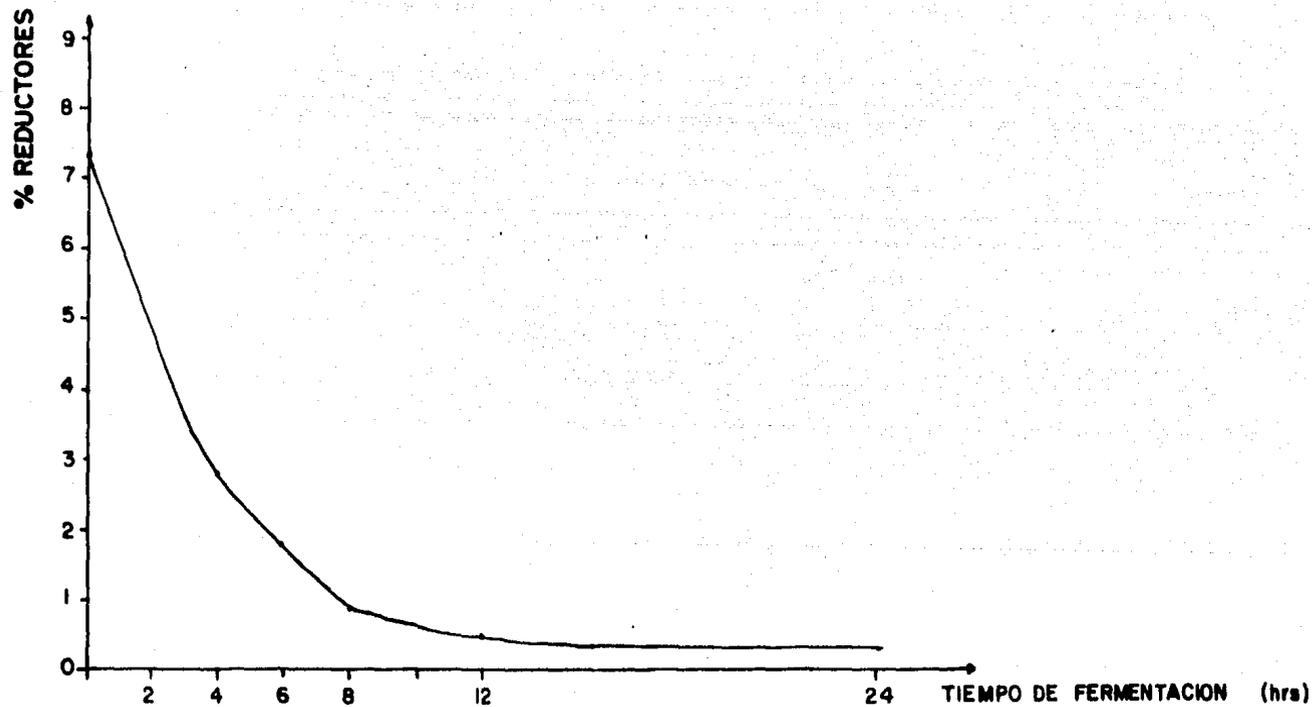


FIG. 15 REDUCCION DE LOS REDUCTORES TOTALES DURANTE LA FERMENTACION DE  
E. CHIOTILLA

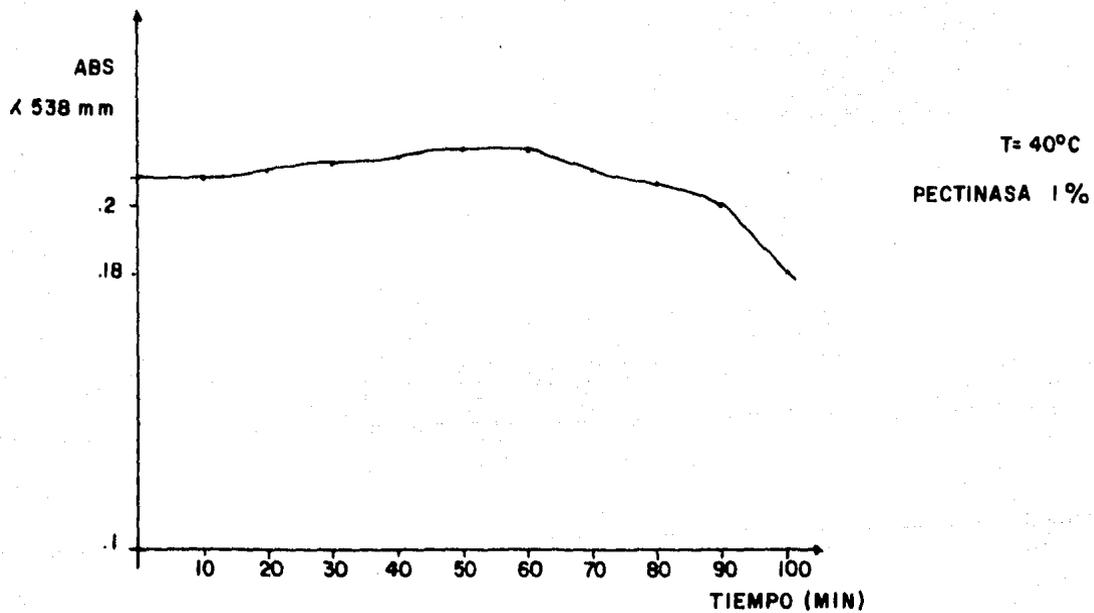


FIG.16 HIDROLISIS ENZIMATICA DEL EXTRACTO DE E.CHOTILLA  
CON PECTINASA

No. DE EXTRACCION

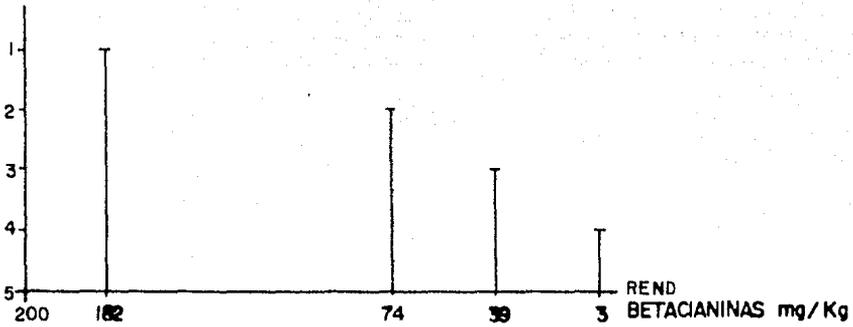


FIG. 17 (a) EXTRACCION ACUOSA E. CHIOTILLA

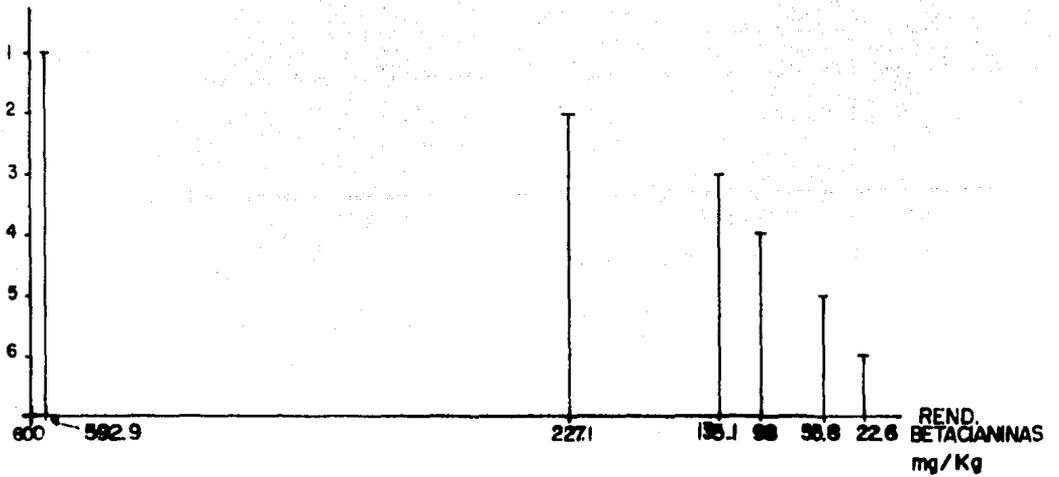


FIG. 17(b) EXTRACCION ACUOSA B. VULGARIS

## -CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRESION (HPLC)

En la Fig.No. 18 se observa que los pigmentos rojos de betabel y jiotilla presentan el mismo tiempo de retención antes de fermentados; el betabel después de fermentado sufrió una hidrólisis. (Vincent, Scholz 1978 y Schwartz. Von Elbe 1980) y la jiotilla sufrió una disminución en los mismos; tal vez la causa de esto sea por pérdidas en su estabilidad y a que pudo haberse transformado al ácido betalámico. (Von Elbe, et al 1981).

## -COMPARACION DE LA ESTABILIDAD ENTRE LOS PIGMENTOS DE JIOTILLA Y BETABEL

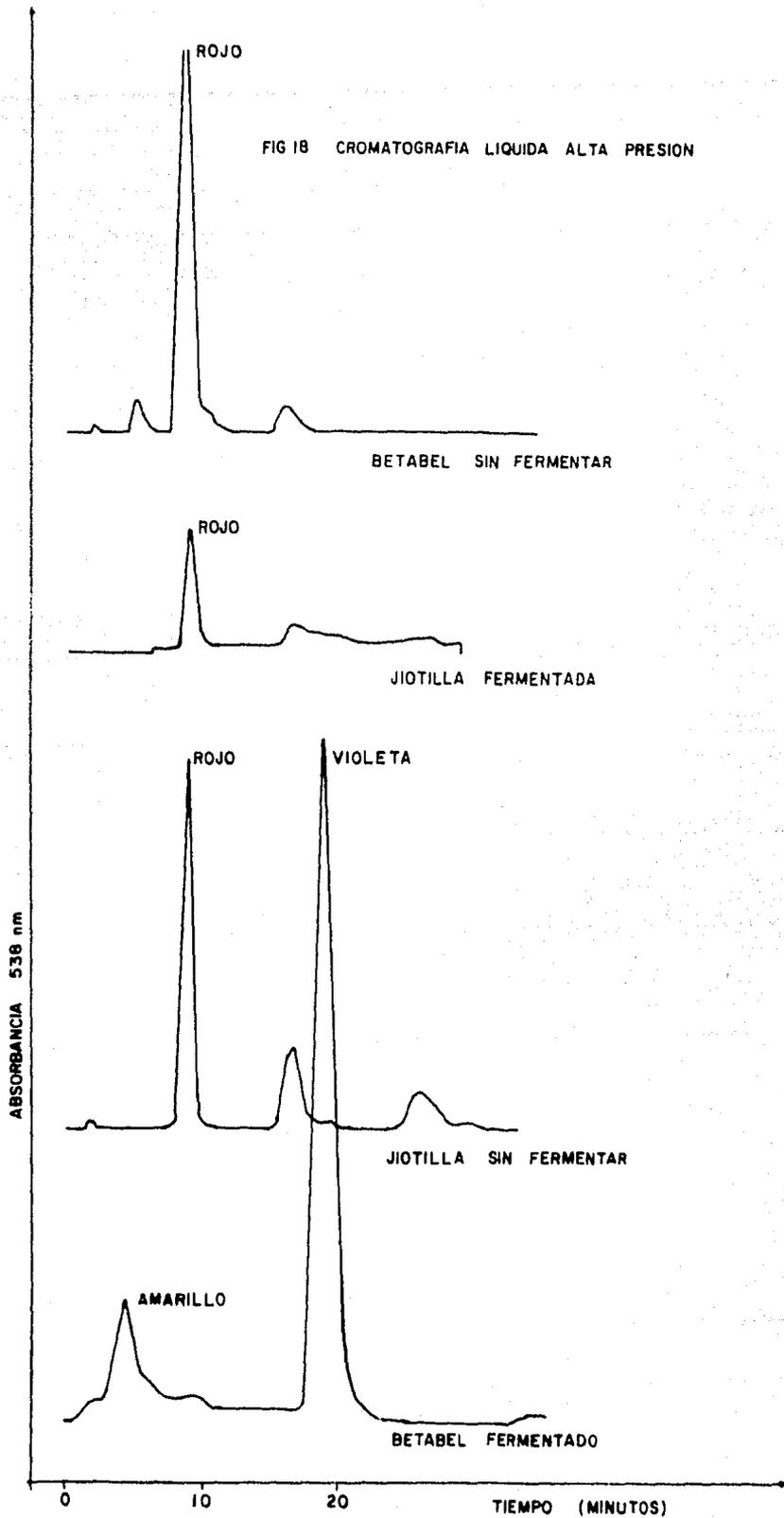
Efecto de la temperatura.

