

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE INGENIERIA
E.A.P DE AGROINDUSTRIA



**“PRODUCCIÓN DE INULINASA POR FERMENTACIÓN DE
KLUYVEROMYCES MARXIANUS EN CONDICIONES
ÓPTIMAS DE AIREACIÓN Y CONCENTRACIÓN DE
EXTRACTO DE ALCACHOFA (*Cynara Scolymus*).”**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO AGROINDUSTRIAL**

TESISTAS:

**HUARAZ ZAVALITA RAQUEL MELINA
REYES CASTRO JEAN CARLOS**

ASESOR:

Dr. AUGUSTO CASTILLO CALDERON

NUEVO CHIMBOTE - 2014

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

FACULTAD DE INGENIERÍA

E.A.P. DE AGROINDUSTRIA



**“PRODUCCIÓN DE INULINASA POR FERMENTACIÓN DE
KLUYVEROMYCES MARXIANUS EN CONDICIONES
ÓPTIMAS DE AIREACIÓN Y CONCENTRACIÓN DE
EXTRACTO DE ALCACHOFA (*Cynara Scolymus*).”**

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO AGROINDUSTRIAL

**TESISTAS : HUARAZ ZAVALETA RAQUEL MELINA
REYES CASTRO JEAN CARLOS**

ASESOR : DR. AUGUSTO CASTILLO CALDERON

NUEVO CHIMBOTE - 2014

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

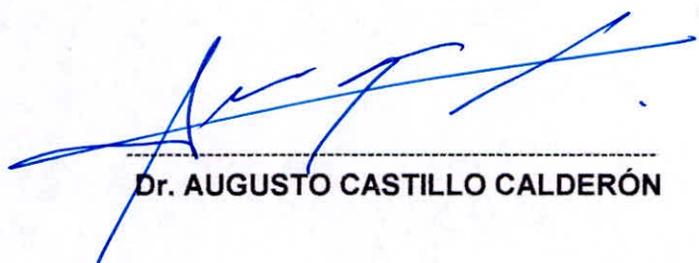
FACULTAD DE INGENIERÍA

ESCUELA ACADÉMICA PROFESIONAL DE
INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



HOJA DE CONFORMIDAD DE ASESOR

El presente trabajo de tesis titulado "PRODUCCIÓN DE INULINASA POR FERMENTACIÓN DE KLUYVEROMYCES MARXIANUS EN CONDICIONES ÓPTIMAS DE AIREACIÓN Y CONCENTRACIÓN DE EXTRACTO DE ALCACHOFA (*Cynara Scolymus*).” Ha contado con el asesoramiento de quien deja constancia de su aprobación. Por tal motivo firmo el presente trabajo en calidad de Asesor. Designado por RESOLUCIÓN DECANAL N°959-2016-UNS-FI



Dr. AUGUSTO CASTILLO CALDERÓN

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

FACULTAD DE INGENIERÍA

ESCUELA ACADÉMICA PROFESIONAL DE

INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



TESIS PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE
INGENIERO AGROINDUSTRIAL

"PRODUCCIÓN DE INULINASA POR FERMENTACIÓN DE KLUYVEROMYCES
MARXIANUS EN CONDICIONES ÓPTIMAS DE AIREACIÓN Y CONCENTRACIÓN DE
EXTRACTO DE ALCACHOFA (*Cynara Scolymus*)."

TESISTAS

Bach. Huaraz Zavaleta Raquel

Bach. Reyes Castro Jean Carlos

Revisado y aprobado el día 14 de Enero del 2015 por siguiente Jurado Evaluador.

Designado mediante Resolución Decanal 403-2017-UNS-FI

Dra. Elsa Aguirre Vargas

Presidente

Dr. Augusto Castillo Calderón

Secretario

Ms. Rogger Romero Usquiano

Integrante



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Siendo las 11:00 del 14 de Enero del dos mil quince se instaló en el Auditorio de la Escuela Académica Profesional de Ingeniería Agroindustrial el Jurado Evaluador, designado mediante Resolución N° 008 - 20.15 - UNS-CFI, integrado por los docentes:

- Dra. Elza Aguirre Vargas (Presidente)
- Dr. Augusto Castillo Calderón (Secretario)
- Ms. Rogger Romero Usquiano (Integrante); para dar inicio a la Sustentación y Evaluación de Tesis, titulada:

"Producción de Pinellagra por fermentación de Kluyveromyces marxianus en condiciones óptimas de aforada y concentración de extracto de floridusa (Cynara Scolymus).", elaborada por el(os) Bachilleres en Ingeniería Agroindustrial:

- Juanaz Favaleta Raquel Helvia
- Payer Pardo Juan Carlos

Asimismo, tienen como Asesor al docente: Dr. Augusto Castillo Calderón

Finalizada la sustentación, el(os) Tesistas respondió(eron) las preguntas formuladas por los miembros del Jurado y el Público presente.

El Jurado después de deliberar sobre aspectos relacionados con el trabajo, contenido y sustentación del mismo, y con las sugerencias pertinentes y en concordancia con el Artículo 39° y 40° del Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad Nacional del Santa, declaran:

| BACHILLER | PROMEDIO VIGESIMAL | PONDERACIÓN |
|--------------------------------------|--------------------|------------------|
| <u>Raquel Helvia Juanaz Favaleta</u> | <u>18</u> | <u>Excelente</u> |

Siendo las 12:15 horas del mismo día, se dio por terminado dicha sustentación, firmando en señal de conformidad el presente jurado.

Nuevo Chimbote, 14 de Enero del 20.15.

[Signature]
 Dra. Elza Aguirre Vargas
 Presidente

[Signature]
 Dr. Augusto Castillo Calderón
 Secretario

[Signature]
 Ms. Rogger Romero Usquiano
 Integrante

Ruby (03).



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

FACULTAD DE INGENIERÍA

E.A.P. INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Siendo las 11:00 del 14 de Enero del dos mil quince se instaló en el Auditorio de la Escuela Académica Profesional de Ingeniería Agroindustrial el Jurado Evaluador, designado mediante Resolución N° 008-2015-UNS-CFI, integrado por los docentes:

- Dra. Elza Aguirre Vargas (Presidente)
- Dr. Augusto Castillo Calderón (Secretario)
- Ms. Rogger Romero Usquiano (Integrante); para dar inicio a la Sustentación y Evaluación de Tesis, titulada:

"Producción de pulverizada por fermentación de *Trichoderma reesei* en condiciones de bajas de afluencia y concentración de extracto de flor de caña (*Cynara scolymus*)"

.....", elaborada por el(os) Bachilleres en Ingeniería Agroindustrial:

- Huanaco, Zoraida Rosquet Herrera
- Rays Castro Jean Carlos

Asimismo, tienen como Asesor al docente: Dr. Augusto Castillo Calderón

Finalizada la sustentación, el(os) Tesistas respondió(eron) las preguntas formuladas por los miembros del Jurado y el Público presente.

El Jurado después de deliberar sobre aspectos relacionados con el trabajo, contenido y sustentación del mismo, y con las sugerencias pertinentes y en concordancia con el Artículo 39° y 40° del Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad Nacional del Santa, declaran:

| BACHILLER | PROMEDIO VIGESIMAL | PONDERACIÓN |
|--------------------------------|--------------------|--------------|
| <u>Jean Carlos Rays Castro</u> | <u>17</u> | <u>Bueno</u> |

Siendo las 12:15 horas del mismo día, se dio por terminado dicha sustentación, firmando en señal de conformidad el presente jurado.

Nuevo Chimbote, 14 de Enero del 2015.

[Signature]
Dra. Elza Aguirre Vargas
Presidente

[Signature]
Dr. Augusto Castillo Calderón
Secretario

[Signature]
Ms. Rogger Romero Usquiano
Integrante

Ruby (03).

DEDICATORIA

A cada uno de nuestros padres, aquí el fruto de años de esfuerzo y dedicación ya que fueron ellos quienes estuvieron apoyándome de manera incondicional en toda nuestra vida tanto en momentos de felicidad y tristeza ellos siempre han estado junto a nosotros, y gracias a ellos somos lo que ahora somos y con el esfuerzo de ellos y el nuestro es que ahora podemos ser unos grandes profesionales.

Sera un gran orgullo para ellos, y para todos los que confiaron en nosotros.

AGRADECIMIENTO

- A Dios por habernos permitido llegar hasta este punto y habernos dado salud para lograr culminar este trabajo, además de su infinita bondad y amor.
- A cada una de nuestras familias principalmente a nuestros padres, cuyas personas han sido los principales pilares para darnos el apoyo permanente e incondicional para el logro de esta meta. Además de sus valores que son los que nos han permitido ser personas de bien, pero más que nada por su amor y comprensión.
- A nuestros profesores, por compartirnos sus conocimientos siendo de gran ayuda para poder desarrollarnos académica y profesionalmente, en especial al Dr. Augusto Castillo, por estar en todo momento instruyéndonos y pendiente del desarrollo de este trabajo de investigación.
- A nuestros amigos que siempre estuvieron brindándome su apoyo.

RESUMEN

El presente trabajo de investigación permitió el estudio de la producción de la enzima inulinasa (2,1 β -D fructano fructanohidrolasa, EC 3.2.1.7), a valores óptimos de aireación y concentración de extracto para la producción de inulinasa.

Se obtuvo un caldo crudo enzimático de inulinasa a partir de un cultivo en matraces de *Kluyveromyces marxianus*, en un medio que contiene extracto de brácteas de alcachofa como fuente de carbono y energía, con los siguientes parámetros: Temperatura 30°C, aireación (150 – 200) rpm en shaker y ajustamos el pH a 4 con ácido ortofosforico, volumen de extracto (20 – 50)% v/v.

Se utilizó el método experimental de optimización por un planeamiento factorial (Diseño Centra Compuesto Rotacional – DCCR), seguido por un análisis o metodología de superficie de respuesta RSM. De acuerdo al método experimental se varió las condiciones de fermentación: valores de aireación (150 – 200) rpm y valores de concentración de extracto (20 – 50)% v/v. Determinándose la actividad por la técnica de velocidad inicial para cada tratamiento.

El valor óptimo de aireación en el medio de fermentación para producción de inulinasa es de 176.069 rpm y el valor óptimo de concentración de extracto fue 43.52% (v/v). Los valores máximos de la actividad de la inulinasa sobre sacarosa fue 88.2329 U/ml y de inulina fue 16.74 U/ml.

ABSTRAC

His research led to the study of the production of the enzyme inulinase (2,1 β - D fructan fructanohidrolasa , EC 3.2.1.7) , at the optimal aeration and extract concentration to produce inulinase .

Broth crude enzyme inulinase was obtained from a flask culture of *Kluyveromyces marxianus* , in a medium containing extract of artichoke bracts as source of carbon and energy , with the following parameters: Temperature 30 ° C , aeration (150 - 200) rpm in shaker and adjust the pH to 4 with orthophosphoric acid, the volume of extract (20-50) % v / v .

Experimental optimization method was used for factorial planning (Centra Composite Rotational Design - DCCR) , followed by an analysis and response surface methodology RSM . According to the experimental method of fermentation conditions were varied : aeration values (150 - 200) rpm, extract concentration levels (20 - 50) % v / v . Activity determined by the technique of initial velocity for each treatment.

The optimum aeration in the fermentation medium for production of inulinase is 176 069 rpm and the optimum value of concentration of extract was 43.52% (v / v) . The maximum values of the inulinase activity on sucrose was 88.2329 U / ml and inulin was 16.74 U / ml .

INDICE GENERAL

| | | |
|------|--|----|
| I. | INTRODUCCION | 15 |
| II. | REVISION BIBLIOGRAFICA | 16 |
| | 2.1 Estudio de materia prima | 16 |
| | 2.2 <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7571 | 38 |
| | 2.3 Fermentación | 39 |
| | 2.4 Estudio de enzima inulinasa | 45 |
| | 2.5 Actividad de la inulinasa | 47 |
| III. | MATERIALES Y METODOS | 48 |
| | 3.1 Lugar de Ejecución | 48 |
| | 3.2 Materiales y Equipos | 48 |
| | 3.2.1 Materia prima | 48 |
| | 3.2.2 Materiales | 48 |
| | 3.2.3 Reactivos | 50 |
| | 3.2.4 Equipo e Instrumentos | 51 |
| | 3.3 Metodología de estudio | 52 |
| | 3.3.1 Descripción del proceso | 52 |
| | 3.3.1.1 Preparación del extracto de Alcachofa | 52 |
| | 3.3.1.2 Microorganismo | 54 |
| | 3.3.1.3 Medios de cultivo | 54 |
| | 3.3.1.4 Cultivo en matraces de <i>Kluyveromyces marxianus</i> | 55 |
| | 3.3.1.5 Producción de caldo crudo enzimático | 56 |
| | 3.3.1.6 Optimización de la aireación y concentración de extracto Del medio de fermentacion. | 56 |
| | 3.3.1.7 Determinación de la actividad enzimática | 57 |
| | 3.3.2 Métodos de análisis | 57 |
| | 3.3.2.1 Alcachofa (<i>Cynara Scolymus</i>) | 57 |
| | 3.3.2.1.1 Análisis químico proximal | 57 |
| | a. Humedad | 57 |
| | b. Proteína | 58 |
| | c. Grasa | 58 |

| | |
|--|------------|
| d. Ceniza | 58 |
| e. Fibra cruda | 58 |
| f. Carbohidratos totales | 58 |
| 3.3.2.2 Extracto de Alcachofa | 58 |
| 3.3.2.2.1 Determinación pH | 58 |
| 3.3.2.2.2 Determinación de la acidez | 58 |
| 3.3.2.2.3 Determinación de °Brix | 59 |
| 3.3.2.2.4 Determinación de azúcares reductores. | 59 |
| 3.3.2.3 Caldo enzimático | 59 |
| 3.3.2.3.1 Actividad enzimática. | 59 |
| 3.3.2.3.2 Determinación de azúcares reductores mediante el método de DNS (Ácido dinitrosalicílico). | 59 |
| 3.3.3 Diseño Experimental | 59 |
| 3.3.3.1 Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) | 59 |
| 3.3.3.2 Diseño Central Compuesto Rotacional (DCCR) | 60 |
| IV. RESULTADOS Y DISCUSION | 63 |
| 4.1 Extracto de Alcachofa | 63 |
| 4.2 Pruebas preliminares: curvas de crecimiento y producción de inulinasa. | 66 |
| 4.3 Producción de caldo crudo enzimático de inulinasa a partir de un cultivo en matraces de <i>K. marxianus</i> | 68 |
| 4.4 Optimización de la aireación y concentración de extracto para determinar la actividad de la inulinasa. | 73 |
| 4.4.1 Actividad Volumétrica de la Inulinasa sobre sacarosa. | 73 |
| 4.4.2 Actividad Volumétrica de la Inulinasa sobre inulina. | 83 |
| 4.4.3 Actividad Volumétrica de la Inulinasa sobre sacarosa e inulina. | 93 |
| V. CONCLUSIONES | 97 |
| VI. RECOMENDACIONES | 99 |
| VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS | 100 |
| VIII. ANEXOS | 105 |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura N°01 | |
| Flor de Alcachofa. | 17 |
| Figura N°02 | |
| Estructura química de la Sacarosa. | 27 |
| Figura N°03 | |
| Estructura química de la inulina: con una molécula terminal de glucosa (β -D-glucopiranosil) (A) y con una molécula terminal de fructosa (β -D-fructopiranosil) (B). | 31 |
| Figura N°04 | |
| Alcachofas. | 64 |
| Figura N°05 | |
| Extracto de brácteas de Alcachofa. | 65 |
| Figura N°06 | |
| Caldo crudo enzimático de la fermentación I N = 175 rpm; pH = 4; conc. De extracto = 13% v/v | 68 |
| Figura N°07 | |
| Caldo crudo enzimático de la fermentación I N = 175 rpm; pH = 4; conc. De extracto = 35% v/v | 68 |
| Figura N°08 | |
| Caldo crudo enzimático de la fermentación I N = 175 rpm; pH = 4; conc. De extracto = 56% v/v | 69 |
| Figura N°09 | |
| Caldo crudo enzimático de la fermentación II N = 150 rpm; pH = 4; conc. De extracto = 20% v/v | 69 |

| | |
|--|-----|
| Figura N°10 | |
| Caldo crudo enzimático de la fermentación II | |
| N = 150 rpm; pH = 4; conc. De extracto = 50% v/v | 70 |
| Figura N°11 | |
| Caldo crudo enzimático de la fermentación III | |
| N = 200 rpm; pH = 4; conc. De extracto = 20% v/v | 70 |
| Figura N°12 | |
| Caldo crudo enzimático de la fermentación III | |
| N = 200 rpm; pH = 4; conc. De extracto = 50% v/v | 71 |
| Figura N°13 | |
| Caldo crudo enzimático de la fermentación IV | |
| N = 139 rpm; pH = 4; conc. De extracto = 35% v/v | 71 |
| Figura N°14 | |
| Caldo crudo enzimático de la fermentación V | |
| N = 175 rpm; pH = 4; conc. De extracto = 13% v/v | 72 |
| Figura N°15 | |
| Procedimiento de humedad. | 108 |
| Figura N°16 | |
| Procedimiento de proteínas. | |
| Figura N°17 | |
| Procedimiento de cenizas. | 116 |
| Figura N°18 | |
| Procedimiento de azúcares reductores. | 119 |
| Figura N°19 | |
| Procedimiento de glucosa. | 121 |
| Figura N°20 | |
| Procedimiento de °Brix. | 122 |