En el Cuadro No. 2 , se observan los valores de degradación química de los pigmentos: velocidad de degradación (k), tiempo de vida media ( $t^{\frac{1}{2}}$ ) , tiempo de reducción decimal (D) etc., y ya que estos son equivalentes se utilizará el tiempo de vida media, como base de comparación entre la estabilidad del pigmento de jiotilla y de betabel.

A través de las pruebas de estabilidad se confirmó el efecto que produjo el pH y la temperatura. La constante de velocidad de degradación (k), se incrementó conforme aumentaba la temperatura de calentamiento y se observó que el tiempo de vida media y el tiempo de reducción decimal disminuyeron conforme se incrementó la temperatura de tratamiento, lo cual indicó que un aumento de temperatura tuvo un efecto negativo en la estabilidad de los pigmentos rojos en estudio (Figs.No. 19 y 20). Estas figuras se trazaron en base a la ecuación de regresión de los puntos experimentales. En el Cuadro No. 2 se observa que para jiotilla, la mejor temperatura de tratamiento fué de 50°C, ya que presentó un tiempo de vida media más alto (a pH 3 es de 242.3 min ). Para el caso del betabel, el tiempo de vida media fue de 262.50 min indicando que no hay una considerable diferencia de estabilidad.

En el Cuadro No. 3, se indica que la mayor estabilidad se obtuvo para jiotilla, considerando el efecto global de la temperatura, a un pH de 7 (Z= 58.05 °F, 14.47 °C).

Del Cuadro No. 3 se aprecia que el intervalo de Z para pigmentos semejantes como el de la jannica (hibiscus sabdariffa), tuna cardona (Opuntia streptacantha), comparando con los valores de betabel y jiotilla es de 39.05 °F -



CUADRO No. 2 EFECTO DE LA TEMPERATURA A DIFERENTES pH \*

E.chiotilla fermentada

T °C	pH	coeficiente de correlación $r^2$	velocidad de degradación termica $k \text{ (min)} \times 10^{-3}$	tiempo de vida media $t^{\frac{1}{2}} \text{ (min)}$	tiempo de reducción decimal D (min)
50 (122°F)	3	0.9068	2.86	242.30	803.41
	5	0.9683	3.73	185.79	616.72
	7	0.9937	4.15	166.98	554.84
75 (167°F)	3	0.9934	48.58	14.26	47.40
	5	0.9743	46.63	14.86	49.36
	7	0.9876	46.87	14.78	49.13
95 (203°F)	3	0.9639	140.21	4.94	16.42
	5	0.9773	94.17	7.35	24.45
	7	0.9479	98.20	7.05	23.45

B. vulgaris fermentado

50	3	0.9863	2.62	262.50	876.86
	5	0.9943	5.18	133.68	444.06
	7	0.9982	4.58	151.31	502.60
75	3	0.9802	80.66	8.59	28.55
	5	0.9921	75.00	9.24	30.70
	7	0.9913	86.66	8.00	26.58
95	3	0.9909	194.51	3.56	11.84
	5	0.9515	132.05	5.24	17.44
	7	0.9915	167.24	4.14	13.77

\* promedio de dos replicas

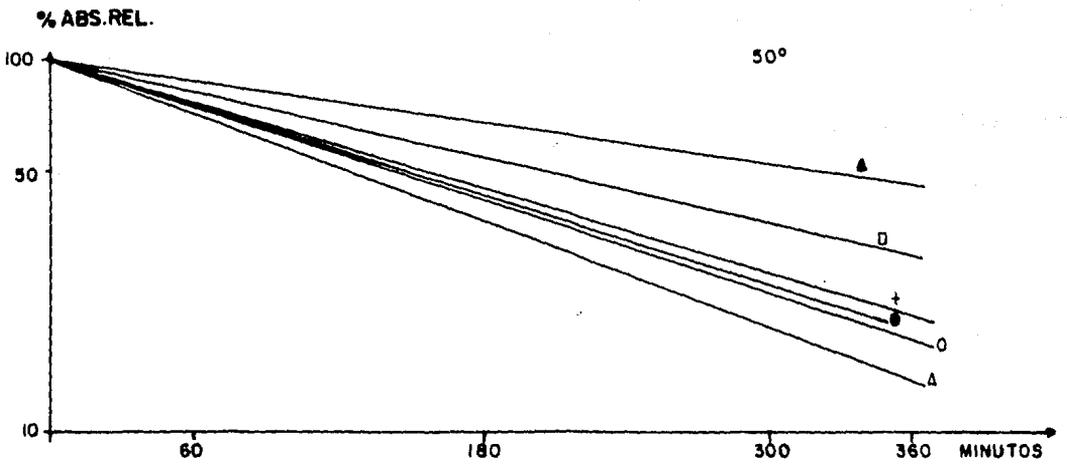
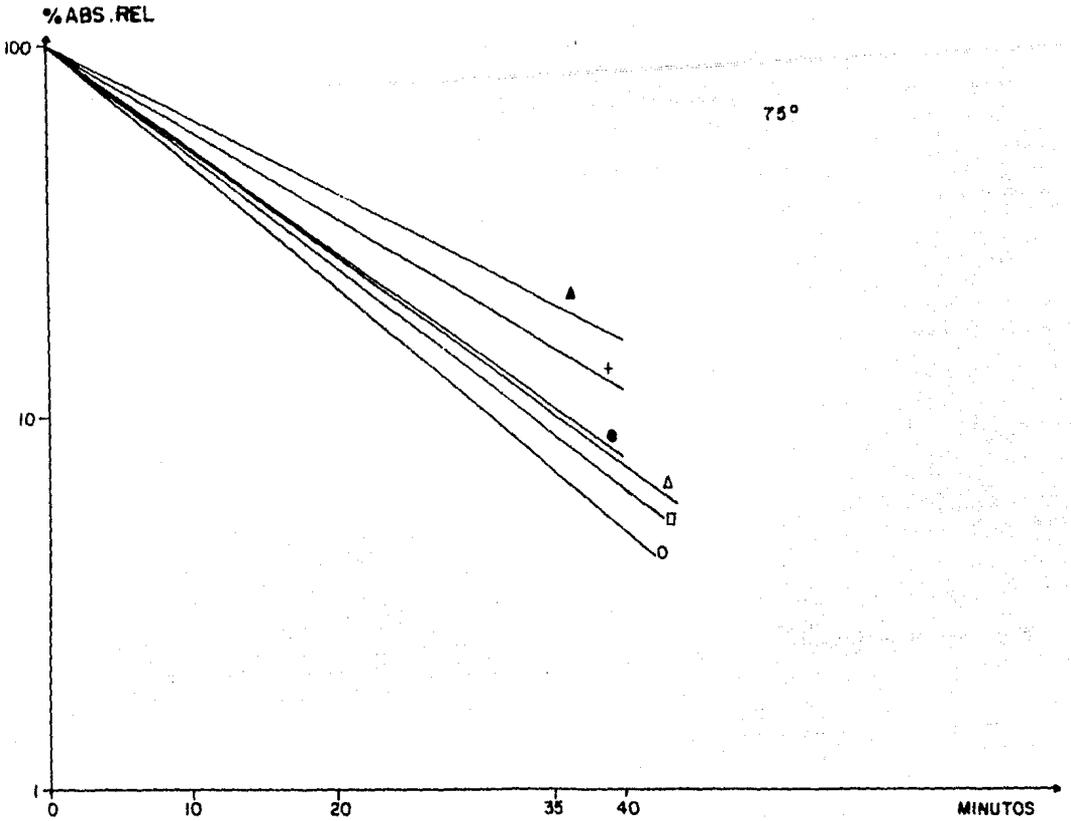


FIG 19 VELOCIDAD DE DEGRADACION PARA BETACIANINAS EN FUNCION DEL CALENTAMIENTO (°C)