Figura N°21

Procedimiento de Medio de Mantención 129

Figura N°22

Procedimiento de Medio de Activación. 131

Figura N°23

Procedimiento de Medio de Fermentación. 133

Figura N°24

Procedimiento de azucares reductores para Actividad Volumétrica. 138

INDICE DE GRAFICOS

Grafico N°01

Producción de biomasa e inulinasa durante la fermentación. 67

Grafico N°02

Diagrama de Pareto Estandarizada para Actividad Volumétrica sobre la Sacarosa 74

Grafico N°03

Efectos principales para Actividad Volumétrica sobre la Sacarosa. 75

Grafico N°04

Superficie de Respuesta estimada para Actividad Volumétrica sobre la Sacarosa: Interactuando aireación y concentración de extracto. 77

Grafico N°05

Contornos de Superficie de Respuesta estimada para Actividad Volumétrica sobre la Sacarosa: Interactuando aireación y concentración de extracto. 77

Grafico N°06

Diagrama de Pareto Estandarizada para Actividad Volumétrica sobre la Inulina 82

Grafico N°07

Efectos principales para Actividad Volumétrica sobre la Inulina. 83

Grafico N°08

Superficie de Respuesta estimada para Actividad Volumétrica sobre la Inulina: Interactuando aireación y concentración de extracto. 85

Grafico N°09

Contornos de Superficie de Respuesta estimada para Actividad Volumétrica sobre la Inulina: Interactuando aireación y concentración de extracto. 85

Grafico N°10

Superficie de Respuesta estimada para Actividad Volumétrica sobre la Inulina y Sacarosa: Interactuando aireación y concentración de extracto. 89

Grafico N°11

Grafico Superpuesto de Superficie de Respuesta estimada para Actividad Volumétrica sobre la Inulina y Sacarosa: Interactuando aireación y concentración de extracto. 96

Grafico N°12

Curva de calibrado para azucares reductores. 118

Grafico N°13

Curva de calibrado para glucosa Kit enzimático. 121

Grafico N°14

Curva de calibración para la determinación de azucares reductores. 140

INDICE DE TABLA

| | |
|---|----|
| Tabla N°01 | |
| Composición de Alcachofa en 100 gr. De porción comestible. | 19 |
| Tabla N°02 | |
| Especies más representativas de vegetales productores de inulina. | 19 |
| Tabla N°03 | |
| Producción de Alcachofa. | 22 |
| Tabla N°04 | |
| Características fisicoquímicas de la inulina, inulina de "alto desempeño" (HP) y oligofruktosa. | 32 |
| Tabla N°05 | |
| Plantas que contienen inulina y su contenido referido a producto fresco. | 35 |
| Tabla N°06 | |
| Composición de medios para la fermentación de <i>Kluyveromyces marxianus</i> . | 55 |
| Tabla N°07 | |
| Valores por según el número de variables. | 60 |
| Tabla N°08 | |
| Diseño codificado para la optimización de la concentración de extracto y aireación. | 61 |
| Tabla N°09 | |
| Valores de las variables independientes DCCR. | 62 |
| Tabla N°10 | |
| Composición química proximal de las brácteas de Alcachofa. | 64 |
| Tabla N°11 | |
| Caracterización del extracto de brácteas de Alcachofa. | 65 |
| Tabla N°12 | |
| Composición de medios para la fermentación de <i>Kluyveromyces marxianus</i> . | 66 |

| | |
|---|----|
| Tabla N°13 | |
| Actividad Volumétrica de la Inulinasa sobre Sacarosa. | 71 |
| Tabla N°14 | |
| Análisis de Varianza para la Actividad Volumétrica sobre Sacarosa | 73 |
| Tabla N°15 | |
| Efectos estimados para Actividad Volumétrica sobre Sacarosa (U/ml) | 75 |
| Tabla N°16 | |
| Coefficiente de regresión por Actividad Volumétrica sobre Sacarosa (U/ml) | 78 |
| Tabla N°17 | |
| Efectos estimados para Actividad Volumétrica sobre Sacarosa (U/ml) | 79 |
| Tabla N°18 | |
| Valores críticos resultados de la optimización de los parámetros de concentración de extracto y aireación Volumétrica sobre Sacarosa (U/ml) | 81 |
| Tabla N°19 | |
| Actividad Volumétrica de la Inulinasa sobre Inulina. | 83 |
| Tabla N°20 | |
| Análisis de Varianza para la Actividad Volumétrica sobre Inulina | 84 |
| Tabla N°21 | |
| Efectos estimados para Actividad Volumétrica sobre Inulina (U/ml) | 85 |
| Tabla N°22 | |
| Coefficiente de regresión por Actividad Volumétrica sobre Inulina (U/ml). | 89 |
| Tabla N°23 | |
| Valores críticos resultados de la optimización de los parámetros de concentración de extracto y aireación Volumétrica sobre Inulina (U/ml) | 92 |
| Tabla N°24 | |
| Actividad Volumétrica de la Inulinasa sobre Sacarosa e Inulina. | 93 |

| | |
|--|-----|
| Tabla N°25 | |
| Valores máximos y mínimos observados en las Actividades Volumétricas sobre Sacarosa e Inulina. | 94 |
| Tabla N°26 | |
| Combinación de factores experimentales, maximizando la función de "deseabilidad". | 94 |
| Tabla N°27 | |
| Composición del medio de Mantención. | 128 |
| Tabla N°28 | |
| Composición del medio de Activación. | 130 |
| Tabla N°29 | |
| Composición del medio de Fermentación. | 132 |
| Tabla N°30 | |
| Optimización de la aireación y concentración de extracto en el medio de fermentación para maximizar la actividad enzimática sobre sacarosa | 134 |
| Tabla N°31 | |
| Optimización de la aireación y concentración de extracto en el medio de fermentación para maximizar la actividad enzimática sobre inulina | 135 |
| Tabla N°32 | |
| Curva de Calibrado para DNS. | 137 |

I. INTRODUCCIÓN

La creciente necesidad de utilizar edulcorantes por su alta demanda para el consumo, motiva a investigar y obtener edulcorantes naturales, este es el caso de la inulinasa que una enzima caracterizada por hidrolizar la inulina en fructosa prácticamente pura, y a la vez es una enzima invertasa que hidroliza la sacarosa en fructosa prácticamente pura ampliamente usada en la industria de alimentos como edulcorantes dietético. La fructosa es el mejor edulcorante natural y es de 1.2 a 2 veces más potente que la sacarosa y menos cariogénico pudiendo ser un edulcorante alternativo para los diabéticos. (Ricca et al., 2007).

De ahí el interés por producir inulinasa, purificarla y caracterizarla a partir de cultivos microbianos en medios sintéticos y complejos de extractos de vegetales, siendo las levaduras *Kluyveromyces* las más estudiadas. La presencia de inulina en la Alcachofa (*Cynara Scolymus*) aumenta el interés de estudiar este vegetal como sustrato para el crecimiento de microorganismos que usen este polisacárido para producir inulinasa (Cazetta, 2005).

En este trabajo se plantea como problema: ¿Cuáles son las condiciones óptimas en aireación y concentración de extracto de Alcachofa (*Cynara Scolymus*) para la producción de inulinasa por fermentación lotes de *Kluyveromyces marxianus*?

y la hipótesis de que variando las condiciones de reacción: concentración de extracto (20–50)% v/v y valores de aireación (150–200)rpm, se podrán determinar los valores de concentración de extracto y aireación óptimos para maximizar la producción de inulinasa por *Kluyveromyces marxianus*.

En el presente Proyecto de Investigación, se propone determinar la concentración de extracto y aireación óptimos en la producción de inulinasa por fermentación de *Kluyveromyces marxianus*, teniendo como objetivos específicos lo siguiente:

- Determinar la composición química proximal de la Alcachofa.
- Caracterizar el extracto de Alcachofa.
- Producir un caldo crudo enzimático de inulinasa a partir de un cultivo en matraces de *Kluyveromyces marxianus*, en un medio que contiene extracto de alcachofa como fuente de carbono y energía.
- Determinar la aireación óptima en la actividad enzimática para la producción de inulinasa.
- Determinar la concentración óptima en la actividad enzimática para la producción de inulinasa.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Estudio de la materia prima

2.1.1 Alcachofa (*Cynara Scolymus*)

2.1.1.1 Aspectos generales

La alcachofera o alcachofa, *Cynara Scolymus*, Linnaeus (*Cynara scolymus*, L.) es una planta herbácea que alcanza hasta 80 cm de altura, con tallo suave y hojas muy divididas, de aspecto duro, que pertenece a la familia llamada antiguamente Compositae, ahora Asteraceae. Sus flores están agrupadas en cabezuelas grandes y originan frutos de color verdoso. La alcachofa tiene su origen en la Europa mediterránea, si bien, su cultivo se ha extendido hasta el continente americano donde es también muy apreciada. Es cultivada generalmente con fines comerciales y vive en climas semisecos y templados. Crece asociada al matorral xerófilo y bosques de encino y pino. Se dan distintos cultivares de alcachofa, teniendo incluso algunos, denominación de origen. La variedad cultivada en la Región de Murcia es mayoritariamente la "Blanca de Tudela", con la que se produce una alcachofa de calidad que presenta un aspecto exterior muy compacto y apiñado. La alcachofa de la zona presenta unas cualidades propias y un mayor aguante al ennegrecimiento después del corte, factor muy valorado por el comercio, que se refleja en unos precios de mercado superiores.



Figura 01: Flor de alcachofa. Sus flores están agrupadas en cabezuelas grandes y originan frutos de color verdoso.

A la alcachofa se le atribuyen desde tiempos muy antiguos propiedades preventivas contra varias enfermedades, por ejemplo, para los enfermos de hígado, pues ayuda a regular diversas funciones hepáticas. Además, presenta propiedades diuréticas y proporciona inulina, especie de almidón que presenta la particularidad de transformarse en el organismo en levulosa, azúcar natural de fácil asimilación, de gran importancia en dieta de diabéticos.

2.1.1.2 Morfología

Familia: Compuestas

Especie: *Cynara scolymus*, L.

Sinonimias: Alcaucil

Origen: Norte de África y Sur de Europa.

Planta: Planta vivaz, que puede considerarse como bianual y trianual, conservándose como vivaz en cultivos muy abandonados y con notable decrecimiento de la producción. Tallos, erguidos, gruesos, acanalados longitudinalmente y ramificados, con más de un metro de altura.

Sistema radicular: Extraordinariamente potente, que le permite adaptarse a una extensa gama de suelos. Se inserta en un rizoma muy desarrollado, en el que se acumulan las reservas alimenticias que elabora la planta.

Hojas: Largas, pubescentes, grandes de 0,9 a un metro de color verde claro por encima y algodonosas por debajo. Los nervios centrales están muy marcados y el limbo dividido en lóbulos laterales, a veces muy profundos en las hojas basales y mucho menos hendidos en hojas de tallo.

Flores: Terminales muy gruesas, recubiertas por escamas membranosas imbricadas y carnosas en la base constituyendo la parte comestible.

Fruto: Es un aquenio provisto de vilano, de forma oblonga y color grisáceo, que son considerados como la semilla de la planta, pesando el litro de 600 a 610 gramos y durando de seis a doce años su facultad germinativa.

2.1.1.3 Composición química de la Alcachofa

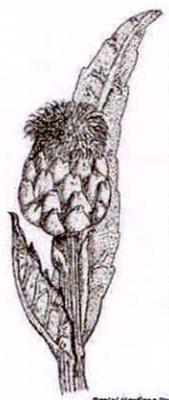
Tabla 01: Composición de Alcachofa en 100 gr de porción comestible

| Contenido energético | | |
|---|------|------|
| De los componentes digestibles | KJ | 93 |
| De 100 gr de porción comestible | Kcal | 22 |
| Componentes principales de 100 g de porción comestible | | |
| Agua | Gr | 82.5 |
| Proteína | Gr | 2.4 |
| Grasa | Gr | 0.1 |
| Hidratos de carbono | Gr | 2.6 |
| Ácidos orgánicos | Gr | 0.3 |
| Fibra | Gr | 10.8 |
| Sales minerales | Gr | 1.3 |

Fuente: Tabla de composición de alimentos. Centro Nacional de Alimentación y Nutrición (2009)

Las brácteas y tallo frescos de alcachofa presentan principalmente 82.5 gr de agua e hidratos de carbono es de 2.6 gr. En relación a los carbohidratos, entre los azúcares encontrados están los monosacáridos fructosa y glucosa y los oligosacáridos sacarosa y fructooligosacáridos además de trazas de almidón e inulina (Hermann, 1999).

Tabla 02: Especies más representativas de vegetales productores de inulina.



| <i>Orden taxonómico</i> | <i>Especie representativa</i> | <i>Tipo de fructana</i> | <i>Observaciones</i> |
|-------------------------|--------------------------------------|---|--|
| Asterales | Alcachofa común (Cynara Scolymus L.) | Inulina lineal con = 95% enlaces β -2,1 | La alcachofa común produce la inulina más larga de origen vegetal, fructanas con más de 100 unidades de fructosa unidas linealmente. |

2.1.1.4 Cultivo de Alcachofa en el Peru

El Perú tiene una muy buena posición en el mercado mundial de exportaciones de alcachofa. Ocupa el tercer lugar con más de 10 millones de toneladas enviadas al año, después de China y Francia, informó el congresista Enrique Wong (APGC). Una de las regiones con mayor producción es Junín, que en los últimos años cobró protagonismo. Andrés Mendoza, secretario de la Red de Productores Agropecuarios del Corredor Mantaro (Red Agroexport), precisó que la producción de alcachofa criolla (con espinas) dio en los últimos años más de 20 mil empleos, de los cuales el 60% son mujeres, en el país.

El 80% de alcachofa que produce el Valle del Mantaro se comercializa a las empresas agroindustriales, las cuales la exportan procesada a los mercados europeos.

La alcachofa criolla se caracteriza por su sabor y textura, además de contar con propiedades curativas: tónica para el hígado, reguladora cardiovascular, favorece la digestión, es estimulante, diurética y ayuda a eliminar úrea y colesterol. Saúl Ormeño, representante de DANPER Trujillo, empresa que exporta a Europa, indicó que solo el 20% de la producción se comercializa a los mercados local y nacional.

Los productores venden la docena de la hortaliza a las agroindustriales a S/. 3,00, tres veces más respecto al 2010, cuando su costo era de S/. 1,30 por docena. La mejora del precio es positiva para la economía de los agricultores.

El mejor precio se debe a la demanda en el exterior, principalmente de Europa y Estados Unidos, así como al proceso de asociatividad de los pequeños productores, quienes lograron formalizar la cadena de comercialización beneficiando así a más de 3500 familias. Con la finalidad de seguir mejorando la calidad y el rendimiento de este cultivo, José Muro, director de Competitividad del Ministerio de

Agricultura (Minag), dijo que continuarán promoviendo la asociatividad y fortalecer sus conocimientos a través de la capacitación y asistencia técnica, con el fin de insertarlos con éxito en los mercados más competitivos del mundo.

Jesús Chipana, alcalde de la Concepción, invitó al II Festival de la Alcachofa que se realizará el 6 y 7 de abril, donde se presentarán platos típicos de la región, todas a base de la reconocida hortaliza.

Tabla 03: Producción de Alcachofa 2012.



| | País | Toneladas | | País | Toneladas |
|--------------------|-----------|-----------|--|------------|-----------|
| 1 | Egipto | 387,704 | 11 | Turquía | 32,173 |
| 1 | Italia | 364,871 | 12 | Grecia | 31,600 |
| 3 | España | 199,100 | 13 | Chile | 22,500 |
| 4 | Perú | 141,496 | 14 | Irán | 18,000 |
| 5 | Argentina | 106,000 | 15 | Túnez | 18,000 |
| 6 | China | 77,000 | 16 | Siria | 6,800 |
| 7 | Marruecos | 63,889 | 17 | México | 4,838 |
| 8 | Argelia | 53,657 | 18 | Israel | 2,847 |
| 9 | EEUU | 51,300 | 19 | Uzbekistán | 2,500 |
| 10 | Francia | 42,465 | 20 | Chipre | 2,324 |
| Fuente: FAO | | | Elaboración: Desarrollo Peruano | | |

2.1.1.5 Problemas más importantes de la industria conservera de la alcachofa

Pardeamiento enzimático de la alcachofa: El pardeamiento enzimático se manifiesta como un oscurecimiento gradual de la

alcachofa, que se vuelve más intenso tras el corte de las hojas externas o brácteas para obtener el corazón (Lattanzio et al., 2005). Este aspecto, desagradable para el consumidor, refleja una simultánea descomposición de nutrientes de la alcachofa. Las enzimas responsables de este pardeamiento enzimático son enzimas oxidativas como la polifenoloxidasa o tirosinasa (PPO; EC 1.14.18.1), y la peroxidasa (POD; EC 1.11.1.7). El pardeamiento enzimático de las frutas y hortalizas se debe a una ruta o secuencia de reacciones que convierten a sus fenoles endógenos (simples e incoloros) en los pigmentos heteropoliméricos denominados feomelaninas (color anaranjado-rojizo) y eumelaninas (color marrón a negro). La ruta comienza con dos reacciones acopladas catalizadas por PPO en las que participa el oxígeno molecular. La primera reacción consiste en la hidroxilación de monofenoles a o-difenoles (actividad monofenolasa) y, la segunda, en la oxidación de o-difenoles a o-quinonas (actividad difenolasa) (Rodríguez-López et al., 1992). Estas quinonas reaccionan con numerosas sustancias endógenas a través de etapas de oxidación, adición, transposición y polimerización, originando finalmente melaninas (Tudela et al., 1997). El peróxido de hidrógeno generado puede ser utilizado por las PODs para futuras etapas de oxidación.