EXTRACTO FERMENTADO

E. CHIOTILLA

pH 3 ▲

pH 5 ●

pH 7 +

EXTRACTO FERMENTADO

B. VULGARIS

pH 3 ○

pH 5 ▲

pH 7 ●

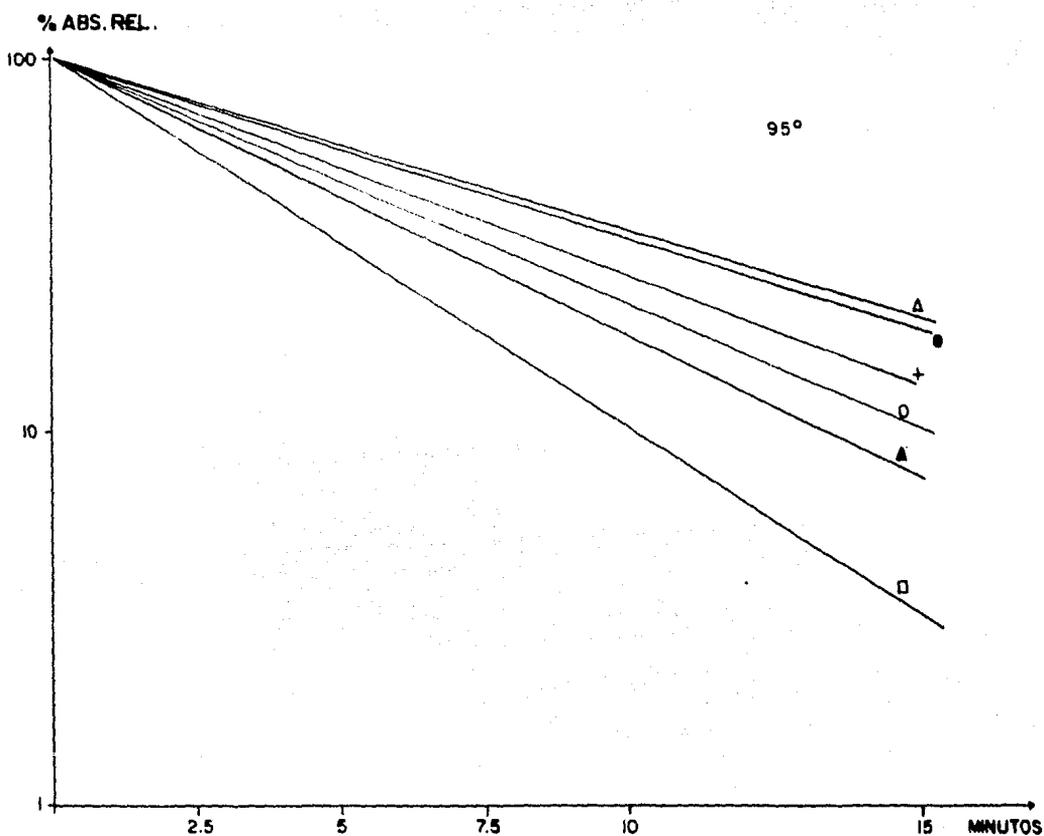


FIG 20 VELOCIDAD DE DEGRADACION PARA BETACIANINAS EN FUNCION DEL CALENTAMIENTO (°C)

EXTRACTO FERMENTADO

E. CHITILLA

pH 3, ▲

pH 5 ●

pH 7 +

EXTRACTO FERMENTADO

B. VULGARIS

pH 3 □

pH 5 Δ

pH 7 ○

73.11°F, estos valores sin interpretación estadística sugieren que la jiotilla presenta una termoestabilidad ligeramente mayor que la jamaica y el betabel. Relacionando el Cuadro No. 4 con los valores de Z, se puede confirmar que el efecto de concentración juega un papel muy importante para la utilización de estos pigmentos; el betabel es el que mayor rendimiento tiene. Es importante considerar que si se tiene una concentración original mayor (a), esta tendrá una concentración final (b) mayor también siguiendo una cinética de primer orden.

Así mismo se observó que los extractos no purificados, purificados, fermentados y no fermentados presentan una Z (temperatura de reducción decimal) muy semejante (Cuadro No. 3), por lo que se determinó que no hay aumento en la estabilidad de los pigmentos después de purificados y fermentados.

Efecto de la luz, aire y  $N_2$ .

En el Cuadro No. 5 se muestran los resultados al determinar la influencia de la luz, el aire y el  $N_2$ , en la estabilidad de los pigmentos rojos de jiotilla y los de betabel. En ambos casos se determinó que la presencia de luz incrementó la velocidad de degradación (en las condiciones particulares de experimentación); así se observó que el mejor tiempo de vida media de la jiotilla fué de 599.38 min, a pH 5 en la obscuridad y en presencia de  $N_2$ .

Para betabel se obtuvo un tiempo de vida media de 2878.33 min (a pH 5, en obscuridad y nitrógeno).

Considerándose que en los dos casos y en los tres tratamientos, el pH óptimo fue de 5, así como también se observó que el betabel mostró una mayor estabilidad con respecto a la jiotilla en los tratamientos mencionados, probablemente por el efecto de la concentración (Fig.No. 22).

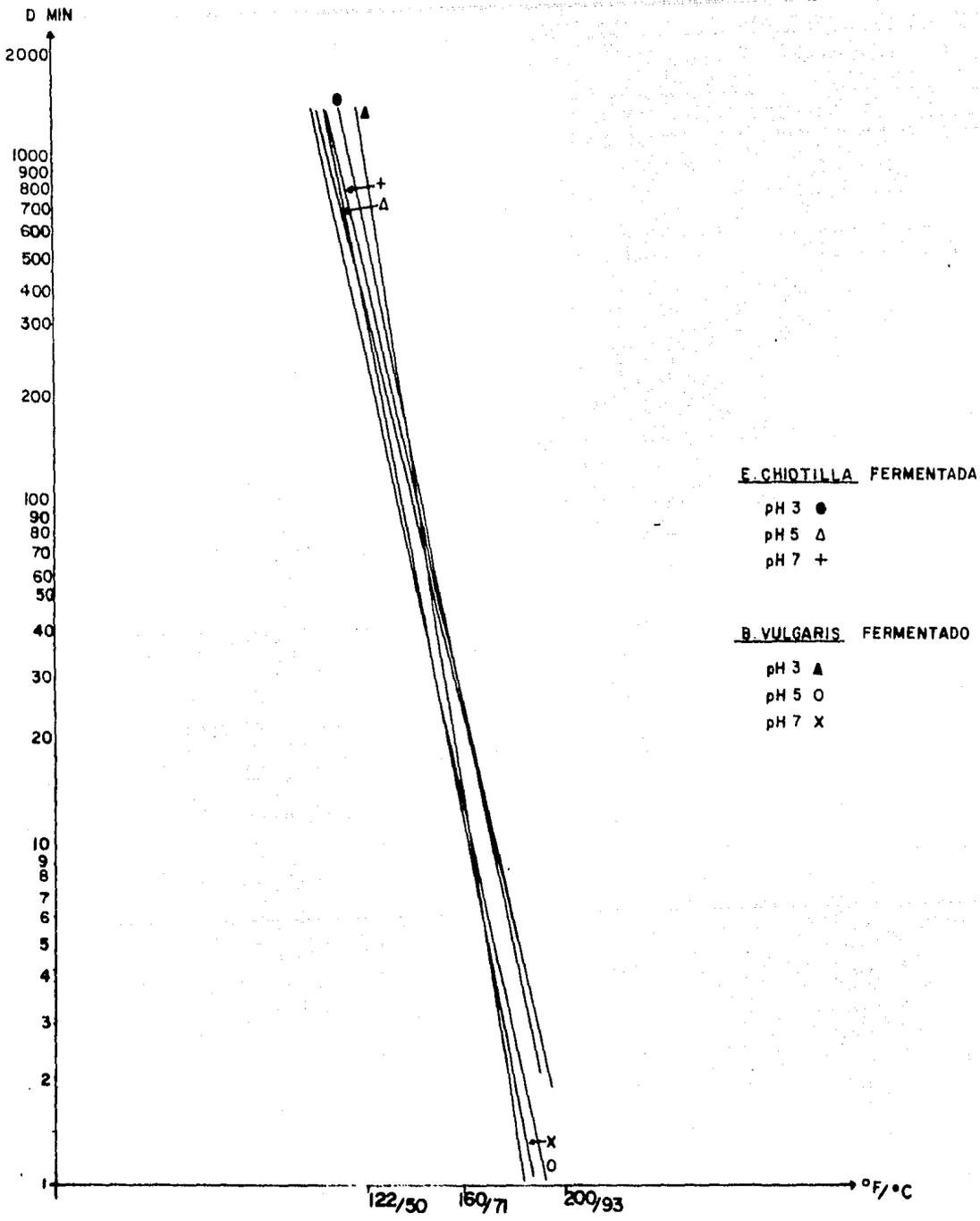


FIG. 21 VALORES DE Z PARA E. CHLOTILLA FERMENTADA Y B. VULGARIS FERMENTADO

CUADRO No.3 COMPARACION DEL VALOR Z (°F)