El procesamiento industrial para combatir este problema incluye operaciones de lavado, escalde y esterilización con diversos líquidos control. Este tratamiento, inactiva lentamente a las enzimas desencadenantes del proceso, pero no consigue eliminar totalmente el pardeamiento enzimático, ya que durante cierto tiempo se potencia la actuación de estas enzimas sobre sus sustratos, con la formación de productos oxidados (Rodríguez López et al., 1999). La alta temperatura facilita la evolución de las o-quinonas hacia melaninas a través de reacciones no enzimáticas acopladas.

Además, este proceso provoca importantes pérdidas de la calidad nutritiva (por ejemplo pérdida de vitamina C y material antioxidante) y sensorial (aroma, sabor, textura, etc.) del producto (Devece et al., 1999). En la actualidad se han ensayado diferentes alternativas para el escaldado de frutas y hortalizas (Mencarelli, 1987; Devece et al., 1999). Una nueva alternativa al escalde convencional de frutas y hortalizas es su irradiación con microondas (Decareau, 1985).

Precipitación de la inulina: La precipitación del polisacárido inulina supone un problema para la comercialización de las conservas de alcachofa. Este polímero genera una especie de

“tierra” blanca que perjudica las propiedades organolépticas de este producto. Algunas soluciones, como la incorporación de inulinasa, en el líquido de gobierno resultan caras y hasta el momento inviables.

2.1.1.6 Aprovechamiento de los desechos de alcachofa de la alcachofa

El sector de la alcachofa genera dos tipos de desechos. Los más importantes los genera la industria transformadora de este producto. El 70% en peso de la flor de la alcachofa corresponde a las hojas externas o brácteas no destinadas al consumo humano. Sin embargo, estos desechos son útiles para la alimentación animal y están destinados a la elaboración de forrajes ensilados (Megías et al., 1991). Por otra parte, la alcachofa contiene sustancias con aplicabilidad terapéutica como cinarina, cinaropicrina, inulina, flavonoides y sales potásicas (Hammouda y Seif-EI-Nars, 1993). Estos productos se utilizan como principios activos en presentaciones simples y compuestas y en fórmulas magistrales para el tratamiento de la anorexia, hepatitis, hipercolesterolemia, arteriosclerosis, hipertensión arterial, estreñimiento, etc. Estudios realizados en nuestro laboratorio, han puesto de manifiesto el gran contenido de PPO y POD en las brácteas de la alcachofa. Las PPOs y PODs son enzimas con una

alta utilización biotecnológica, por lo que su purificación a partir de una fuente barata, como los desechos de la alcachofa, podría tener un gran impacto económico. El estudio de sus propiedades podría aconsejar su uso en diversos procesos, desplazando a otras PPOs oPODs utilizadas en la actualidad. A continuación, se describen los antecedentes sobre la utilización de estas enzimas en diversos procesos biotecnológicos.

Además, estos desechos industriales también son ricos en el polisacarido inulina. El otro desecho generado en el sector de la alcachofa es un residuo agrícola. Las hojas y las flores maduras se acumulan al final de cada periodo productivo. Las hojas contienen una alta concentración de una enzima llamada ascorbato peroxidasa (APX), así como cinarina y otros compuestos fenólicos. Las flores maduras contienen en sus estigmas, una alta concentración de una proteasa coagulante de la leche (Sidrach et al., 2005).

2.1.2 Sacarosa.

La sacarosa o azúcar común es un disacárido formado por alfa-glucopiranososa y beta-fructofuranosa. Su nombre químico es:

Alfa-D-Glucopiranosil - (1→2) - beta-D-Fructofuranósido.

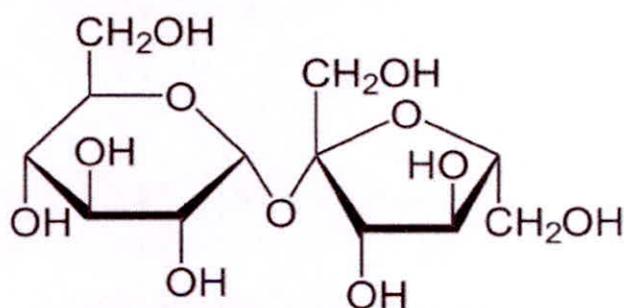
Su fórmula química es: $C_{12}H_{22}O_{11}$.

2.1.1.1 Estructura y composición

La sacarosa es un disacárido de glucosa y fructosa. Se sintetiza en plantas, pero no en animales superiores. No contiene ningún átomo de carbono anomérico libre, puesto que los carbonos anoméricos de sus dos unidades monosacáridos constituyentes se hallan unidos entre sí, covalentemente mediante un enlace O-glucosídico.

Por esta razón, la sacarosa no es un azúcar reductor y tampoco posee un extremo reductor. Su nombre abreviado puede escribirse como Glc(a -1à 2)Fru o como Fru(b 2à 1)Glc. La sacarosa es un producto intermedio principal de la fotosíntesis, en muchas plantas constituye la forma principal de transporte de azúcar desde las hojas a otras partes de la planta. En las semillas germinadas de plantas, las grasas y proteínas almacenadas se convierten en sacarosa para su transporte a partir de la planta en desarrollo (Garrido y Teijón, 2006).

Figura 02: Estructura química de la Sacarosa.



Fuente: Garrido y Teijón (2006).

2.1.2.1 Características.

La sacarosa se usa en los alimentos por su poder endulzante. Al llegar al estómago sufre una hidrólisis ácida y una parte se desdobra en sus componentes glucosa y fructosa. El resto de sacarosa pasa al intestino delgado, donde la enzima sacarasa la convierte en glucosa y fructosa.

Por su sabor agradable el ser humano tiende a un consumo exagerado, lo que raramente se da en la naturaleza. Sin embargo, en la sociedad industrializada, su disponibilidad es alta y su precio bajo, por lo que se sobrepasan con gran facilidad los límites razonables de su consumo. Debido a ello, la sacarosa es limitada en la dieta por razones de salud, ya que un consumo descontroladamente alto produce una carga glucémica elevada (Sánchez y Bárcena, 2007).

2.1.2.2 Usos, aplicaciones y comercialización.

El azúcar de mesa es el edulcorante más utilizado para endulzar los alimentos y suele ser sacarosa. En la naturaleza se encuentra en un 20% del peso en la caña de azúcar y en un 15% del peso de la remolacha azucarera, de la que se obtiene el azúcar de mesa. La miel también es un fluido que contiene gran cantidad de sacarosa parcialmente hidrolizada.

La sacarosa es el edulcorante más utilizado en el mundo industrializado, aunque ha sido en parte reemplazada en la preparación industrial de alimentos por otros endulzantes tales como jarabes de glucosa, o por combinaciones de ingredientes funcionales y endulzantes de alta intensidad.

Generalmente se extrae de la caña de azúcar, de la remolacha o del maíz y entonces es purificada y cristalizada. Otras fuentes comerciales (menores) son el sorgo dulce y el jarabe de arce.

La extensa utilización de la sacarosa se debe a su poder endulzante y sus propiedades funcionales como consistencia. Por tal motivo es importante para la estructura de muchos alimentos incluyendo panecillos y galletas, nieve y sorbetes, además es auxiliar en la conservación de alimentos, así que es común en mucha de la llamada comida basura (Sánchez y Bárcena, 2007).

2.1.3 Inulina

La inulina es un polímero constituido por moléculas de D-fructosa unidas mediante enlace glucosídico $\beta(2,1)$ y una molécula de glucosa que forma parte de uno de los extremos del polímero. La hidrólisis de inulina produce jarabes con más de 75% de fructosa u oligofructanos, y 5 a 6% de glucosa. La fructosa es muy cotizada en la industria alimentaria, en la elaboración de productos dietéticos y para diabéticos, debido a su bajo nivel calórico;

siendo su poder edulcorante aproximadamente 1.80 veces mayor que el de la sacarosa (Badui, 1995).

Algunas fuentes naturales de oligofruktanos e inulina son el "Jerusalen artichoke" (*Heliantus tuberosus* L.), artichoke (*Cynara Scolymus*) , "Chicory" (*Cichorium intybus*), "dalia" y "dandelion" (Percival, 1962). El carbohidrato almacenado por el yacón tiene similares características estructurales a la inulina de la "dalia" y "jerusalen artichoke"; indicándose que almacena oligofruktanos de bajo peso molecular, desde tri- a decasacaridos (Goto et al., 1995).

Los oligofruktanos tipo inulina pasan a través del tracto digestivo sin ser metabolizados; además favorecen la proliferación de bifidobacterias en el colon, las cuales tienen efecto antagonista sobre la actividad de las bacterias putrefactivas como *Escherichia coli* y *Clostridia*, *bacteroidacea* y *Streptococcus faecalis*, *Proteus* y otros; gracias a ello se reduce la formación de compuestos tóxicos, entre ellos algunos como amoniaco y aminas (toxinas del hígado), nitrosaminas (cancerígenos), fenoles y cresoles (promotores de cáncer), etc. (Thomomatsu, 1994).

La hidrólisis de la inulina y/o oligofruktanos puede ser realizada por procedimientos químicos o enzimáticos. La primera ha sido muy estudiada, sin embargo, requiere grandes cantidades de energía y está sujeta a reacciones secundarias; mientras que el proceso enzimático usando inulinasa presenta notables ventajas (Thonart y Artois, 1986).

La viscosidad de la oligofructosa a 10°C en solución acuosa al 5% p/p, es la menor de los fructanos y es una característica clave para la formación de geles y su uso como un sustituto de grasas.

La inulina también mejora la estabilidad de emulsiones y espumas, por lo que se usa como estabilizante en diversos productos alimenticios (helados, salsas, untables, postres cremosos, etc).

Se observa una sinergia entre la inulina y otros agentes gelantes como la gelatina, alginatos, carraginos, goma y maltodextrinas (Madrigal y Sangronis, 2007).

Tabla 04: Características fisicoquímicas de la inulina, inulina de “alto desempeño” (HP) y oligofructosa (21)

| Características fisicoquímicas de la inulina, inulina de “alto desempeño” (HP) y oligofructosa | | | |
|---|------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|
| Característica | Inulina | Inulina HP | Oligofructosa |
| Estructura química(*) | GF _n (2 = n = 60) | GF _n (10 = n = 60) | GF _n + Fn (2 = n = 7) |
| GP_{prom} | 12 | 25 | 4 |
| Materia seca (g/100g) | 95 | 95 | 95 |
| Pureza(g/100g) | 92 | 99,5 | 95 |
| Azúcares(g/100g) | 8 | 0,5 | 5 |
| pH | 5 – 7 | 5 – 7 | 5 – 7 |
| Cenizas (g/100g) | < 0,2 | < 0,2 | < 0,2 |
| Metales pesados (g/100g secos) | < 0,2 | < 0,2 | < 0,2 |
| Apariencia | Polvo blanco | Polvo blanco | Polvo blanco o jarabe viscoso |
| Sabor | Neutral | Neutral | Moderadamente |

| | | | |
|--|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
| Dulzor % (vs. sacarosa=100%) | 10 | Ninguno | dulce 35 |
| Solubilidad en agua a 25°C (g/L) | 120 | 25 | > 750 |
| Viscosidad en agua (5% p/p sol. acuosa) a 10 °C (mPa.s) | 1,6 | 2,4 | < 1,0 |
| Funcionalidad en alimentos | Sustituto de grasas | Sustituto de grasas | Sustituto de azúcar |
| Sinergismo | Con agentes gelificantes | Con agentes gelificantes | Con edulcorantes intensos |

Fuente: *Madrigal y Sangronis (2007).*

(*) G: unidades de glucosa, F: unidades de fructosa.

2.1.3.2 Características

Los fructanos por su configuración química no pueden ser hidrolizados por las enzimas digestivas del hombre y de animales por lo que permanecen intactos en su recorrido por la parte superior del tracto gastrointestinal intestino grueso, colon. De esta manera, este tipo de compuestos se comportan como fibra dietética (11,19). Los fructanos aportan un valor calórico reducido (1.5 Kcal/g) si se comparan con los carbohidratos digeribles (4 Kcal/g). La oligofructosa y una inulina purificada o llamada de "alto desempeño" o HP (high performance).

A nivel industrial, la inulina se presenta como un polvo blanco sin olor, con sabor neutral y sin efecto residual, pero oligofructosa además de su presentación en polvo se consigue como jarabe viscoso (75% de materia seca), ambos incoloros.

La inulina nativa, a diferencia de la inulina HP o de alta pureza, contiene azúcares libres (glucosa, fructosa, sacarosa), lo que le confiere cierto dulzor (10% del dulzor de la sacarosa). La inulina HP presenta menor solubilidad que la inulina nativa, debido a la casi total ausencia de azúcares libres (0.5% de materia seca). (Madrigal y Sangronis, 2007).

2.1.3.3 Sustratos de inulina

La inulina es el componente base de un sustrato empleado como fuente de carbono para la producción microbiana de inulinasa, sea como inulina pura o como extracto de materiales vegetales o materias primas renovables (Cazetta et al., 2005; Rocha et al., 2006; Sangeetha et al., 2005; Singh y Bhermi, 2008).

La inulina es un fructano, un polisacárido almacenado en muchas plantas y consiste de una cadena lineal de enlaces β (2-1) fructosil-fructosa; al final de la cadena está presente una unidad de glucosa a través de un enlace tipo sacarosa. En la inulina de origen vegetal, las unidades de fructosas enlazados a la glucosa

terminal puede variar desde algunas unidades hasta 70, lo que significa que la inulina es una mezcla de oligómeros y polímeros, definiéndose como un polifrufructano con grado de polimerización (DP) mayor a 30 unidades (Pedreschi et al., 2003; Ricca et al., 2007; Seminario et al., 2003).

Tabla 05: Plantas que contienen inulina y su contenido referido a producto fresco.

| Planta | Inulina (%) |
|--|-------------|
| Bardana o lampazo (<i>Arctium lappa</i>) | 27-45 |
| Agave (<i>Agave spp</i>) | 16-25 |
| Enula o helinio (<i>Inula helenium</i>) | - |
| Ñame o yam (<i>Dioscorea spp</i>) | 19-20 |
| Topinambur o papa de Jerusalem (<i>Helianthus tuberosus</i>) | 14-19 |
| Diente de león (<i>Taraxacum officinale</i>) | 12-15 |
| Achicoria (<i>Cichorium intybus</i>) | 10-15 |
| Ajo común (<i>Allium sativum</i>) | 9-16 |
| Yacon (<i>Smallanthus sonchifolius</i>) | 3-19 |
| Alcachofa (<i>Cynara scolymus</i>) | 3-10 |
| Puerro (<i>Allium porrum</i>) | 3-10 |
| Cebolla (<i>Allium cepa</i>) | 2-6 |
| Esparrago (<i>Asparagus officinalis</i>) | 2-3 |

Fuente: Van Loo J, Coussement P, De Leenheer L, Hoebregs H, Smiths G. On the presence of inulin and oligofrufructose as natural ingredients in the western diet. Crit Rev Food Sci Nutr 1995.

La hidrólisis completa de la inulina genera fructosa y glucosa con un grado de concentración proporcional al DP inicial del polisacárido. El DP y la ramificación dependen del origen vegetal de la inulina. Comercialmente existe inulina de achicoria, dalia y alcachofa Jerusalem, con un DP promedio de 28 (Ricca et al., 2007). Se han publicado que las propiedades de la inulina no solo dependen del tipo de planta sino también del manejo agronómico y almacenamiento que se haya dado, como son los casos de las raíces de achicoria, espárragos y yacón (Graefe et al., 2004; Irvin y Hurst, 1993; Siomos et al., 2010).

Una propiedad limitante del uso de inulina es su baja solubilidad en agua (6% a 10°C y 35 % a 90°C). Sin embargo el proceso de extracción a partir de vegetales es sencillo, tal como lo demuestran la producción de extracto de yacón y concentrado de inulina de raíces de achicoria y dalia y turiones de espárragos (Leite et al., 2007; Ricca et al., 2007; Singh y Bhermi, 2008; Kango, 2008).

Ricca et al. (2007) muestran los contenidos de inulina de la cebolla, alcachofa, ajo, plátano, y achicoria, observándose los que tienen mayor contenido del polisacárido son la alcachofa de Jerusalem y la achicoria con 19 y 20 % peso respectivamente (base húmeda). Los rendimientos en inulina de las raíces y tubérculos son altos.

Sin embargo, la mayoría de las materias primas investigadas son costosas o tienen limitada disponibilidad, a excepción del espárrago que contiene inulina sobre el 15% y su producción anual mundial es superior a la achicoria, la alcachofa Jerusalem y la dalia. Por lo que generalmente, la factibilidad de escalamiento para la producción de una enzima está basada en el alto rendimiento del microorganismo y la disponibilidad y lo barato que signifiquen las materias primas (Singh y Bhermi, 2008).

Se aprecia que estas fuentes de inulina han recibido especial atención en la investigación como materias primas renovables, para la producción de bioetanol, inulooligosacáridos y jarabe de fructosa. El mejor procedimiento promisorio para la obtención de jarabe de fructosa desde inulina y materiales vegetales que contienen inulina, incluye el uso de la enzima inulinasa microbiana que por tratamiento hidrolítico en un solo paso, se obtienen rendimientos de hasta 95% de fructosa pura (Chi et al., 2009; Riccaet al., 2007).

2.1.3.4 Uso, aplicaciones y comercialización

La hidrólisis completa de la inulina resulta en la formación de fructosa y glucosa con un ratio de concentración proporcional a la DP inicial de la inulina. El DP y la ramificación dependen del

origen vegetal de la inulina. Comercialmente existe inulina de chicoria, dalia, jerusalén, alcachofa, con un promedio de DP de alrededor 27 – 29.