<u>E. chiotilla</u>	pH	°F	°C	<u>B. vulgaris</u>	pH	°F	°C
a) fermentada	3	47.35	8.52	a) fermentado	3	42.63	5.90
	5	56.83	13.79		5	56.79	13.77
	7	58.05	14.47		7	50.86	10.47
b) no purificada	3	51.69	10.93	c) sin fermentar	4.8	56.26	13.47
	5	58.61	14.78		5.2	55.23	12.90
b) purificada	3	44.40	6.88		5.8	52.22	11.23
	5	53.60	12.00		6.2	51.55	10.86
	7	54.68	12.6				
<u>O. streptacantha</u>				<u>H. sabdariffa</u>			
d) purificada	2	73.11	22.83	e) purificada	2	39.44	4.13
	4	65.78	18.76		3	39.18	3.98
	7	57.27	14.03				
d) no purificada	2	69.97	21.09	e) no purificada	2	39.05	3.91
	4	57.14	13.96		3	44.45	6.91
	7	56.34	13.52				

- 41
- a) esta tesis
  - b) (Ramos, 1982)
  - c) (Saguy, 1979)
  - d) (Valadez, et al 1979)
  - e) (Torres, 1984)

CUADRO No. 4 CONCENTRACION DE PIGMENTOS EN E. CHIOTILLA, B. VULGARIS Y  
H. SABDARIFFA .

	Rendimiento	Humedad
<u>Escontria chiotilla</u>		
Extracción acuosa	0.298 g/kg	80%
<u>Beta vulgaris</u>		
Extracción acuosa	1.103 g/kg	80%
<u>Hibiscus sabdariffa *</u>		
Método de inmersión (pectinasa 1%)	2.04 g/kg	12%

\* (Torres, 1984)

CUADRO No.5 EFECTO DE LUZ, AIRE Y N<sub>2</sub> (40°C) \*

E. chiotilla fermentada

	pH	coeficiente de correlación r <sup>2</sup>	velocidad de degradación térmica k (min) X 10 <sup>-3</sup>	tiempo de vida media t <sup>1/2</sup> (min)	tiempo de reducción decimal D (min)
Luz, Aire	3	0.9808	1.982	349.51	1161.52
Luz, N <sub>2</sub>		0.9776	1.376	503.44	1673.05
Osc, N <sub>2</sub>		0.9552	1.331	520.39	1729.39
Luz, Aire	5	0.9920	1.682	411.77	1360.41
Luz, N <sub>2</sub>		0.9059	1.303	531.80	1767.30
Osc, N <sub>2</sub>		0.9887	1.156	599.38	1981.90
Luz, Aire	7	0.9933	1.790	387.13	1286.53
Luz, N <sub>2</sub>		0.9816	1.395	496.46	1649.86
Osc, N <sub>2</sub>		0.9819	1.635	423.65	1407.91

43

B. vulgaris fermentado

Luz, Aire	3	0.9993	0.9539	726.41	2414.09
Luz, N <sub>2</sub>		0.9886	0.7770	891.45	2962.50
Osc, N <sub>2</sub>		0.9794	0.4690	1477.48	4910.01
Luz, Aire	5	0.9929	0.4126	1679.28	5580.65
Luz, N <sub>2</sub>		0.9886	0.4225	1640.14	5450.57
Osc, N <sub>2</sub>		0.9678	0.2407	2878.33	9564.37
Luz, Aire	7	0.9958	0.7194	973.19	3200.92
Luz, N <sub>2</sub>		0.9992	0.5843	1185.98	3941.30
Osc, N <sub>2</sub>		0.9268	0.4011	1727.50	5740.90

\* promedio de dos replicas

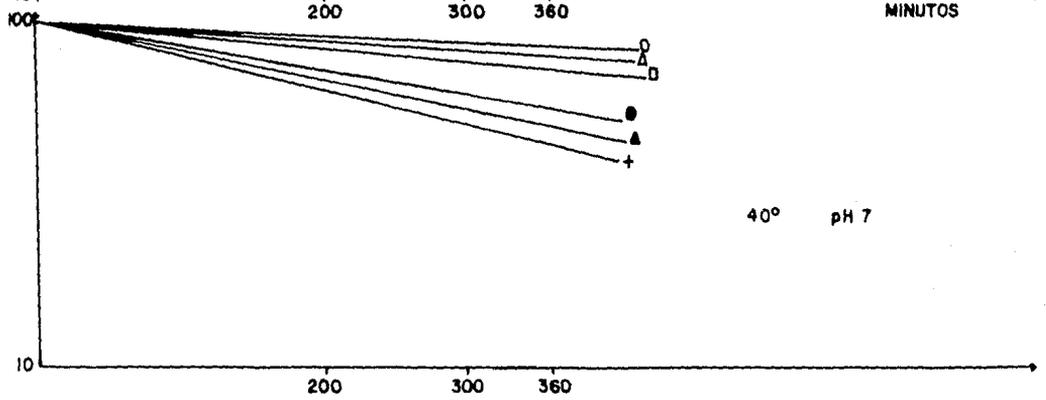
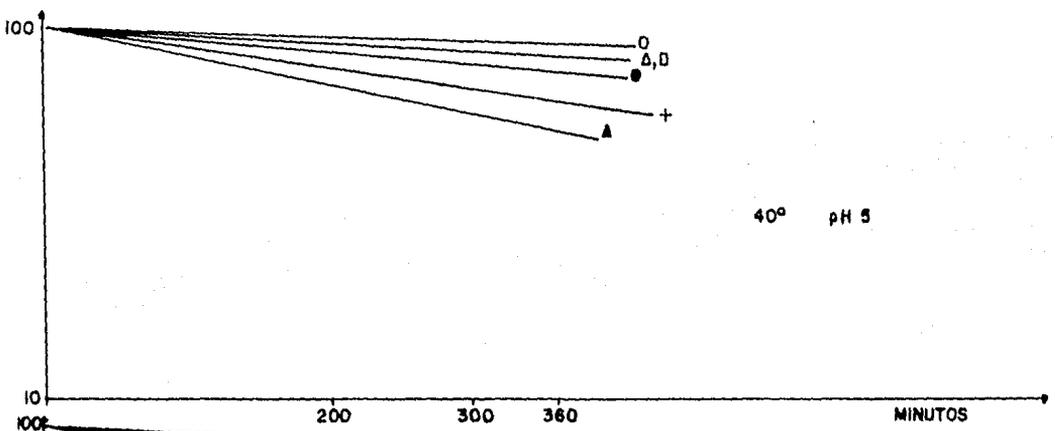
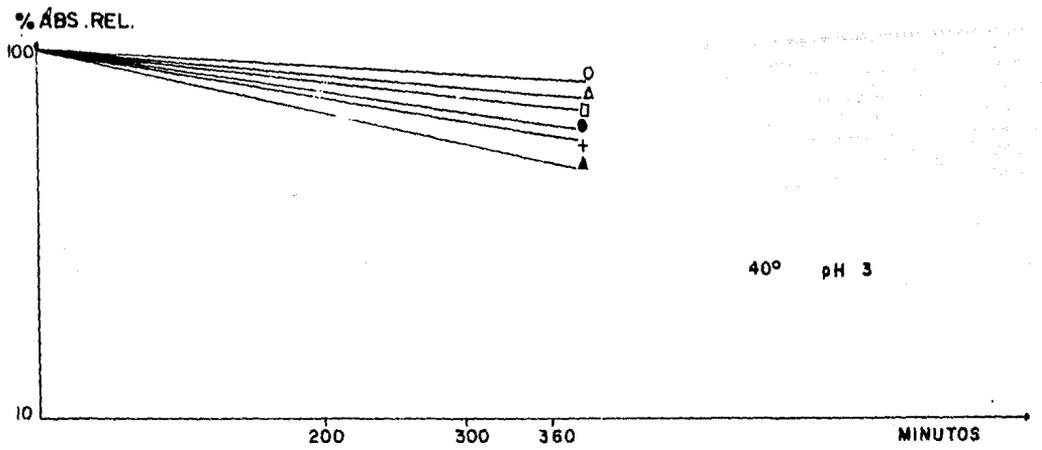


FIG 22 VELOCIDAD DE DEGRADACION PARA BETACIANINAS

<u>E. CHIOTILLA FERMENTADA</u>		<u>B. VULGARIS FERMENTADO</u>	
LUZ, AIRE	▲	LUZ, AIRE	□
LUZ, N <sub>2</sub>	+	LUZ, N <sub>2</sub>	△
OSC, N <sub>2</sub>	●	OSC, N <sub>2</sub>	○

## 5.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- 1.- Debido a que existen aproximadamente 26 betacianinas que se registran cerca de  $\lambda$  538 nm y que para el grupo de cactus están la betanina, isobetanina y filocactina; se recomendaría usar métodos químicos para poder determinar exactamente de que tipo de pigmento se trata en el caso de E. chiotilla .  
Se concluye que el pigmento rojo de jiotilla y betabel puede ser diferente, ya que los resultados de la cromatografía después de haber sido previamente fermentados los extractos demostraron un cambio en la composición del pigmento de betabel, mientras que el pigmento de la jiotilla antes y después de la fermentación no presentó cambios detectables, por cromatografía líquida de alta presión. Sin embargo, la cromatografía descendente indicó que tienen el mismo Rf, por lo que las diferencias deben ser mínimas.
- 2.- Por el escaso crecimiento de Candida utilis y la baja concentración de betacianinas de acuerdo con los resultados de la cromatografía, se concluyó que la fermentación no dió los resultados esperados para la jiotilla.
- 3.- La extracción acuosa mostró una desventaja, y posiblemente la más grande de todas, al comparar el pigmento de la jiotilla con el de betabel, pues la jiotilla mostró un 25% de concentración de betacianinas con respecto al betabel.
- 4.- El efecto de la temperatura para betabel y jiotilla indicó que después de fermentados los extractos, no se observó un aumento en su estabilidad por lo que puede concluirse que la ventaja de la fermentación fué la concentración del pigmento en el caso del betabel, pero no en el de la jiotilla, bajo las condiciones de este trabajo.
- 5.- También se observó que la estabilidad de dichos pigmentos fué mayor en betabel y jiotilla en los tratamientos de obscuridad, nitrógeno y pH 5.
- 6.- Sin embargo, al evaluar la termoestabilidad por su valor Z, el cual incluye la degradación química a diferentes temperaturas; se observaron equivalentes, lo que hace pensar que la concentración inicial del pigmento tuvo una influencia mayor.

- 7.- Con la hidrólisis enzimática se logró un aumento ligero en la concentración del pigmento, sin embargo no se pudo considerar que fuera significativo la liberación del colorante. Para una evaluación final del efecto enzimático, sería necesario evaluar la concentración y actividad de la enzima
- 8.- Se recomienda optimizar la extracción acuosa para extraer en su totalidad el contenido de betacianinas de la jiotilla.

## 6.-BIBLIOGRAFIA

- 1.- Adams, J.P., Von Elbe, J.H. y Anudson, C.H. 1976. Production of betacyanine concentrate by fermentation of red beet juice with Candida utilis. J. Food Sci., 41:78-81.
- 2.- Adams, J.P. y Von Elbe, J.H. 1977. Betanine separation and quantification by cromatography on gels. J. Food Sci., 42 (2): 410-414.
- 3.- Bravo-Hollis, H. 1978. Las cactáceas de México. p 538-539. 2da Edición, UNAM, México.
- 4.- Britton, N.L. 1963. The cactaceae. p 65-67. Dover Publications, New York.
- 5.- Buchi, G., Fliri, H. y Shapiro, R. 1978. Synthesis of betalains. J. Org. Chem. 43 (25): 4765-4769.
- 6.- Fenema, O. 1976. Principles of food science. p 402-416. Food Chem., Marcel Dekker Inc., New York.
- 7.- IFT Expert panel on food safety and nutrition and the comitee on public information. 1980. Food colors. Food Technol., 34 (7) 77.
- 8.- Husche, H. 1981. Legislative aspects of natural colours. Capítulo 8, p 153-161 En Natural colours for food and other uses. (Ed) J.N. Counsell, Applied Sci., LTD.
- 9.- Jeffries, G. 1970. Natural colours. Food processing industry. Nov. 34-35.
- 10.- Mabry, T.J. y Dreiding, A.S. 1968. The betalains. Recent Advances in Phytochem. 145-160.
- 11.- MacIlvane, 1921. Preparation of buffers. J. Biol. Chem. 49,183.
- 12.- Nilsson, T. 1970. Studies into the pigments in beetroot. Lantbrukshogskolans Annaker, 36: 179-219.
- 13.- Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytic Chemists, 1960, XIII Edición; Washington, D.C. USA.
- 14.- Pasch, J.H. y Von Elbe, J.H. 1975. Betanine degradation as influenced by water activity. J. Food Sci., 40: 1145-1146.
- 15.- Pasch, J.H. y Von Elbe, J.H. 1979. Betanine stability in bufferes solutions containing organic acids, metalcations, antioxidants, or seques-trants. J. Food Sci., 44(1): 72-74.
- 16.- Peterson, R.G. y Joslyn, M.A. 1960. The red pigment of the root of the beet (Beta vulgaris) as a pyrrolle compound. Food Res., 25: 429-441.

- 17.- Piattelli, M. e Imperato, F. 1969. Betacyanins of the family cactáceae. *Phytochem.*, 8:1503-1507.
- 18.- Piattelli, M., Minale, L. y Prota, G. 1964. Isolation, structure and absolute configuration of indicaxanthin. *Tetrahedron*, 20: 2325-2329.
- 19.- Piattelli, M. y Minale, L. 1964. Pigments of centrospermae-II distribution of betacyanins. *Phytochem.*, 3:547-557.
- 20.- Piattelli, M., Minale, L. y Prota, G. 1965. Pigments of centrospermae-III betaxanthins from Beta vulgaris. *Phytochem.*, 4:121-125.
- 21.- Ramos, B.V. 1982. Utilización de pigmentos rojos de Escontria chiotilla como colorante el alimentos. Tesis, Facultad de Química, UNAM. México.
- 22.- Saguy, I. 1979. Termostability of red beet pigments (betanine and vulgaxanthin-1); influence pH and temperature. *J. Food Sci.*, 44:1554-1555.
- 23.- Secretaria de Salubridad y Asistencia, reglamento de aditivos para alimentos publicado en el diario oficial del 15 de febrero de 1958, México.
- 24.- Schwartz, S.J. y Von Elbe, J.H. 1980. Quantitative determination of individual betacyanin pigments by high performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 28:540-543.
- 25.- Shih, C.C. y Wiley, R.C. 1981. Betacyanine and betaxanthine decolorizing enzymes in the beet (Beta vulgaris), root. *J. Food Sci.*, 47:164-166.
- 26.- Singer, J.W. y Von Elbe, J.H. 1980. Degradation rates of vulgaxanthine I. *J. Food Sci.*, 43 (3):489-491.
- 27.- Torres, M.A. 1984. Purificación de colorante rojo de la jamaica (Hibiscus sabdariffa), y su aplicación en alimentos. Tesis, Facultad de Química, México.
- 28.- Valadez, S., Valadez, A. y Chatelan, S. 1979. Utilización de los pigmentos de la tuna cardona como posibles colorantes alimentarios. Bol. No. 15/18, Fruticultura Mexicana, México.
- 29.- Viades, J. 1979. Colorantes que se consideran nocivos a la salud humana Tesis, Facultad de Química, México.
- 30.- Vincent, K.R. y Scholz, R.G. 1978. Separation and quantification of red beet betacyanins and betaxanthins by high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 26(4):812-816.
- 31.- Von Elbe, J.H., Maing, I.Y. y Amudson, C.H. 1974. Color stability of betalain. *J. Food Sci.*, 39:334-337.
- 32.- Von Elbe, J.H., Schwartz, S.J. y Hildenbrand, B.E. 1981. Loss and regeneration of betacyanin pigments during processing of beets. *J. Food Sci.* 46
- 33.- Weissler, A. 1975. Utilization of plant pigments. *Food Technol.*, 29(5):38.