Recientemente se ha publicado que las propiedades de la inulina no solo dependen del tipo de planta sino también del manejo agronómico y almacenamiento que se haya dado, como es el caso de las raíces de achicoria. (Leite et al., 2007).

2.2 Kluyveromyces marxianus NRRL Y – 7571

El género *Kluyveromyces* corresponde a los microbios de levadura, la cepa *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 es considerada como una de las levaduras que tiene gran potencial biotecnológico para producir inulinasa (Castillo y Chamy, 2010).

2.2.1 Características

Muchas cepas de mohos, levaduras y bacterias son capaces de producir inulinasa, se confirmó que los microorganismos más comúnmente usados son las cepas de mohos como el *Aspergillus* sp. y cepas de levadura como *Kluyveromyces marxianus*, aunque las cepas de levadura producen más inulinasa que las cepas de hongos y bacterias. Las levaduras tienen la ventaja por tener una mayor velocidad de generación celular y adaptabilidad a diferentes condiciones y modos de cultivo, donde se demostró que la

Kluyveromyces marxianus CDBB-L-278, fue una levadura hiperproductora de inulinasa (Castillo y Chamy, 2010).

2.2.2 Requerimientos nutricionales

El género *Kluyveromyces* corresponde a los microbios de levadura, las que son muy conocidas por su habilidad en crecer sobre fructano tales como la inulina, en rafinosas o sacarosa. En cepas de *Kluyveromyces* como *ciceisprus*, *fragilis*, *marxianus*, sp Y- 85, etc. Se han detectado altas actividades enzimáticas cuando, las levaduras crecieron en un medio conteniendo inulina, sea pura o desde un extracto de las plantas como fuente de carbono (Rouwenhorst et al., 1998).

Las levaduras *Kluyveromyces marxianus* var. *Bugaricus* ATCC 16045 produjo grandes cantidades de actividad extracelular de inulinasa cuando creció sobre inulina, sacarosa, fructosa y glucosa como fuente de carbono (Kushi et al., 2000).

2.3 Fermentación

La fermentación es un proceso de biotransformación de materia orgánica por la acción de células (de microorganismos o de animales) en sustancias químicas llamados metabolitos, llevada a cabo bajo ciertas condiciones ambientales y en recipientes adecuados llamados fermentadores, llevada a cabo bajo ciertas condiciones ambientales y en recipientes adecuados llamados

fermentadores o biorreactores. En estos equipos las sustancias van reaccionando en el tiempo por acción del material biológico activo.

La fermentación se refiere también a un proceso microbiano que suministra energía, en el cual los compuestos orgánicos sirven de aceptores terminales de electrones (o de hidrogeno). El dióxido d carbono y otros gases también se consideran como productos de la reacción o respiración de los microorganismos (Walter et al., 1994).

2.3.1 Producción de enzimas microbianas

- Tiempo de producción

La producción es más o menos paralela al crecimiento. La máxima producción se alcanza usualmente al mismo tiempo que el crecimiento máximo; en un medio que no sea deficiente en sustancias inductoras, las cuales son importantes para la síntesis de enzimas, pero no para su desarrollo

Cuando el microorganismo llega a fase estacionaria la producción de la enzima podría aumentar, mantenerse constante o disminuir; este último probablemente debido a la presencia de proteasas producidas y segregadas al medio como enzimas extracelulares o liberadas debido a la autólisis de las células.

- Efecto de aireación

Existen diversos reportes sobre la aireación para la producción de algunas enzimas extracelulares; sin embargo, parece que el grado preciso de aireación requerido, varía de un microorganismo a otro y con la enzima.

La agitación del medio de cultivo favorece la disolución del oxígeno y los nutrientes en suspensión; sin embargo, algunas enzimas, son susceptibles a desnaturalización cuando la interfase gas-agua se incrementa tal como en una agitación vigorosa o gasificación. La desnaturalización de la superficie podría ser un factor involucrado en aquellos casos donde se requiere de aireación óptima para la formación de la enzima. (Davies, 1963).

Consideremos una burbuja de aire moviéndose en un líquido en fermentación. El oxígeno debe pasar desde el interior de la burbuja hacia el líquido y posteriormente ser consumido por los microorganismos. Hemos señalado una serie de pasos o etapas en este fenómeno tan complejo; sin embargo vamos a restringir nuestro estudio a solo tres etapas como son:

- El transporte de oxígeno desde el seno de la burbuja de aire hacia la interfase.
- La difusión del oxígeno a través de la interfase gas – líquido.
- El transporte a través del líquido

Por lo tanto, evaluar la transferencia de oxígeno en un sistema de fermentación. Implica el cálculo de las resistencias diversas al paso del oxígeno desde la burbuja de aire hasta su difusión en la célula.

Para el estudio de un problema de transferencia de masa, son importantes las condiciones de la interfase. Con excepción de los casos de transferencia extremadamente intensos o de acumulación de partículas sólidas en la interfase, la experiencia muestra que existe equilibrio entre las fases a través de la interfase. Es decir, si una burbuja de aire se mueve en un líquido en una fermentación, el oxígeno debe pasar desde el interior de la burbuja hacia el líquido en una fermentación, el oxígeno debe pasar desde el interior de la burbuja hacia el líquido, para finalmente ser consumida por las células. En otras palabras, la concentración de oxígeno en el gas, junto a la interfase, está en equilibrio con la concentración de oxígeno en el líquido, también junto a la interfase.

Ya que existe equilibrio entre las fases en la interfase, se puede aplicar las leyes que rigen en el equilibrio. La manera más simple es por la Ley de Henry:

$$P_i = H' C_i$$

El flujo de transferencia de masa será expresado por:

$$VTO = K_{La}(C^* - C_L)$$

- La concentración de oxígeno C_L en el seno del líquido aumenta hasta alcanzar el valor de C^* , de modo que la transferencia de O_2 hacia el seno del líquido (NO_2) se anula cuando $C^*=C_L$, cuando se anula el gradiente. El valor de K_{La} está directamente relacionado con la eficiencia de un biorreactor para transferir oxígeno.

Cuando se trabaja la experiencia en matraces el K_{La} se iguala:

$$K_{La} = N * V_s$$

$N =$ Agitación

$V_s =$ Volumen del líquido (cste)

Teniendo:

$$VTO = cN^\alpha * V_L^\beta$$

Se concluye que existe una relación funcional directa con la aireación y agitación.

- Requerimientos de carbohidratos

La producción de enzimas extracelulares, requiere de energía y por la mayoría de microorganismos esta energía es suministrada por carbohidratos metabolizables, aunque muchas bacterias pueden usar también aminoácidos. La fuente de carbono puede realizar también el rol de inductor para la producción de una enzima inductible; por el ejemplo el almidón para la formación de amilasa, etc. Cuando la fuente de energía

en un medio es una en la cual el inoculo no está adaptado, la energía inicial requerida para la síntesis de las enzimas inductibles proviene generalmente del metabolismo endógeno del organismo de trazas de impureza en el medio.

Podrían darse casos en que el organismo es incapaz de producir la energía requerida para sintetizar enzimas inductibles, a menos que se les suministré primero una fuente de carbohidratos fermentables. En este caso usual inducir una pequeña cantidad de glucosa en el medio (0.25%) para la producción de enzimas extracelulares por organismos que crecen bien en un medio con carbohidratos libres.

Sin embargo, está bien establecido que la formación de algunas enzimas es inhibida bajo condiciones donde la glucosa o alguna otra sustancia que suministra energía sea rápidamente metabolizada, aunque el mecanismo de inhibición no está bien entendiendo. La mayoría de enzimas estudiadas son intracelulares y muchas de ellas inductibles, particularmente aquellas involucradas en el metabolismo de otros carbohidratos. Para demostrar la inhibición por glucosa es necesario mostrar una disminución en la formación de enzimas cuando el inductor y la glucosa están presentes simultáneamente, o en el caso de enzimas constitutivas, se muestra que se forma menos enzima con glucosa como única fuente de carbón que con otras fuentes de carbono inductora y no

inhibidora. Según Davies (1963) es difícil conocer cuando el medio está libre de inductores e inhibidores.

2.4 Estudio de enzima inulinasa

La inulinasa (2,1 - β - D fructano fructanohidrolasa, EC 3.2.1.7) e levadura es una enzima extracelular parcialmente asociada con la pared celular y parcialmente excretada dentro del medio de cultivo. La inulinasa es una enzima denominada 2,1 - β - D fructano fructanohirolinasa, EC 3.2.1.7, caracterizada por hidrolizar la inulina en fructosa prácticamente pura, ampliamente usada en la industria de alimentos como edulcorantes dietético (Sangeetha et al. 2005).

La producción de enzima se expresa en términos de actividad enzimática. Se define a una unidad internacional de actividad (UI), como la cantidad de enzima que cataliza la transformación de un micromol de sustrato por minuto, en condiciones ambientales definidas, tales como son: concentración de sustrato saturante, pH y temperatura óptima.

El proceso de extracción de la inulinasa, además de determinar el rendimiento y si la enzima e extracelular o intracelular, determina otras características como su peso molecular (MW), su modo de acción sobre la molécula de inulina, su actividad hidrolítica sobre la sacarosa, respuesta a los cambios de pH y temperatura, propiedades cinéticas, efecto de la concentración de sustrato, etc.

Se ha determinado que las inulinasas pueden ejercer dos modos de acción diferentes sobre la molécula de inulina, una acción extrema y una acción interna, correspondiendo dos clases de inulinasas llamadas exo-inulinasas y endo-inulinasas respectivamente. Las exo inulinasa (74 kDa, pH 5.1 – 7.0) empiezan con la separación de la primera molécula de D – fructosa y va hasta el último enlace para liberar glucosa y la endo-inulinasa (64 kDa) actúa sobre enlaces internos y rinde un conjunto de inulo-oligosacaridos. Estas propiedades dependen del origen microbiano de la enzima. La mejor cepa será la que tenga ambas propiedades, como es el caso del *A. ficuum*. Por otra parte se ha probado que la inulinasas también ejerce actividad catalítica sobre la sacarosa, desdoblándola en glucosa y fructosa, es decir tienen actividad de invertasa. Se afirma que la actividad invertasa es más alta en enzimas producidas por levaduras que en aquellas obtenidas a partir de mohos.

Notoriamente una actividad invertasa de inulinasa es deseable. Estos investigadores postularon que las inulinasas son deseables. Estos investigadores postularon a que las inulinasas poseen sitios catalíticos comunes, pero diferentes sitios de enlaces para hidrolisis de inulina y sacarosa (Castillo, 2009).

2.5 Actividad de la inulinasa

La actividad y estabilidad depende de la respuesta de la enzima a cambios de valores de temperatura y pH. Los valores de temperatura y pH dependen del tipo de microorganismo usado como fuente, generalmente se da valores más altos para bacterias y levaduras que en mohos.

La relación entre el pH y la actividad depende del comportamiento acido-base del enzima y del propio sustrato. Sustrato y enzima (centro actividad) pueden contener grupos funcionales ácidos y básicos, siendo su grado d disociación dependiente del pH, lo que determinará, entre otros aspectos, la conformación de proteína, la capacidad de unión del sustrato a centro activo de la enzima (K) y la capacidad de transformación del sustrato (k). Los estudios cinéticos a diferentes valores de pH proporcionan información sobre el mecanismo catalítico de las enzimas y la naturaleza de los aminoácidos más directamente implicados en la catálisis. El valor de pH al cual la actividad es máxima se denomina pH óptimo y este no tiene por qué coincidir con el pH intracelular.

El efecto de la temperatura sobre actividad enzimática se modela muy bien con la ecuación de Arrhenius la que está dada por la energía de activación y por el nivel de la temperatura.

III. MATERIALES Y METODOS

3.1 Lugar de Ejecución

El presente trabajo de investigación se realizó en los siguientes ambientales:

- Laboratorios de Bioprocesos y Química Orgánica de la Escuela de Agroindustria – Universidad Nacional del Santa.
- Laboratorio de Análisis y Composición de Productos Agroindustriales de la Escuela de Agroindustria – Universidad Nacional del Santa.
- Laboratorio de Investigación y desarrollo de productos agroindustriales de la Escuela de Agroindustria – Universidad Nacional del Santa.

3.2 Materiales y Equipos

3.2.1 Materia Prima

Para la experimentación se utilizó Alcachofa (*Cynara Scolymus*) será obtenido de la ciudad de Tarma, Provincia de Tarma, Departamento Junín.

3.2.2 Materiales

- Algodón,
- Cajas de fósforos
- Campanas desecadoras.
- Crisol

- Espátulas,
- Fiola marca Pirex de 10, 50, 100 mL.
- Gasas
- Gradilla de tubos
- Guantes
- Matraces marca Pirex de 50, 125, 250, 500 y 1000 mL.
- Mechero
- Papel aluminio
- Pera succionadora
- Pipetas de 1, 2, 5, 10 mL.
- Pipeteros
- Placas Petri.
- Probetas marca Pirex de 50, 100 mL.
- Tapaboca
- Tubos de ensayo de 150*15 mm.
- Tubos tapa rosca
- Vasos de 50, 100, 250 y 500 mL.

3.2.3 Reactivos

- Acido 3-5 dinitrosalicilico (DNS). Fabricante: Sigma Chemical. Peso neto: 25 gramos (Alemania)
- Ácido cítrico monohidratado ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$). Fabricante: Sigma Chemical. Peso neto: 500 gramos (Alemania)
- Agar Agar. Fabricante: Sigma Chemical. Peso neto: 50 gramos.
- Agua destilada.
- Azul de coomassie G-250 ($C_{47}H_{49}N_3NaO_7S_2$). Fabricante: Merck. Peso neto: 25 gramos (Alemania).
- Dihidrogenofosfato de potasio (KH_2PO_4). Fabricante: Merck. Peso neto: 250 gramos (Alemania).
- Extracto de levadura granulado, fabricante: Merck, peso neto: 500 gramos (Alemania).
- Fosfato de sodio dibasico ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$), fabricante: Merck, peso neto: 250 gramos (Alemania).
- Glucosa ($C_6H_{12}O_6$), fabricante: Loca Chemie, peso neto: 500 gramos (India).
- Inulina dalia, fabricante: Sigma Chemical, peso neto: 5 gramos (Alemania).
- Peptona bacteriologica Z, fabricante: Biocen, peso neto 500 gramos (Cuba).

- Sacarosa ($C_2H_{22}O_{11}$), fabricante: Loba Chemie, peso neto: 1 Kgr (India).
- Sulfato de amonio granulado ($(NH_4)_2SO_4$), fabricante: Mallinckrodt, peso neto: 1 kgr (Francia).
- Sulfato de magnesio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), fabricante: Sigma Chemical, peso neto: 500 gramos (Alemania).

3.2.4 Equipos e Instrumentos

- Agitador de tubos Maxi Mix. Marca: Thermolyne. Modelo: N° M-37615.
- Agitador orbital Shaker. Marca: Lab Line. Modelo 4628-1
- Balanza analítica. Marca: Precisa Gravimetrics AG. Modelo: LX 320.
- Centrifuga. Marca: Sartorius AG. Model: Sigma 2 -16 pk.
- Cocina a gas. Marca: Kero. Modelo 102.
- Destilador, marca VELT SCIENTIFICA, modelo UDK126A, Alemania.
- Equipo de Baño maria. Marca: Biotron. Modelo: Electronic Thermostat Btr-65.
- Espectrofotómetro UV-VIS-NIR. Marca: Unico. Modelo: 2800E.
- Estufa. Marca P - Selecta. Modelo: 209.
- Incubadora. Marca: P – Selecta. Modelo: 206.
- Licuadora. Marca: Oster clásica. Modelo: 450 – 2.

- Micro pipetas de 200 – 1000 μ l. Marca: Brand. Modelo: Tranferpette®.
- Olla a presión. Marca: Record. Capacidad: 7.5 litros.
- pH-metro. Marca: Record. Capacidad: 7.5 litros.
- Refractómetro de marca RUDOLF RESEARCH ANALYTICAL.
- Refrigerado. Marca: Phillips. Volumen 12 pies³.

3.3 Metodología de estudio

3.3.1 Descripción del proceso

3.3.1.1 Preparaciones del extracto de Alcachofa

a. Recepción de la materia prima

Se trabajó con las brácteas de la alcachofa (*Cynara Scolymus*).

b. Selección

Esta operación se realizó con el fin de eliminar brácteas que presenten cualquier tipo de daño físico o microbiológico.

c. Lavado

Las brácteas fueron lavadas con agua potable para eliminar residuos de tierra y otras impurezas y sobre todo evitar contaminaciones posteriores.

d. Sanitizado

Se realizó para desinfectar las brácteas, consistirá en 40 ml de cloro en 10 litros de agua, durante 10 minutos.

e. Escaldado

Las brácteas fueron escaldadas a 80°C en un tiempo de 15 minutos para facilitar la siguiente operación.

f. Extractor

En este proceso paso por una extractora los trozos pequeños de alcachofa.

g. Filtrado

La filtración se realizó con tela de muselina, con esta operación se conseguirá separar de manera apropiada y completa los componentes solubles de los insolubles (torta).

h. Centrifugado

En este proceso se realizó para separar el líquido del sólido para evitar la aparición de geles.

i. Envasado

Se procedió a envasar en caliente en diferentes envases de 500 mL.

j. Esterilizado

El extracto se ajustó a un pH de 4 para esterilizar a una temperatura de 121°C por un periodo de 20 minutos y luego se enfrió.

k. Almacenamiento

Se almaceno en refrigeración a 5°C.

3.3.1.2 Microorganismo

Se utilizó una cepa *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y – 7571 provista por United States Departament Agriculture Research Service. Se mantuvo en tubos de agar inclinado a 5°C con resiembras en incubadora por 48 horas.

3.3.1.3 Medios de cultivo

Se realizara cultivos en matraces para la producción de caldo bruto de inulinasa desde medios definidos por fermentación de *Kluyveromyces marxianus*, tal como se describe en la Tabla N°06.

Tabla 06: Composición de medios para la fermentación de *Kluyveromyces marxianus*

| Medio | Nutriente | Concentración (g/l) |
|----------------------|---|---------------------|
| Solido de mantención | Extracto de levadura | 3 |
| | Peptona | 5 |
| | Glucosa | 10 |
| | Agar | 20 |
| | Extracto de Malta | 3 |
| Activación | Sacarosa | 10 |
| | Extracto de levadura | 3.0 |
| | Peptona | 5.0 |
| | MgSO ₄ .7H ₂ O | 0.65 |
| | pH 6.0 | |
| Fermentación | Extracto de alcachofa | (20 – 50)% v/v |
| | Extracto de levadura | 10.0 |
| | KH ₂ PO ₄ | 1.0 |
| | (NH ₄) ₂ SO ₄ | 5.0 |
| | MgSO ₄ .7H ₂ O | 0.386 |
| | pH 4.0 | |

Fuente: Castillo, A.

3.3.1.4 Cultivo en matraces de *Kluyveromyces marxianus*

Se preparó suficiente inóculo inicial en 2 matraces Erlenmeyer de 125 ml conteniendo cada uno 50 ml de medio de activación celular. El medio se inóculo con una azada de células mantenidas

en un agar inclinado, previamente activada, se dejó cultivar en un shaker a 180 rpm durante 10 horas en la incubadora a 30°C.

La cinética se realizó en matraces Erlenmeyer de 500 ml conteniendo 100 ml de medio de fermentación incluyendo el 5.0% (v/v) de inóculo, incubados a 30°C, pH inicial 4.0 y agitados en shaker, variando concentraciones de extracto y aireación por 30 horas.

3.3.1.5 Producción del caldo crudo enzimático

Se realizó por la centrifugación del caldo, el cual será el producto de la fermentación del extracto de alcachofa, donde se tuvo por resultado la separación de las células, para así obtener un sobrenadante. Luego fue guardado en la refrigeradora, para su posterior uso en la investigación.

3.3.1.6 Optimización de la concentración de sustrato y aireación del medio de fermentación.

Se optimizó los valores de concentración y aireación sobre el medio de fermentación para determinar la actividad de la inulinasa para los respectivos sustratos (sacarosa e inulina), para ello la concentración de Alcachofa estuvo en un rango de 20 – 50 % (v/v), fermentando en un rango de aireación de 150 a 200 rpm.

3.3.1.7 Determinación de la actividad enzimática.

Se realizara a diferentes diluciones del extracto bruto enzimático. Se graficara la concentración de producto con el tiempo de reacción y se expresara correctamente los valores de las actividades volumétricas y específicas.

Una unidad de actividad de inulinasa (U) definida como la cantidad de enzima que libera 1 micromol de azucares reductores por minuto.

La actividad volumétrica (U/ml), como actividad enzimática por ml de extracto crudo enzimático.

La actividad enzimática (U/mg), como actividad enzimática por mg de extracto crudo enzimático.

3.3.2 Métodos de análisis

3.3.2.1 Alcachofa

3.3.2.1.1 Análisis químico proximal

a. Humedad

La humedad se determinó por la Norma Técnica ITINTEC 205.037 (1974), denominado "Método de desecación por estufa".

b. Proteína

Se determinó el contenido de Proteínas por la NTP ISO 5983 – Primera Edición 2002; y Met. AOAC 984.23, 1995 Edición 16.

c. Cenizas

Para la determinación del porcentaje de cenizas, es decir, el porcentaje de sólidos y minerales en el producto, se puede seguir el procedimiento establecido por la norma técnica ITINTEC 205.038 (1974), llamado “Método De Incineración”.

d. Grasa

Método de Soxhelet, AOAC (1989)

e. Fibra cruda

Método AOAC (1950)

f. Carbohidratos totales

Se determina por diferencia $Ct=100\% - (\text{Humedad} + \text{Proteínas} + \text{grasas} + \text{fibra})$

3.3.2.2 Extracto de Alcachofa

3.3.2.2.1 Determinación de pH

Se determinó por el método potenciómetro recomendado por la AOAC (1995)

3.3.2.2.2 Determinación de acidez

Se realizó mediante titulación potenciométrica por el Método AOAC (1995).

3.3.2.2.3 Determinación de °Brix

Se determinó mediante método refractométrico recomendado por AOAC, 1995.

3.3.2.2.4 Determinación de azúcares reductores

Se cuantificó los azúcares reductores totales por el método DNS (Miller, 1972)

3.3.2.3 Caldo crudo enzimático

3.3.2.3.1 Actividad enzimática

La actividad enzimática (U/ml) se determina midiendo la velocidad inicial de la producción de azúcar en condiciones controladas.

3.3.2.3.2 Determinación de azúcares reductores mediante el método de DNS (Ácido Dinitrosalicílico)

Se cuantificó los azúcares reductores totales por el método DNS (Miller, 1972).

3.3.3 Diseño Experimental

3.3.3.1 Metodología de Superficie de Respuesta (MSR)

Con el fin de encontrar los valores óptimos de aireación (rpm) y concentración de extracto (v/v) en la actividad de la inulinasa soluble de *Kluyveromyces marxianus* fermentado en extracto

de alcachofa se utilizó la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) (Rodríguez y Lemma, 2005).

3.3.3.2 Diseño Central Compuesto Rotacional (DCCR)

Se realizó un diseño compuesto central rotacional (DCCR) con $4(2K)$ puntos exponenciales + $4(2K)$ puntos axiales y 2 repeticiones en el punto central, lo que nos dio un número total de 9 ensayos realizados, donde $k=2$ es el número de variables independientes (sacarosa e inulina).

Se utilizó el valor α (puntos axiales) según el número de variables, como se muestra en la tabla y los valores codificados en la Tabla 07.

Tabla 07: Valores α según el número de variables

| | | | | | |
|------------------------------|------|------|------|------|------|
| α | 1.41 | 1.68 | 2.00 | 2.38 | 2.83 |
| Variables independientes (k) | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |

Dónde:

$$\alpha = (2^k)^{1/4}$$

Tabla 08: Diseño codificado para la optimización de la concentración de extracto y aireación.

| Concentración (v/v) | Aireación (rpm) | Actividad enzimática en $\Theta=30$ horas (U/MI) |
|------------------------|--------------------|---|
| -1 | -1 | |
| +1 | -1 | |
| -1 | +1 | |
| +1 | +1 | |
| 0 | -1.41 | |
| 0 | +1.41 | |
| -1.41 | 0 | |
| +1.41 | 0 | |
| 0 | 0 | |
| 0 | 0 | |
| 0 | 0 | |

Fuente: Rodríguez y Lemma (2005)

Variables independientes

X1 = Concentración = (20 – 50) % v/v

X2 = Aireación = (150 – 200) rpm

Variables respuesta

Y1= Actividad Volumétrica sobre Sacarosa (UI/ml)

Y2= Actividad volumétrica sobre Inulina (UI/ml)

En el trabajo de investigación se consideraran 2 variables independientes, haciendo un total de 2^2 incluido 4 puntos axiales y 2 repeticiones. En la tabla se muestran los valores que se utilizaron en el planeamiento. Los valores que se utilizaron en el planeamiento. Los valores en los niveles de los puntos axiales (-1.41 y +1.41) y el punto central fueron determinados tomando como antecedentes de las investigaciones, del diseño compuesto central rotacional. Los valores en los -1 y +1 fueron determinados por interpolación (Rodriguez y Lemma, 2005).

Tabla 09: Valores de las variables independientes DCCR.

| Variable | -1.41 | -1 | 0 | +1 | +1.41 |
|---|-------|-----|-----|-----|-------|
| (X ₁) Concentración de extracto | 13 | 20 | 35 | 50 | 56 |
| (X ₂) Aireación | 139 | 150 | 175 | 200 | 210 |

Los valores codificados en la Tabla 10, fueron utilizados en la matriz de simbolización de resultados mostrado en la Tabla 11. Se experimentó un total de 11 unidades experimentales; en cada una se obtuvo como respuesta la actividad volumétrica (U/ml) para los sustratos sacarosa e inulina.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Extracto de Alcachofa

Se obtuvo 870 mL de extracto de 7,5 kilogramos de brácteas de Alcachofa. Se dejó enfriar, se envaso en un matraz de vidrio y se guardó en refrigeración. En los tejidos de la unión de las brácteas con el corazón se concentra la mayor parte de componentes responsables del pardeamiento, por eso durante las operaciones de corte los tejidos provoca la descompartimentación celular, lo que permite la entrada en contacto de enzimas (polifenoloxidasas) de localización citoplasmática con sustratos (fenoles) de localización vacuolar. La polifenoloxidasa (PPO) cataliza la oxidación de fenoles a quinonas en un proceso conocido como oxidación enzimática.

En la Alcachofa, el pardeamiento se activa a los pocos segundos de haber separado las brácteas con el corazón para poder obtener el jugo. El color original del borde cambia rápidamente en solo 20 a 35 segundos y de modo irreversible, a un color veré muy oscuro. (Manrique et al., 2005).

El extracto se utiliza para un medio de fermentación ya que la Alcachofa es fuente de inulina. Puesto que la inulina es el componente base de un sustrato empleado como fuente de carbono para la producción microbiana de inulinasa, sea como inulina pura o como extracto de vegetales.

Figura 04: Alcachofa.



Tabla 10: Composición química proximal de las brácteas de Alcachofa.

| Componente | Contenido |
|----------------------|------------------|
| Humedad | 80.91% |
| Proteína | 1.9% |
| Fibra cruda | |
| Grasa | 6% |
| Carbohidratos | |
| Ceniza | 0.67% |

Figura 05: Extracto de brácteas de alcachofa.

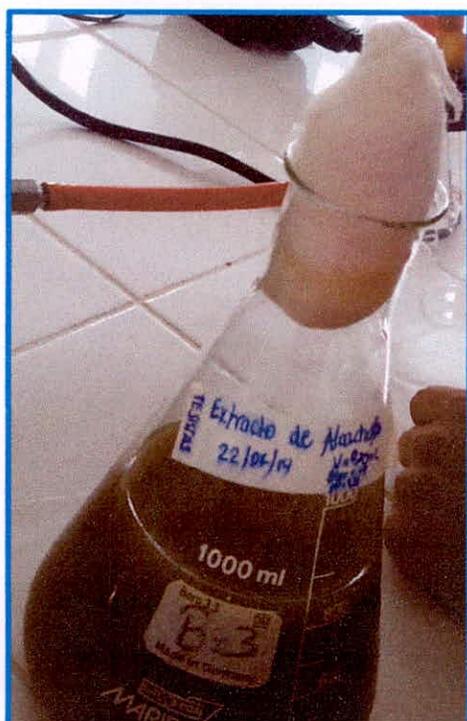


Tabla 11: Caracterización del extracto de brácteas de Alcachofa.

| Compuesto | Contenido |
|---------------------|-----------|
| Azúcares Reductores | 1.5 gr |
| Glucosa | |
| °Brix | 6.07 |
| Acidez | 0.024 % |
| pH | 4.59 |

Fuente: Elaboración propia

4.2 Pruebas preliminares: curva de crecimiento y producción de inulinasa

Se realizó para obtener el tiempo de fermentación y poder ser empleadas en las fermentaciones establecidas de la investigación.

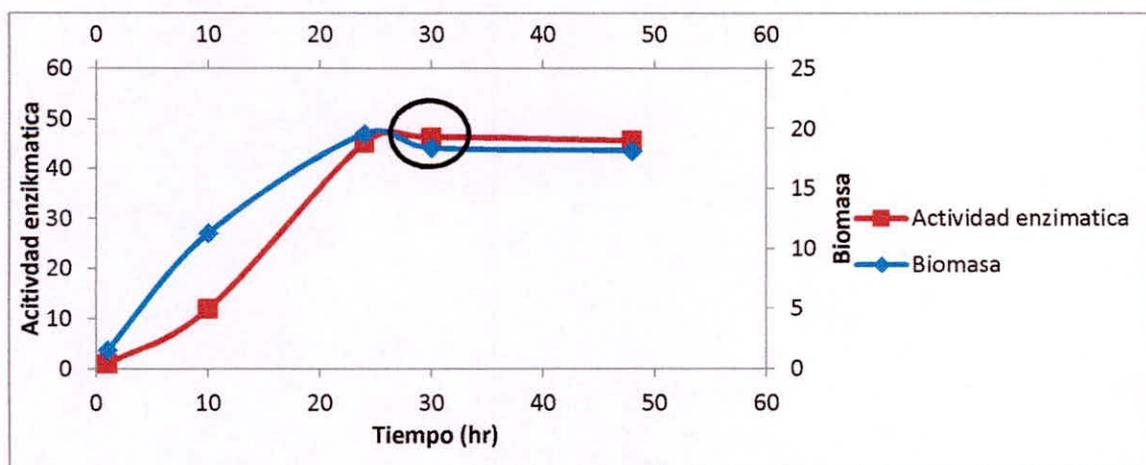
Medio de cultivo:

Tabla 12: Composición de medios para la fermentación de *Kluyveromyces marxianus*

| Medio | Nutriente | Concentración (g/l) |
|----------------------|---|---------------------|
| Sólido de mantención | Extracto de levadura | 3 |
| | Peptona | 5 |
| | Glucosa | 10 |
| | Agar | 20 |
| | Extracto de Malta | 3 |
| Activación | Sacarosa | 10 |
| | Extracto de levadura | 3.0 |
| | Peptona | 5.0 |
| | MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0.65 |
| | pH = 6.0 | |
| Fermentación | Extracto de alcachofa | 30% v/v |
| | Extracto de levadura | 10.0 |
| | KH ₂ PO ₄ | 1.0 |
| | (NH ₄) ₂ SO ₄ | 5.0 |
| | MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0.386 |
| | pH = 4.0 | |
| | N = 150 rpm | |

Los resultados de la producción de biomasa expresa en peso seco de células (g/l) y producción de inulinasa (U/ml) se presentan en la Gráfica01. Se observa que la biosíntesis y secreción de la inulinasa ocurre durante el crecimiento, por lo tanto la naturaleza y concentración de la fuente de carbono, así como demás factores que afectan el crecimiento tienen influencia en la producción de enzima. La producción de inulinasa esta retasada con relación a la fase de crecimiento; ya que a partir de cierta producción de biomasa empieza a ascender y alcanza el máximo valor cuando la célula se encuentra en fase estacionaria. Esto demuestra que la inulinasa es un metabolito secundario, pues son se produce por las vías de metabolismo que proporciona a la celular energía para efectuar su síntesis y reproducirse (Scriban, 1985).

Grafica 01: Producción de biomasa e inulinasa durante la fermentación.



4.3 Producción de caldo crudo enzimático de inulinasa a partir de un cultivo en matraces de *K. marxianus*.

El caldo crudo enzimático se obtiene en cada nivel de fermentación (diferentes concentraciones de extracto a una misma aireación) y es envasado en viales con tapa de jebes envuelto con papel film y refrigerado en total asepsia para su análisis posterior. Se realizaron 2 repeticiones en las fermentaciones.