APENDICE No. 1

Medio Sólido y Líquido Utilizado para Candida utilis \* pH = 5

g/l

34.5 sacarosa

2.0 extracto de levadura

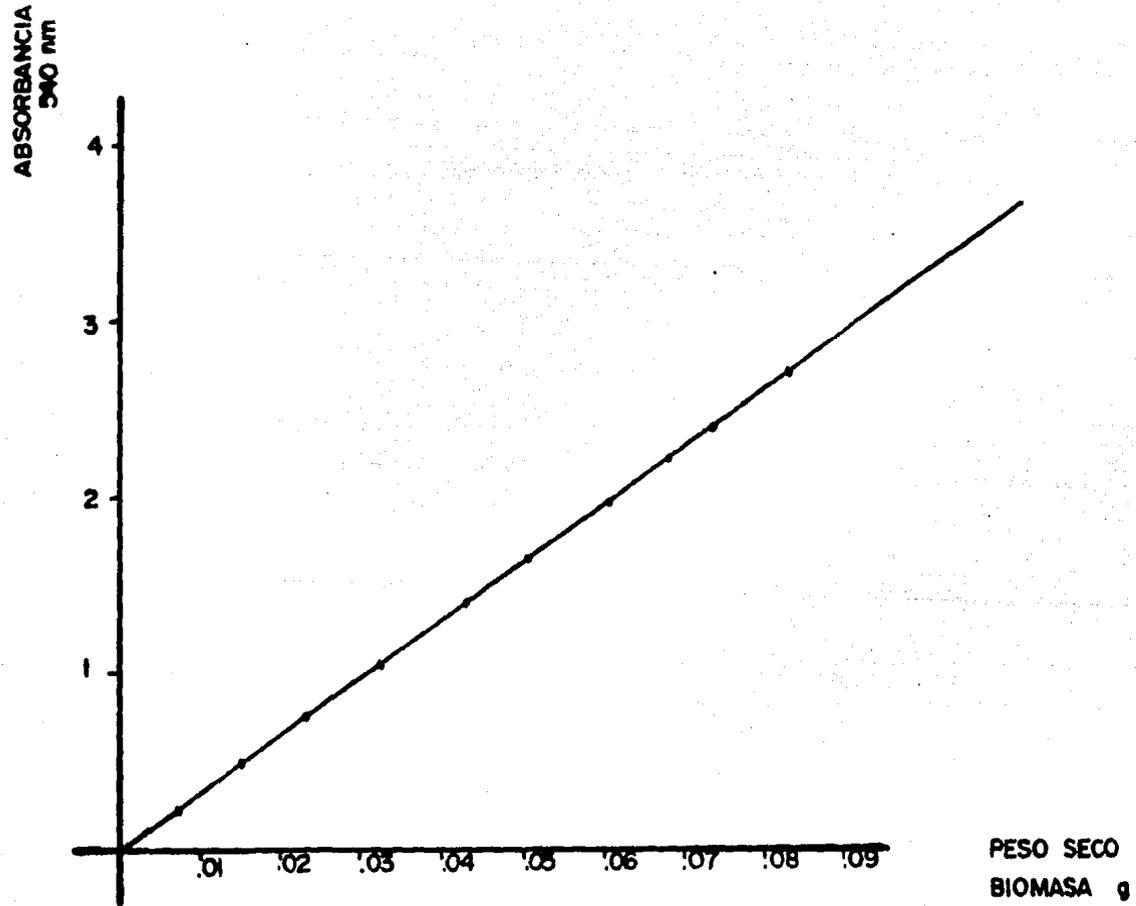
4.1  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

1.2  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$

20.0 agar

Condiciones de Esterilización : 15 pounds, por 15 min

\* (Adams; et al, 1976)



APENDICE 2.- Curva Standard de PESO SECO vs. ABSORBANCIA (Candida utilis)

APENDICE No. 3

FERMENTACION DE UN EXTRACTO PRENSADO DE E. CHIOTILLA CON CANDIDA UTILIS

TIEMPO DE FERMENTACION (hrs)	pH	SOLIDOS TOTALES g/kg	PESO SECO DE BIOMASA g	BETACIANINAS EN SOLIDOS TOTALES (%)
Extracto acuoso original	3.8	15.42		
0	4.8	15.35	0.0218	0.3878
2	4.8	10.27	0.0225	0.5316
4	4.5	8.94	0.0336	0.5672
6	4.3	7.59	0.0342	0.6166
8	4.2	6.31	0.0358	0.7210
12	4.1	2.43	0.0366	1.7654
24	3.9	1.27	0.0372	3.0708

51

FERMENTACION DE UN EXTRACTO DILUIDO DE B. VULGARIS CON CANDIDA UTILIS \*

TIEMPO DE FERMENTACION (hrs)	pH	SOLIDOS TOTALES g/kg	VOL. EMPACADO DE CELULAS (ml)	BETACIANINAS EN SOLIDOS TOTALES (%)
Extracto acuoso original	6.2	92.88		
0	5.2	89.00	0.02	0.34
2	5.1	84.75	0.024	0.88
4	4.9	73.87	0.04	0.40
6	4.5	60.62	0.06	0.53
8	4.0	46.75	0.07	1.01
12	3.8	36.25	0.07	2.5
24	3.6	28.75	0.08	3.8

\* (Villegas, 1979)

APENDICE No. 4

FERMENTACIONES DE EXTRACTOS DILUIDOS DE E. CHIOTILLA CON CANDIDA UTILIS

1) Extracto licuado natural

Tiempo de fermentación (hrs)	pH	SOLIDOS TOTALES g/kg	PESO SECO DE BIONASA g	CONTENIDO DE BETACIANINAS EN LOS SOLIDOS TOTALES (%)
Extracto sin fermentar	3.9	33.99		
0	4.8	33.92	0.0019	0.03585
2	4.8	33.89	0.0023	0.03693
4	4.75	27.85	0.0039	0.04402
6	4.7	24.99	0.0042	0.05623
8	4.6	20.42	0.0050	0.06412
24	4.55	13.02	0.0078	0.10123

2) Fermentación con variación A de sales

Extracto sin fermentar	3.9	33.99		
0	4.8	33.80	0.0020	0.03601
2	4.65	33.69	0.0022	0.0372
4	4.65	26.41	0.0028	0.0404
6	4.60	23.04	0.0030	0.04213
8	4.55	19.24	0.0058	0.0632
24	4.5	11.42	0.0132	0.1382