- FERMENTACION I

Condiciones:

Θ = 30 horas ; N = 175 rpm ; pH = 4 ; Conc. de extrac. = 13% v/v



**Figura 06: Caldo crudo enzimático de la fermentación I.
N = 175 rpm ; pH = 4 ; Conc. de extrac. = 13% v/v**

Condiciones: Θ = 30 horas ; N = 175 rpm ; pH = 4 ; Conc. de extrac. = 35% v/v



**Figura 07: Caldo crudo enzimático de la fermentación I.
N = 175 rpm ; pH = 4 ; Conc. de extrac. = 35% v/v**

Condiciones: $\Theta = 30$ horas ; $N = 175$ rpm ; $\text{pH} = 4$; Conc. de extrac. = 56% v/v



Figura 08: Caldo crudo enzimático de la fermentación I.
 $N = 175$ rpm ; $\text{pH} = 4$; Conc. de extrac. = 56% v/v

- FERMENTACION II

Condiciones: $\Theta = 30$ horas ; $N = 150$ rpm ; $\text{pH} = 4$; Conc. de extrac. = 20% v/v

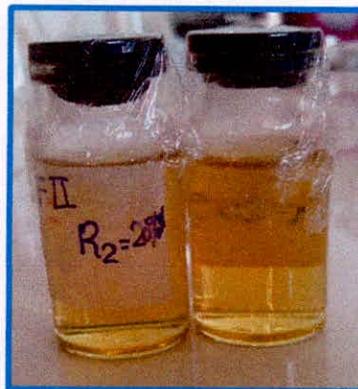


Figura 09: Caldo crudo enzimático de la fermentación II.
 $N = 150$ rpm ; $\text{pH} = 4$; Conc. de extrac. = 20% v/v

Condiciones: $\Theta = 30$ horas ; $N = 150$ rpm ; $\text{pH} = 4$; Conc. de extrac. = 50% v/v



Figura 10: Caldo crudo enzimático de la fermentación I.
 $N = 150$ rpm ; $\text{pH} = 4$; Conc. de extrac. = 50% v/v

- FERMENTACION III

Condiciones: $\Theta = 30$ horas ; $N = 200$ rpm ; $\text{pH} = 4$; Conc. de extrac. = 20% v/v



Figura 11: Caldo crudo enzimático de la fermentación III.
 $N = 200$ rpm ; $\text{pH} = 4$; Conc. de extrac. = 20% v/v

Condiciones: $\Theta = 30$ horas ; $N = 200$ rpm ; $\text{pH} = 4$; Conc. de extrac. = 50% v/v



**Figura 12: Caldo crudo enzimático de la fermentación III.
 $N = 200$ rpm ; $\text{pH} = 4$; Conc. de extrac. = 50% v/v**

- FERMENTACION IV

Condiciones: $\Theta = 30$ horas ; $N = 139$ rpm ; $\text{pH} = 4$; Conc. de extrac. = 35% v/v



**Figura 13: Caldo crudo enzimático de la fermentación I.
 $N = 139$ rpm ; $\text{pH} = 4$; Conc. de extrac. = 35% v/v**

- FERMENTACION V

Condiciones: Θ = 30 horas ; N = 210 rpm ; pH = 4 ; Conc. de extrac. = 35% v/v



**Figura 14: Caldo crudo enzimático de la fermentación I.
N = 210 rpm ; pH = 4 ; Conc. de extrac. = 35% v/v**

4.4 Optimización de la aireación y concentración de extracto en el medio de fermentación para determinar la actividad.

4.4.1 Actividad Volumétrica de la Inulinasa sobre sacarosa.

Tabla 13: Actividad Volumétrica de la Inulinasa sobre Sacarosa.

| Ensayos | Concentración de extracto | Aireación | Actividad Volumétrica (U/ml) |
|---------|---------------------------|-----------|------------------------------|
| 1 | -1 | -1 | 29 |
| 2 | +1 | -1 | 72 |
| 3 | -1 | +1 | 41 |
| 4 | +1 | +1 | 63 |
| 5 | 0 | -1.41 | 76 |
| 6 | 0 | +1.41 | 80 |
| 7 | -1.41 | 0 | 37 |
| 8 | +1.41 | 0 | 82 |
| 9 | 0 | 0 | 81 |
| 10 | 0 | 0 | 92 |
| 11 | 0 | 0 | 80 |

Tabla 14. Análisis de varianza para la Actividad Volumétrica sobre la Sacarosa.

| Fuente | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|-----------------------------|-------------------|----|----------------|---------|---------|
| A:Concentracion de extracto | 2068.52 | 1 | 2068.52 | 14.85 | 0.0120 |
| B:Aireacion | 9.36761 | 1 | 9.36761 | 0.07 | 0.8057 |
| AA | 1624.01 | 1 | 1624.01 | 11.66 | 0.0189 |
| AB | 110.25 | 1 | 110.25 | 0.79 | 0.4143 |
| BB | 335.55 | 1 | 335.55 | 2.41 | 0.1813 |
| Error total | 696.27 | 5 | 139.254 | | |
| Total (corr.) | 4554.18 | 10 | | | |

R-cuadrada = 84.7114%

Al evaluar nuestros resultados obtenidos de análisis de varianza, en la Tabla 14, para la actividad enzimática de inulinasa actuando sobre sacarosa (U/ml), observamos que los valores de “p” menores de 0.05 ($p < 0.05$) son significativos. En este caso, 2 efectos tienen un valor-P menor que 0.05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95.0%.; por tanto podemos decir que es altamente significativo la variable en estudio para la actividad enzimática de inulinasa actuando sobre sacarosa.

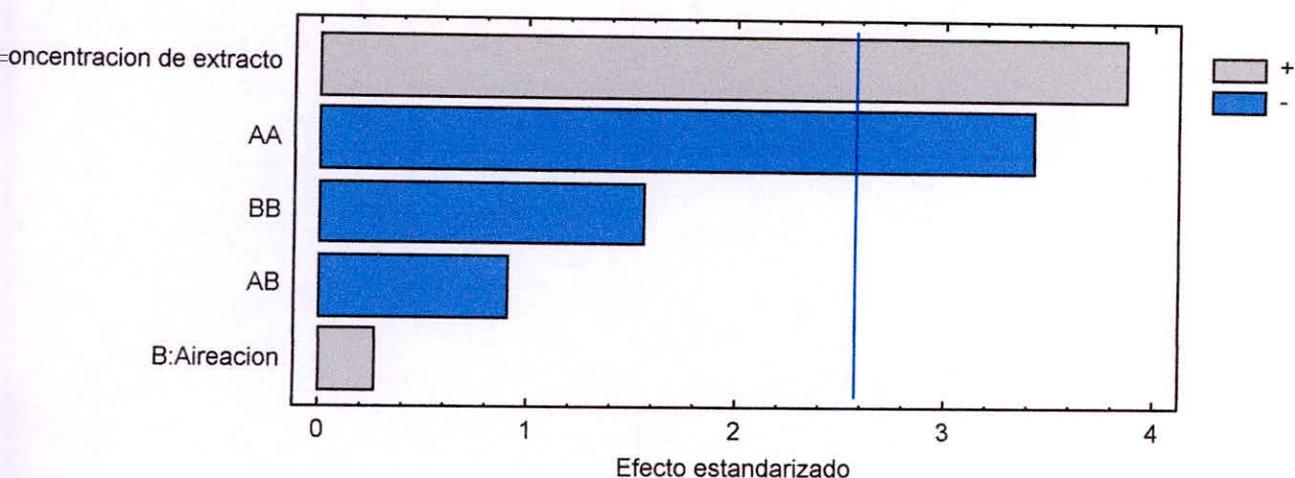
El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo, así justado, explica 84.7114% de la variabilidad en Actividad enzimática sacarosa. El estadístico R-cuadrada ajustada, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de

variables independientes, es 69.4228%. El error estándar del estimado muestra que la desviación estándar de los residuos es 11.8006. El error medio absoluto (MAE) de 769692 es el valor promedio de los residuos. El estadístico de Durbin-Watson (DW) prueba los residuos para determinar si haya alguna correlación significativa basada en el orden en que se presentan los datos en el archivo. Puesto que el valor-P es mayor que 5.0%, no hay indicación de autocorrelación serial en los residuos con un nivel de significancia del 5.0%.

Tabla 15. Efectos estimados para Actividad Volumétrica sobre la Sacarosa (UI/ml).

| Efecto | Estimado | Error Estd. | V.I.F. |
|-----------------------------|-----------------|--------------------|---------------|
| Promedio | 84.6668 | 6.81307 | |
| A:Concentracion de extracto | 32.1599 | 8.34428 | 1.0 |
| B:Aireacion | 2.16422 | 8.34432 | 1.0 |
| AA | -33.9167 | 9.93167 | 1.09469 |
| AB | -10.5 | 11.8006 | 1.0 |
| BB | -15.4171 | 9.93182 | 1.09469 |

Grafica 02. Diagrama de Pareto Estandarizada para Actividad Volumétrica sobre la Sacarosa (UI/ml).



Según graficas 02 y 03, muestra claramente que, la concentración de extracto lineal, afecta de manera significativa la actividad enzimática (U/ml) de inulinasa actuando sobre sacarosa; como lo reporta Cazetta, et al. (2005) debido a que la inulinasa tiene una actividad de invertasa y no de inulinasa; puesto que Las enzimas que hidrolizan los enlaces del tipo β -fructosídico ha sido clasificadas en dos tipos: invertasas (β -D-fructo-furanósido fructohidrolasas EC.3.2.1.26), que hidrolizan la sacarosa a glucosa y fructosa; e inulinasas (2- β -D-fructan fructohidrolasas EC.3.2.1.7), las cuales actúan principalmente sobre polímeros de fructosa, pero también presentan actividad sobre la sacarosa. Ambas clases de enzimas presentan un alto contenido de carbohidratos, es decir, son glicoproteínas.

Es importante aclarar que el signo que presentan los coeficientes determina la forma como la variable influye en el sistema y da una idea de la dirección a seguir en los experimentos para ubicar el óptimo. Un signo positivo para una variable determinada, indica que el incremento de la concentración de extracto en su forma lineal puede aumentar la actividad enzimática de la inulinasa; del mismo modo el signo negativa indica su disminución.

Grafica 03. Grafica de Efectos Principales para Actividad Volumétrica sobre la Sacarosa (UI/ml).

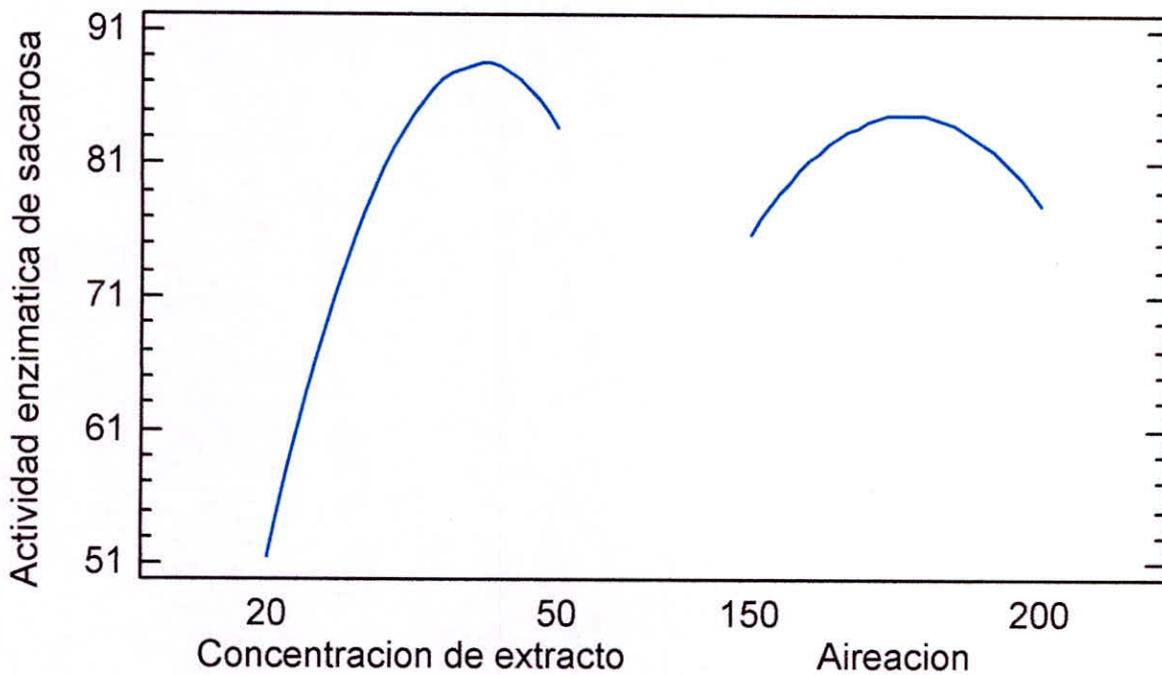


Tabla 16. Coeficiente de regresión para Actividad Volumétrica sobre la Sacarosa (U/ml).

| Coeficiente | Estimado |
|-----------------------------|-----------------|
| constante | -516.226 |
| A:Concentracion de extracto | 8.79792 |
| B:Aireacion | 4.85008 |
| AA | -0.0753704 |
| AB | -0.014 |
| BB | -0.0123337 |

La ecuación del modelo ajustado según Tabla 15:

$$\text{Actividad Volumétrica sobre Sacarosa} = -516.226 + 4.85008*B + 8.79792*A - 0.0123337*B^2 - 0.014*A*B - 0.0753704*A^2$$

Dónde:

A = Concentración de extracto (%)

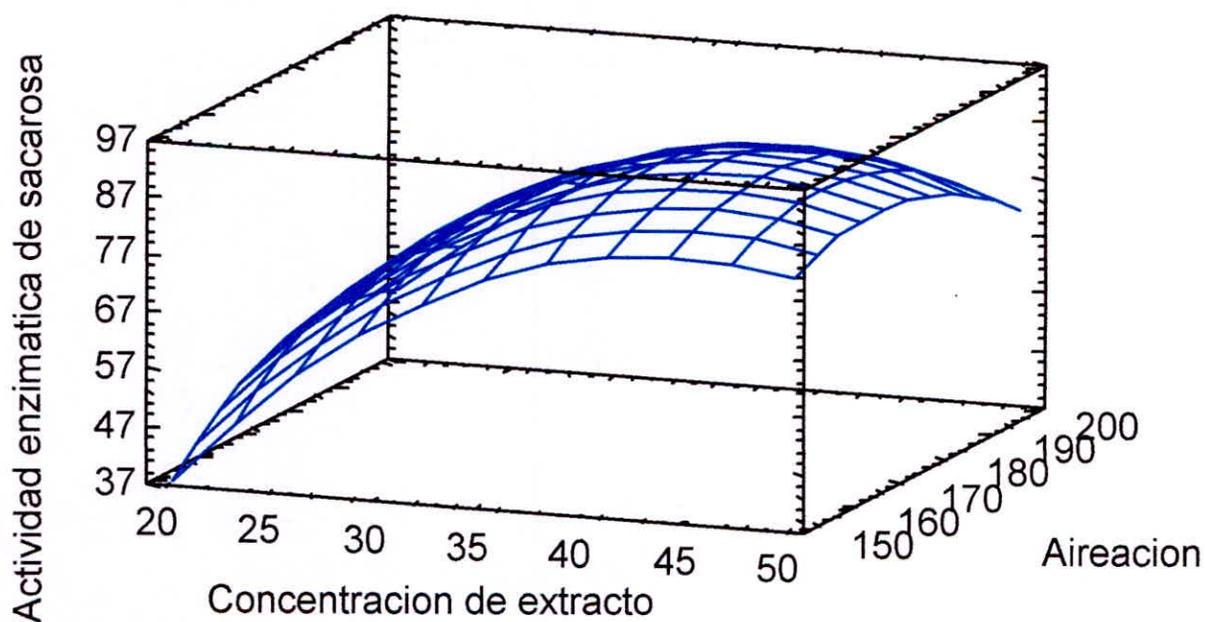
B = Aireación (rpm)

De la función que describe el modelo se segundo orden se calculó el punto estacionario de manera teórica (por el programa), derivando esta ecuación. Las coordenadas de este punto obtenidas por este método, se sustituyeron en la ecuación general para calcular la cantidad de actividad enzimática de inulinasa actuando sobre sacarosa en las condiciones del punto óptimo.

Tabla 17. Resultados Estimado para Actividad Enzimática sobre la Sacarosa (U/ml).

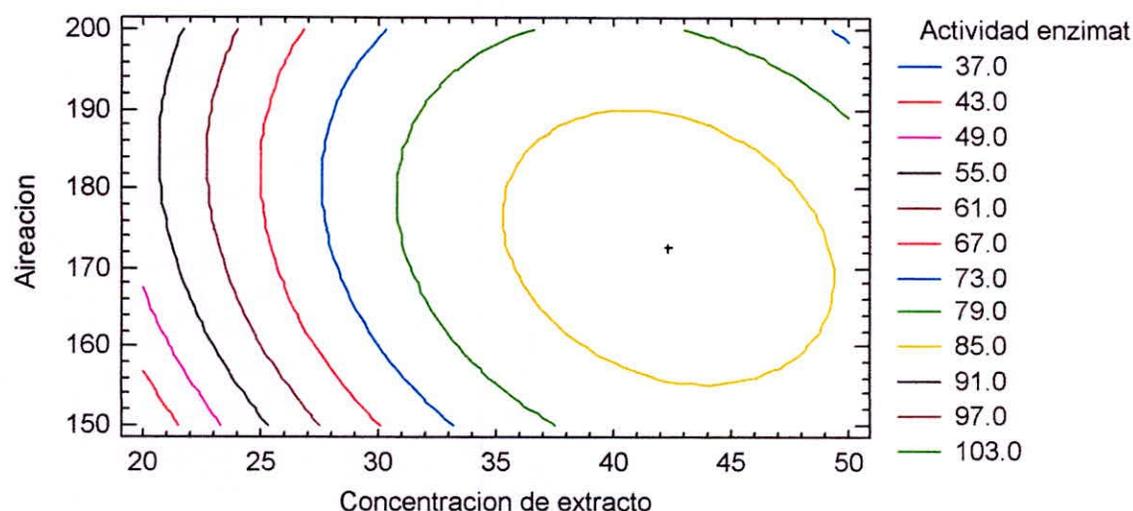
| | Observados | Ajustados |
|-------------|-------------------|------------------|
| Fila | Valores | Valores |
| 1 | 82.0 | 84.6668 |
| 2 | 80.0 | 84.6668 |
| 3 | 92.0 | 84.6668 |
| 4 | 37.0 | 28.0096 |
| 5 | 82.0 | 73.4906 |
| 6 | 41.0 | 50.252 |
| 7 | 29.0 | 37.5878 |
| 8 | 80.0 | 70.7803 |
| 9 | 72.0 | 80.2477 |
| 10 | 63.0 | 71.9119 |
| 11 | 76.0 | 67.7196 |

Grafica 04. Superficie de Respuesta Estimada para Actividad Volumétrica sobre la Sacarosa (UI/ml): Interactuando Aireación y Concentración de extracto.



Analizando la gráfica 05 se observa que a una concentración de extracto de 35% v/v y aireación de 175 rpm favorece la actividad enzimática, mostrándose la existencia de un máximo local en la misma. Si nos alejamos de este punto, aumentando o disminuyendo los valores de concentración de extracto o aireación, el valor esperado decrece. Por tanto para alcanzar la actividad enzimática óptima en el proceso de la producción que estamos considerando, debemos trabajar con los valores de concentración de extracto y aireación que nos indica el punto óptimo.

Gráfica 06. Contornos de la Superficie de Respuesta Estimada para Actividad Volumétrica sobre la Sacarosa (UI/ml): Interactuando Aireación y Concentración de extracto.



Se puede observar y verificar en la gráfica 06, donde interacciona la concentración de extracto (%v/v) y aireación (rpm), la existencia de una región óptima que nos da la mayor actividad enzimática en donde se encuentra una serie de combinaciones de concentraciones de extracto

(40 a 45)% v/v y de aireación (155 -190) rpm. Estos valores que nos muestra la superficie de respuesta de una banda óptima, y además un valor puntual óptimo, nos indica sobre la robustez de la evaluación. Estos valores puntuales, son los valores críticos obtenidos del grafico de superficie de respuesta, para la concentración de extracto 42.416% v/v y aireación de 172.488 rpm; obteniéndose una mayor actividad enzimática de inulinasa actuando sobre sacarosa.

Tabla 18. Valores críticos resultados de la optimización de los parámetros de concentración de extracto y aireación.

| FACTOR | BAJO | ALTO | OPTIMO |
|---------------------------|------|------|---------|
| Concentración de extracto | 13 | 56 | 42.416 |
| Aireación | 139 | 210 | 172.488 |

Una vez obtenido el modelo matemático se procedió hallar las condiciones óptimas aplicando la primera derivada e igualando a cero:

$\frac{\partial y}{\partial x_1} = 8.79792 - 0.1507408X_1 - 0.014X_2$; para la concentración de extracto.

$\frac{\partial y}{\partial x_2} = 4.85008 - 0.0246674X_2 - 0.014X_1$; para la aireación.

Las condiciones que maximicen la variable respuesta se presentan en la tabla 17, obteniendo un máximo de actividad enzimática de 88.2549 U/ml.

El efecto de la concentración de la fuente de carbono sobre la producción de inulinasas afecta la velocidad de crecimiento y su producción. Se ha dicho que las concentraciones altas de la fuente de carbono causan represión catabólica con especies de *Kluyveromyces* por lo que se utilizaron el intervalo de (20 -50) % v/v.

Se ha demostrado que el tipo de sustrato tiene cierto efecto sobre la naturaleza extracelular o intracelular de la enzima, pero esta propiedad depende principalmente de la clase de microorganismo empleando, particularmente, la mayoría de hongos produce enzima extracelular, mientras que las levaduras producen ambas, en el caldo de cultivo y dentro de la pared celular.

4.4.2 Actividad Volumétrica de la Inulinasa sobre inulina.

Tabla 19: Actividad Volumétrica de la Inulinasa sobre Inulina.

| Ensayos | Concentración de extracto | Aireación | Actividad Volumétrica Real (U/ml) |
|---------|---------------------------|-----------|-----------------------------------|
| 1 | -1 | -1 | 5 |
| 2 | +1 | -1 | 12 |
| 3 | -1 | +1 | 10 |
| 4 | +1 | +1 | 15 |
| 5 | 0 | -1.41 | 8 |
| 6 | 0 | +1.41 | 9 |
| 7 | -1.41 | 0 | 2 |
| 8 | +1.41 | 0 | 16 |
| 9 | 0 | 0 | 15 |
| 10 | 0 | 0 | 17 |
| 11 | 0 | 0 | 14 |

Tabla 20. Análisis de varianza para la Actividad Volumétrica sobre Inulina

| Fuente | Suma de Cuadrados | GI | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|-----------------|-------------------|----|----------------|---------|---------|
| A:Concentracion | 126.397 | 1 | 126.397 | 26.54 | 0.0036 |
| B:Aereacion | 11.0785 | 1 | 11.0785 | 2.33 | 0.1878 |
| AA | 42.0608 | 1 | 42.0608 | 8.83 | 0.0311 |
| AB | 1.0 | 1 | 1.0 | 0.21 | 0.6660 |
| BB | 50.1197 | 1 | 50.1197 | 10.52 | 0.0229 |
| Error total | 23.8166 | 5 | 4.76332 | | |
| Total (corr.) | 233.636 | 10 | | | |

$R^2 = 89.8061\%$

Al evaluar nuestros resultados obtenidos de análisis de varianza, en la Tabla 17, para la actividad enzimática de inulinasa actuando sobre inulina, observamos que los valores de "p" menores de 0.05 ($p < 0.05$) son significativos. En este caso, 3 efectos tienen un valor-P menor que 0.05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95.0%; por tanto podemos decir que es altamente significativo las variables en estudio para la actividad enzimática de inulinasa actuando en inulina.

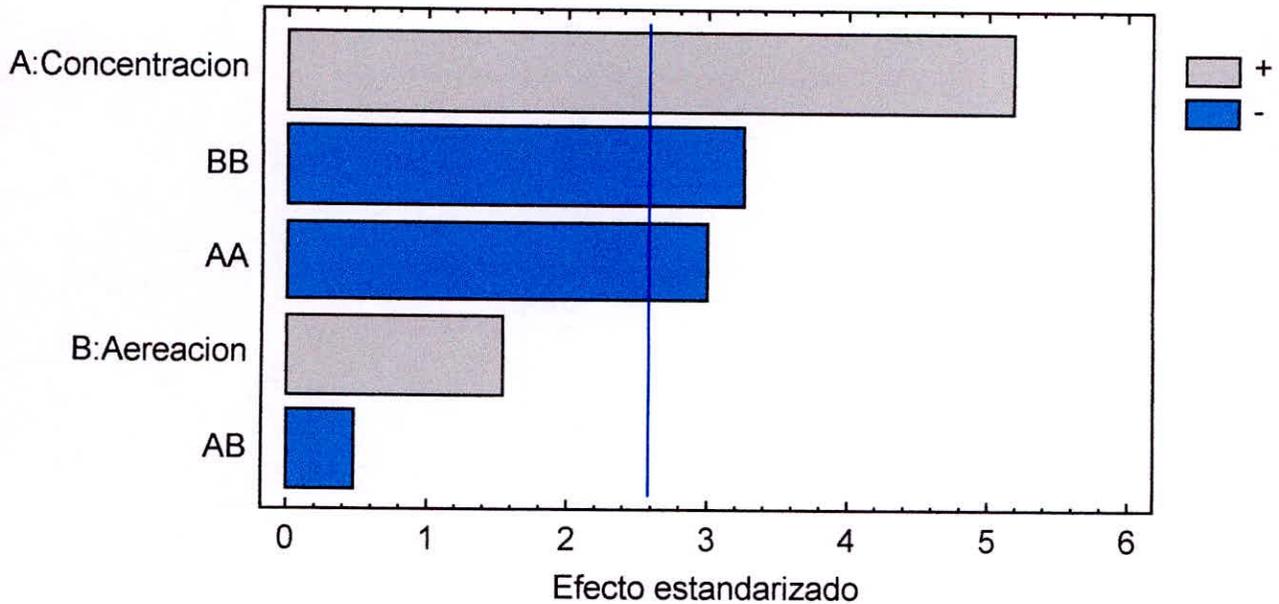
El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo, así justado, explica 89.8061% de la variabilidad en Actividad enzimática Inulina. El estadístico R-cuadrada ajustada, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes, es 79.6122%. El error estándar del estimado muestra que la desviación estándar de los residuos

es 2.1825. El error medio absoluto (MAE) de 1.25139 es el valor promedio de los residuos. El estadístico de Durbin-Watson (DW) prueba los residuos para determinar si haya alguna correlación significativa basada en el orden en que se presentan los datos en el archivo. Puesto que el valor-P es mayor que 5.0%, no hay indicación de autocorrelacion serial en los residuos con un nivel de significancia del 5.0%.

Tabla 21. Efectos estimados para Actividad Volumétrica sobre Inulina (U/ml).

| Efecto | Estimado | Error Estd. | V.I.F. |
|-----------------|-----------------|--------------------|---------------|
| promedio | 15.3333 | 1.26007 | |
| A:Concentracion | 7.94975 | 1.54326 | 1.0 |
| B:Aereacion | 2.35357 | 1.54327 | 1.0 |
| AA | -5.4583 | 1.83685 | 1.09469 |
| AB | -1.0 | 2.1825 | 1.0 |
| BB | -5.95839 | 1.83688 | 1.09469 |

Grafica 06. Diagrama de Pareto Estandarizada para Actividad Volumétrica sobre Inulina (UI/ml).



Según Tabla 18 y Grafica 07, muestra claramente que, la concentración lineal, y la aireación cuadrática, afecta de manera significativa la actividad enzimática (U/ml) de inulinasa actuando sobre inulina; como lo reporta Grootwassink y Hewitt, et al. (1983) la biosíntesis de inulinasa se induce en presencia de inulina. Dicha enzima está sujeta a mecanismos de inducción catabólica. El crecimiento de microorganismos en un sustrato particular provocara a menudo, la inducción de la enzima necesaria para la degradación de ese sustrato dentro de la célula, se ha demostrado que el tipo de sustrato tiene cierto efecto sobre la naturaleza extracelular o intracelular de la enzima. En este caso la evaluación de la producción de una

enzima por fermentación microbiana se determina por los parámetros de rendimientos (unidad de actividad/ml de caldo de cultivo o unidad de actividad/mg de células) de la enzima obtenida y por sus propiedades de la enzima que dependen de la clase de microorganismo usado, del modo de fermentación, del medio de cultivo y las condiciones ambientales.

También reporta Rouwenhorst, R. (1990), la variación de la aireación no solo afecta la disponibilidad de oxígeno, sino también ejerce influencia sobre la disponibilidad de otros nutrientes en el medio. Se ha reportado que la aireación y agitación son factores críticos *K. marxianus*, los que son responsables de la viabilidad y producción enzimática.

Sin embargo, algunas enzimas, son susceptibles a desnaturalización cuando la interfase gas-agua se incrementa tal como en una agitación vigorosa o gasificación. La desnaturalización de la superficie podría ser un factor involucrado en aquellos casos donde se requiere de aireación óptima para la formación de la enzima. (Davies, 1963).

Grafica 07. Grafica de efectos Principales para Actividad Volumétrica sobre Inulina (UI/ml).

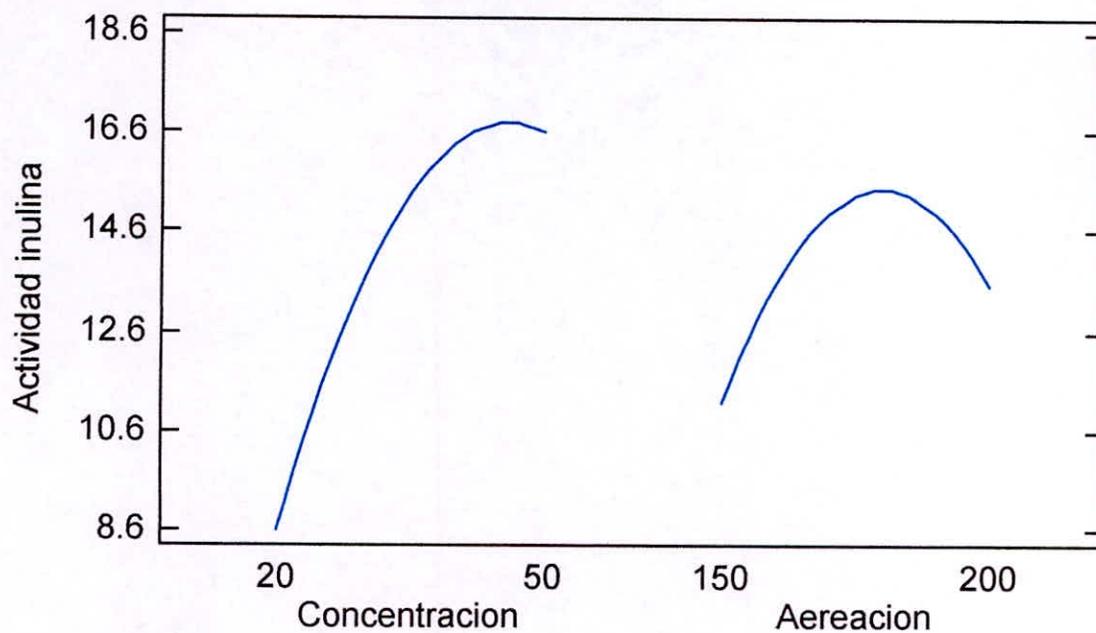


Tabla 19. Coeficiente de regresión para Actividad Volumétrica sobre Inulina (UI/ml).

| Coeficiente | Estimado |
|-----------------|-------------|
| constante | -171.185 |
| A:Concentracion | 1.34739 |
| B:Aireacion | 1.76209 |
| AA | -0.0121296 |
| AB | -0.00133333 |
| BB | -0.00476672 |

La ecuación del modelo ajustado según Tabla 19:

$$\text{Actividad Volumétrica sobre Sacarosa} = -171.185 + 1.34739*A + 1.76209*B - 0.0121296*A^2 - 0.00133333*A*B - 0.0146294*B^2$$

Dónde:

A = Concentración de extracto (%)

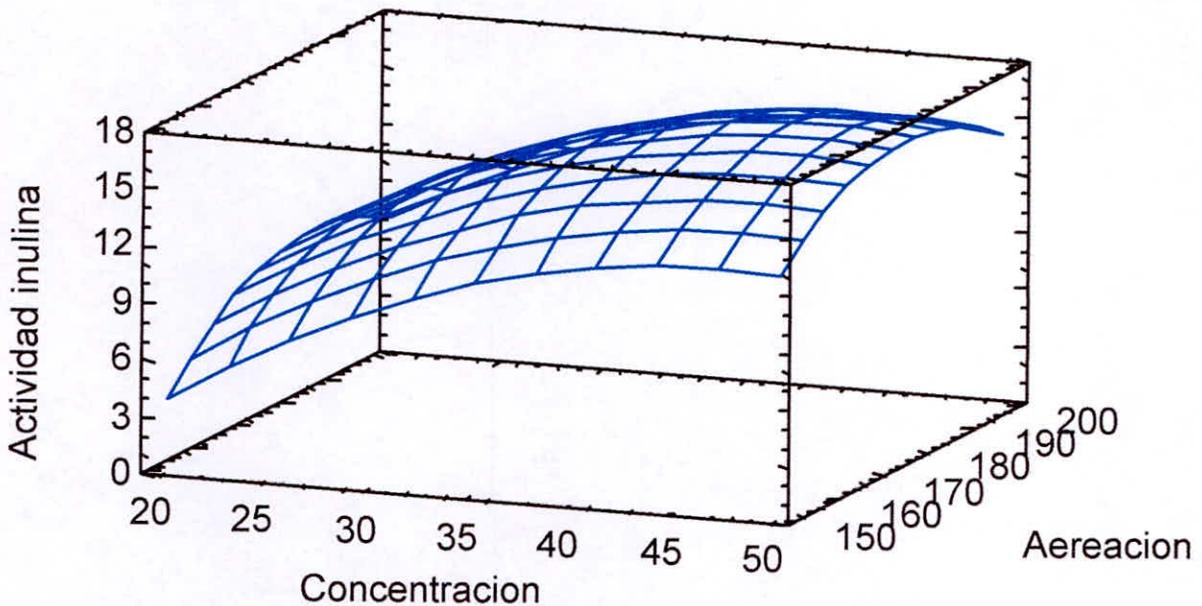
B = Aireación (rpm)

De la función que describe el modelo de segundo orden se calculó el punto estacionario de manera teórica (por el programa), derivando esta ecuación. Las coordenadas de este punto obtenidas por este método, se sustituyeron en la ecuación general para calcular la cantidad de actividad enzimática de inulinasa actuando sobre inulina en las condiciones del punto óptimo.

Tabla 22. Resultados Estimados para Actividad Volumétrica sobre Inulina (U/ml).

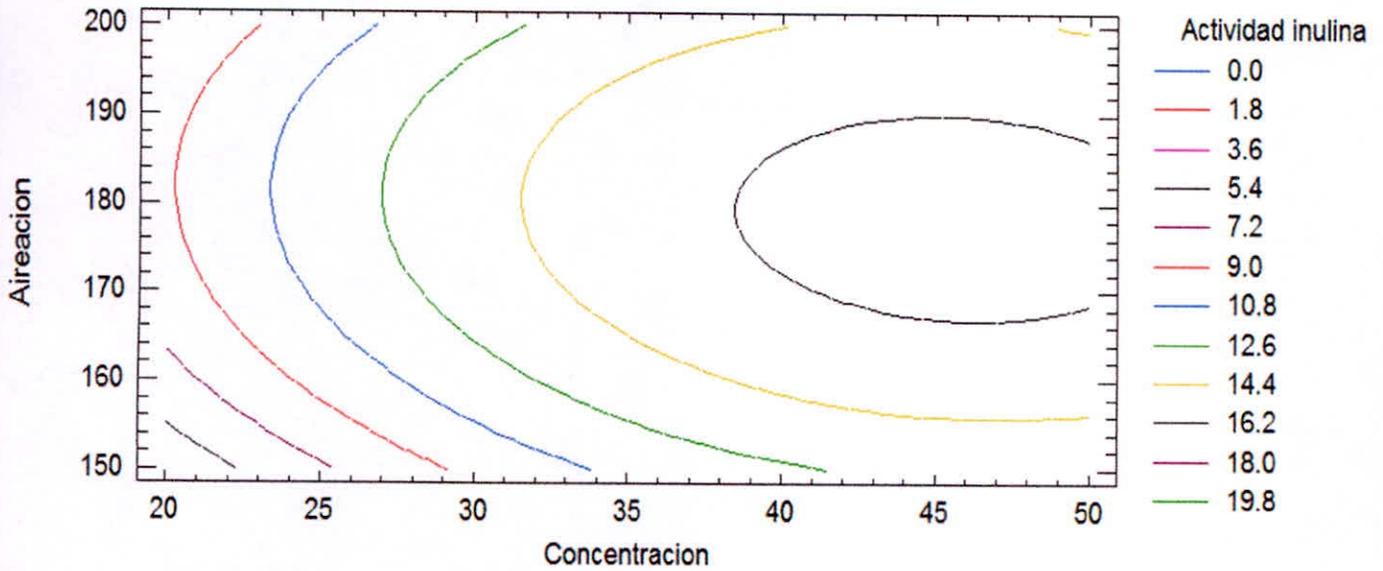
| | <i>Observados</i> | <i>Ajustados</i> |
|-------------|-------------------|------------------|
| <i>Fila</i> | <i>Valores</i> | <i>Valores</i> |
| 1 | 5.0 | 3.97331 |
| 2 | 12.0 | 12.9231 |
| 3 | 15.0 | 15.3333 |
| 4 | 9.0 | 11.0393 |
| 5 | 15.0 | 14.2766 |
| 6 | 8.0 | 7.71083 |
| 7 | 2.0 | 4.25371 |
| 8 | 16.0 | 15.4963 |
| 9 | 10.0 | 7.32689 |
| 10 | 17.0 | 15.3333 |
| 11 | 14.0 | 15.3333 |

Grafica 08. Superficie de Respuesta Estimada para Actividad Volumétrica sobre Inulina (UI/ml): Interactuando Aireación y Concentración de extracto.