APENDICE No. 5

FERMENTACIONES DE EXTRACTOS DILUIDOS DE E. CHIOTILLA CON CANDIDA UTILIS

3) Fermentación con variación B de sales

Tiempo de fermentación (hrs)	pH	SOLIDOS TOTALES g/kg	PESO SECO DE BIOMASA g	CONTENIDO DE BETACIANINAS EN LOS SOLIDOS TOTALES (%)
Extracto sin fermentar	3.9	32.33		
0	4.9	32.35	0.0026	0.0392
2	4.8	32.41	0.0030	0.0399
4	4.7	30.26	0.0051	0.0432
6	4.7	28.70	0.0062	0.0714
8	4.2	24.18	0.0068	0.1205
24	4.1	15.21	0.0142	0.1321

4) Fermentación con variación C de sales

Extracto sin fermentar	3.9	72.84		
0	4.8	72.84	0.0034	0.0236
2	4.8	64.68	0.0036	0.0245
4	4.8	52.73	0.0050	0.0362
6	4.7	45.36	0.0073	0.0705
8	4.4	20.21	0.0087	0.0762
24	4.2	17.42	0.0172	0.1429

ARENDICE No. 6

FERMENTACIONES DE EXTRACTOS DILUIDOS DE E. CHIOTILLA CON CANDIDA UTILIS

5) Fermentación con variación D de sales

Tiempo de fermentación (hrs)	pH	SOLIDOS TOTALES g/kg	PESO SECO DE BIOMASA g	CONTENIDO DE BETACIANINAS EN LOS SOLIDOS TOTALES (%)
Extracto sin fermentar	3.9	77.68		
0	4.8	77.60	0.0031	0.0163
2	4.8	65.14	0.0034	0.0192
4	4.8	52.26	0.0045	0.0264
6	4.7	41.13	0.0078	0.0363
8	4.4	16.44	0.0108	0.1423
24	4.2	16.21	0.0231	0.1541

6) Fermentación , con enzima pectinasa al 1%

Extracto sin fermentar	3.8	49.35		
0	4.8	49.22	0.0080	0.0897
2	4.8	40.13	0.0096	0.0976
4	4.6	33.31	0.0113	0.1050
6	4.5	25.05	0.0224	0.1117
8	4.4	16.27	0.0238	0.1220
24	4.4	11.18	0.0247	0.1382

APENDICE No. 7

VALORES DE ABSORBANCIA A 538 nm, OBTENIDOS AL DETERMINAR EL EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA ESTABILIDAD DE LOS PIGMENTOS ROJOS DE E. CHIOTILLA Y B. VULGARIS .

1) Temperatura = 50° C

Abs a  $\lambda$  = 538 nm

Extracto fermentado  
E. chiotilla

tiempo = hrs

pH	0	0.5	2.0	4.5	5.5
3	0.13	0.11	0.10	0.08	0.04
5	0.13	0.09	0.07	0.05	0.03
7	0.13	0.105	0.08	0.045	0.03

Extracto fermentado  
B. vulgaris

3	0.43	0.37	0.305	0.225	0.17
5	0.45	0.345	0.195	0.105	0.075
7	0.43	0.375	0.235	0.13	0.095

2) Temperatura = 75° C

Abs a  $\lambda$  = 538 nm

Extracto fermentado  
E. chiotilla

tiempo = min

pH	0	10	15	20	35
3	0.15	0.115	0.08	0.06	0.03
5	0.15	0.08	0.06	0.045	0.03
7	0.155	0.085	0.075	0.05	0.03

Extracto fermentado  
B. vulgaris

3	0.425	0.20	0.175	0.115	0.025
5	0.435	0.19	0.17	0.115	0.03
7	0.43	0.18	0.15	0.10	0.02

APENDICE No. 8

VALORES DE ABSORBANCIA A 538 nm, OBTENIDOS AL DETERMINAR EL EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA ESTABILIDAD DE LOS PIGMENTOS ROJOS DE E. CHIOTILLA Y B. VULGARIS.

3) Temperatura = 95°C

Abs a = 538 nm

Extracto fermentado  
E. chiotilla

tiempo = min

pH	0	2.5	5.0	7.5	10	15
3	0.14	0.06	0.045	0.04	0.025	0.015
5	0.15	0.13	0.08	0.065	0.05	0.04
7	0.15	0.075	0.06	0.05	0.04	0.03

Extracto fermentado  
B. vulgaris

3	0.045	0.20	0.12	0.09	0.06	0.02
5	0.045	0.30	0.25	0.22	0.18	0.05
7	0.45	0.285	0.22	0.165	0.09	0.035

VALORES DE ABSORBANCIA A 538 nm, OBTENIDOS AL DETERMINAR EL EFECTO DE LA LUZ, AIRE Y N<sub>2</sub>, EN LA ESTABILIDAD DE LOS PIGMENTOS ROJOS DE E. CHIOTILLA Y B. VULGARIS.

Extracto fermentado  
E. chiotilla

Abs a = 538 nm  
tiempo = = min

	pH	0	105	195	270	360
Luz, Aire	3	0.15	0.12	0.11	0.095	0.07
Luz, N <sub>2</sub>		0.145	0.135	0.125	0.11	0.09
Osc, N <sub>2</sub>		0.15	0.13	0.13	0.11	0.09
Luz, Aire	5	0.17	0.135	0.12	0.11	0.09
Luz, N <sub>2</sub>		0.17	0.155	0.15	0.14	0.10
Osc, N <sub>2</sub>		0.17	0.15	0.14	0.13	0.11
Luz, Aire	7	0.17	0.15	0.12	0.11	0.09
Luz, N <sub>2</sub>		0.17	0.135	0.12	0.115	0.10
Osc, N <sub>2</sub>		0.17	0.13	0.12	0.11	0.09

Extracto fermentado  
B. vulgaris

Luz, Aire	3	0.425	0.385	0.355	0.33	0.305
Luz, N <sub>2</sub>		0.42	0.40	0.375	0.34	0.33
Osc, N <sub>2</sub>		0.43	0.395	0.39	0.375	0.36
Luz, Aire	5	0.45	0.43	0.41	0.40	0.39
Luz, N <sub>2</sub>		0.45	0.43	0.42	0.41	0.395
Osc, N <sub>2</sub>		0.45	0.43	0.43	0.42	0.41
Luz, Aire	7	0.45	0.42	0.385	0.37	0.35
Luz, N <sub>2</sub>		0.45	0.425	0.405	0.385	0.365
Osc, N <sub>2</sub>		0.45	0.44	0.44	0.41	0.39

APENDICE No. 10

RESULTADOS DE LA HIDROLISIS ENZIMATICA DEL EXTRACTO DE E.CHLOTILLA CON PECTINASA

TIEMPO (min)	ABS = 538 nm
0	0.24
10	0.24
20	0.25
30	0.26
40	0.27
50	0.28
60	0.28
70	0.25
80	0.23
90	0.20
100	0.18

APENDICE No. 11

RESULTADOS DE LA EXTRACCION ACUOSA DE ESCONTRIA CHIOTILLA

No. de extracción	Abs $\lambda$ = 538 nm	Rend. Betacianinas mg/kg
1	0.182	182
2	0.074	74
3	0.039	39
4	0.003	3
5	---	-----
		= 298 mg/kg

RESULTADOS DE LA EXTRACCION ACUOSA DE BETA VULGARIS

1	1.728	592.9
2	0.662	227.1
3	0.244	135.1
4	0.050	98.0
5	0.006	55.8
6	0.002	22.6
		-----
		= 1131.5 mg/kg