Analizando la gráfica 09 se observa que a una concentración de extracto de 35% v/v y aireación de 175 rpm favorece la actividad enzimática, mostrándose la existencia de un máximo local en la misma. Si nos alejamos de este punto, aumentando o disminuyendo los valores de concentración de extracto o aireación, el valor esperado decrece. Por tanto para alcanzar la actividad enzimática óptima en el proceso de la producción que estamos considerando, debemos trabajar con los valores de concentración de extracto y aireación que nos indica el punto óptimo.

Grafica 09. Contornos de la Superficie de Respuesta Estimada para Actividad Volumétrica sobre Inulina (UI/ml): Interactuando Aireación y Concentración de extracto.



Se puede observar y verificar en la gráfica 10, donde interacciona la concentración de extracto (%v/v) y aireación (rpm), la existencia de una región óptima que nos da la mayor actividad enzimática en donde se encuentra una serie de combinaciones de concentraciones de extracto (40 a 50)% v/v y de aireación (165 -190) rpm. Estos valores que nos muestra la superficie de respuesta de una banda óptima, y además un valor puntual óptimo, nos indica sobre la robustez de la evaluación. Estos valores puntuales, son los valores críticos obtenidos del grafico de superficie de respuesta, para la concentración de extracto 45.7357% v/v y aireación de 178.437 rpm; obteniéndose una mayor actividad enzimática de inulinasa actuando sobre inulina.

Tabla 23. Valores críticos resultados de la optimización de los parámetros de concentración de extracto y aireación.

| FACTOR | BAJO | ALTO | OPTIMO |
|---------------------------|-------------|-------------|---------------|
| Concentración de extracto | 13 | 56 | 45.7357 |
| Aireación | 139 | 210 | 178.437 |

Una vez obtenido el modelo matemático se procedió hallar las condiciones óptimas aplicando la primera derivada e igualando a cero:

$\frac{\partial y}{\partial x_1} = 1.34739 - 0.0242592X_1 - 0.00133333X_2$; para la concentración de extracto.

$\frac{\partial y}{\partial x_2} = 1.76209 - 0.00953344X_2 - 0.014X_2$; para la aireación.

Las condiciones que maximicen la variable respuesta se presenta en la Tabla 21, obteniendo un máximo de actividad enzimática de 16.8365 U/ml

4.4.3 Actividad Volumétrica de la Inulinasa sobre sacarosa e inulina.

Tabla 24: Actividad Volumétrica de la Inulinasa sobre Inulina y Sacarosa.

| Ensayos | Concentración de extracto | Aireación | Actividad Volumétrica Inulina (U/ml) | Actividad Volumétrica Sacarosa (U/mg) |
|---------|---------------------------|-----------|--------------------------------------|---------------------------------------|
| 1 | -1 | -1 | 5 | 29 |
| 2 | +1 | -1 | 12 | 72 |
| 3 | -1 | +1 | 10 | 41 |
| 4 | +1 | +1 | 15 | 63 |
| 5 | 0 | -1.41 | 8 | 76 |
| 6 | 0 | +1.41 | 9 | 80 |
| 7 | -1.41 | 0 | 2 | 37 |
| 8 | +1.41 | 0 | 16 | 82 |
| 9 | 0 | 0 | 15 | 82 |
| 10 | 0 | 0 | 17 | 80 |
| 11 | 0 | 0 | 14 | 92 |

Tabla 25: Valores máximos y mínimos observados en las Actividades Volumetricas sobre Sacarosa e Inulina. (U/ml)

| | Mínimo | Máximo |
|--------------------|-----------|-----------|
| Respuesta | Observado | Observado |
| Actividad inulina | 2.0 | 17.0 |
| Actividad sacarosa | 29.0 | 92.0 |

Tabla 26: Combinación de factores experimentales, maximizando la función de "deseabilidad"

| | | | <i>Deseabilidad</i> | <i>Deseabilidad</i> |
|-------------|--------------------------|---------------------------|---------------------|---------------------|
| <i>Fila</i> | <i>Actividad inulina</i> | <i>Actividad sacarosa</i> | <i>Prevista</i> | <i>Observada</i> |
| 1 | 2.0 | 37.0 | 0.0 | 0.0 |
| 2 | 5.0 | 29.0 | 0.133913 | 0.0 |
| 3 | 16.0 | 82.0 | 0.797125 | 0.886107 |
| 4 | 15.0 | 82.0 | 0.88624 | 0.853874 |
| 5 | 17.0 | 80.0 | 0.88624 | 0.899735 |
| 6 | 8.0 | 76.0 | 0.483726 | 0.546272 |
| 7 | 14.0 | 92.0 | 0.88624 | 0.894427 |
| 8 | 9.0 | 80.0 | 0.632173 | 0.614636 |
| 9 | 15.0 | 63.0 | 0.746643 | 0.683904 |
| 10 | 10.0 | 41.0 | 0.346116 | 0.318728 |
| 11 | 12.0 | 72.0 | 0.769651 | 0.674556 |

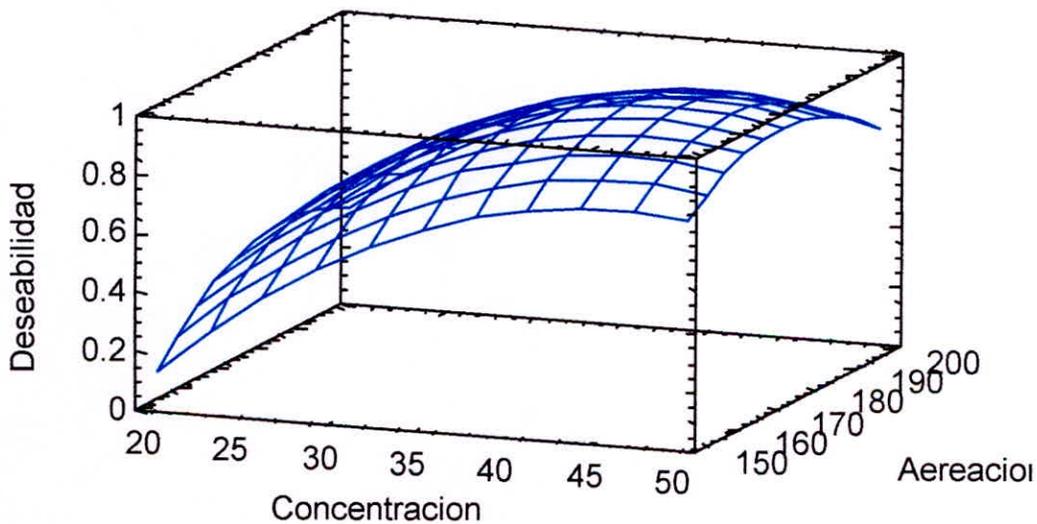
Este procedimiento ayuda a determinar la combinación de los factores experimentales que simultáneamente optimiza varias respuestas. Lo hace maximizando la función de 'deseabilidad'. Usted puede establecer varias características de la función de 'deseabilidad' a través del cuadro de diálogo de Opciones de Análisis. Las metas de cada una de las respuestas actualmente están establecidas como:

Actividad inulina - maximizar

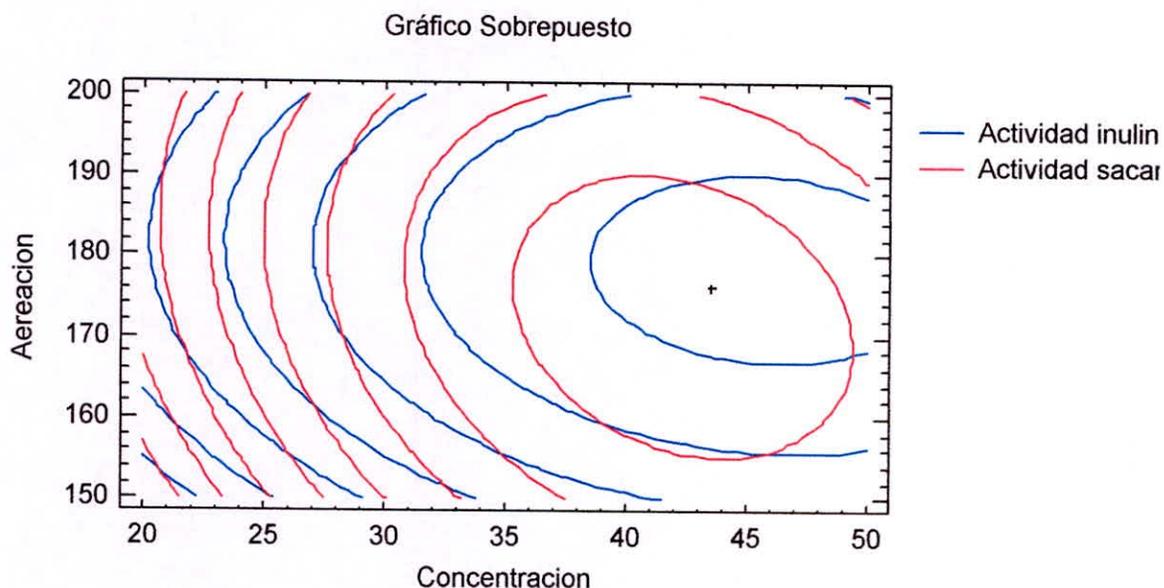
Actividad sacarosa - maximizar

La salida muestra la función de 'deseabilidad' evaluada en cada punto del diseño. Entre los puntos de diseño, la 'deseabilidad' máxima se alcanza en la corrida 4.

Grafica 10: Superficie de Respuesta Estimada para la Actividad Volumétrica de Sacarosa e Inulina: Interactuando Aireación y Concentración de Extracto.



Grafica 11: Grafico Sobrepuesto de Superficie de Respuesta Estimada para la Actividad Volumétrica de Sacarosa e Inulina: Interactuando Aireación y Concentración de Extracto.



Optimizar Deseabilidad

Valor óptimo = 0.961315

| Factor | Bajo | Alto | Óptimo |
|---------------|-------------|-------------|---------------|
| Concentración | 13.7868 | 56.2132 | 43.5235 |
| Aireación | 139.645 | 210.355 | 176.069 |

| Respuesta | Óptimo |
|--------------------|---------------|
| Actividad inulina | 16.7435 |
| Actividad sacarosa | 88.2329 |

V. CONCLUSIONES

- La cinética de producción de inulinasa depende la composición del precultivo; cuando el inoculo y la cantidad de enzima producida respecto a la producción obtenida usando sacarosa en el precultivo.
- El extracto de brácteas de alcachofa se utilizó para el medio de fermentación por ser fuente de Inulina, donde este es el sustrato base empleado como fuente de carbono para la producción de Inulinasa, se extrajo de forma rápida, puesto que tiene una reacción de pardeamiento enzimático.
- Se determinó la actividad volumétrica máxima de Inulinasa sobre la sacarosa, a concentración de extracto de 42.416 y Aireación de 172.488 rpm, siendo esto los valores óptimos determinado por el software.
- Se determinó la actividad volumétrica máxima de Inulinasa sobre la inulina, a concentración de extracto de 45.7357 y Aireación de 178.437 rpm, siendo esto los valores óptimos determinado por el software.
- Se optimizo la actividad volumétrica máxima de Inulinasa sobre la inulina y sacarosa, a concentración de extracto de 43.5235 y Aireación de 176.069 rpm, siendo esto los valores óptimos determinado por el software.

- Los valores de actividad de la Inulinasa sobre sacarosa fueron alrededor de 17 veces mayor que sobre inulina, demostrando así que la enzima producida es una exo-inulinasa que tiene más reactividad de hidrolisis catalítica de invertasa que inulinasa.

VI. RECOMENDACIONES

- Utilizar estas condiciones óptimas de Concentración de extracto y Aireación, para determinar la actividad en investigaciones futuras de Inulinasas producidas por fermentación de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571.
- Utilizar como fuente de carbono, inulina químicamente pura, libre de azúcares reductores. Para una comparación de productividad con material vegetal.
- Realizar un estudio e identificación de los componentes del extracto de brácteas de alcachofa que promueven la biosíntesis y excreción de inulinasa en *Kluyveromyces marxianus*.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Castillo, A. 2009. Estudio de la fermentación de cepas de *Kluyveromyces* para la producción de inulinasa. PIC.FF.II. 001.2008. Universidad Nacional del Santa. Chimbote Perú.
2. Castillo, A. 2011. Estudio de la producción de Inulinasa de *Kluyveromyces marxianus* en cultivos por lote. PIC.FF.II. 001.2008. Universidad Nacional del Santa. Chimbote Perú.
3. Castillo, A. y Chamy, R. (2011). Determinación de los parámetros cinéticos de la enzima inulinasa actuando sobre sustratos de sacarosa, rafinosa e inulina. Revista Científica de la Escuela de Postgrado de la Universidad Nacional del Santa: I, 55-66.
4. Castillo, A. y Chamy R. 2010. Produccion de inulinasa por levaduras de de *Kluyveromyces marxianus*. Scientia Agropecuaria, pp. 235-245.
5. Castillo, C. y Contreras R. 2011. Producción de inulinasa por cultivo discontinuo de *Kluyveromyces marxianus* en extracto de yacón, XXVI Congreso peruano de química – Arequipa 2012.

6. Cazetta, M. (2005). Yacon extract as a substrate to produce inulinase by *Kluyveromyces marxianus* var *Bulgaricus*. *Journal of Food Engineering*, 66: 301-305.
7. Franck, A. y Deleenheer, F. Inulin En: Food Polysaccharides and Their Applications. Stephen A. (Editor). Segunda Edición. Nueva York, USA: Marcel Dekker; 2006. 773 pp.
8. Garrido A y Teijón J. 2006. Fundamentos de Bioquímica estructural. Editorial TEBAR. España.
9. Gutiérrez, H. y De la vera. 2004. Análisis y diseño de Experimentos. Mc Graw-Hill. Interamericana Editores. México.
10. Illanes, A. 1994. Biotecnología de enzimas. Ediciones Universitarias de Valparaíso. Universidad Católica de Valparaíso. Chile.
11. Kushi, R.; Monti, R. y Contiero, J. 2000. Production, purification and characterization of an extracellular inulinase from *Kluyveromyces marxianus* var. *Bulgaricus*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, pp. 63-69.
12. Kango, N. (2008). Production of inulinase using tap roots of dandelion (*Taraxacum officinale*) by *Aspergillus niger*. *Journal of Food Engineering*, 85:473-478.

13. Lane, M.; Morrissey, J. 2010. *Kluyveromyces marxianus*: A yeast emerging from its sister's shadow. *Fungal Biology Reviews*, doi:10.1016/j.fbr.2010.01.001.
14. Leite, J.; Murr, F.; Martinelli, P. Dal, I. y Park, K. 2007. Optimization of a physical concentration process for inulin. *Journal of Food Engineering*, pp. 832-838
15. Madrigal L. y Sangronis E. 2007. La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales. Universidad Simón Bolívar, Departamento de Procesos Biológicos y Bioquímicos. Caracas, Venezuela.
16. Manrique, I.; Hermann, M. y Bernet T. 2004 Yacón - Ficha Técnica. Centro Internacional de la Papa (CIP) Lima, Perú, ISBN 92-9060-243-0.
17. Manrique I.; Párraga A. y Hermann M. 2005. Jarabe de yacón: Principios y procesamiento. Centro Internacional de la papa (CIP). Lima, Perú, ISBN: 92-9060-249x
18. Odalys Rodriguez-Gamez, Manuel de Jesus Serrat-Diaz, Miladis Camacho-Pozoy Jorge Erick Marin-Moran. Optimización de las condiciones de fermentación para la producción de etanol de melaza de caña por *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, Vol. 42, N° 2, pp. 97-102. 2011.

19. Ricca, E.; Calabró, V.; Curcio, S. y Dorio, G. (2007). The State of the art in the production of fructose from inulin enzymatic hydrolysis. *Crit Rev Biotechnol*, 27: 129-145.
20. Ricca, E.; Calabró, V.; Curcio, S. y Ioro, G. (2009). Fructose production by chicory inulin enzymatic hydrolysis: A kinetic study and reaction mechanism. *Process Biochemistry*, 44, 466-470.
21. Rocha, J.; Catana, R.; Ferreira, B.; Cabral, J. y Fernandes, P. 2006. Design and characterisation of an enzyme system for inulin hydrolysis. *Food Chemistry*, pp. 77-82.
22. Rodríguez, M. y Lemma, A. 2005. *Planeamiento de Experimentos y Optimización de Procesos. Una estrategia secuencial de planeamientos*. Edit. Casa do Pao. Brasil.
23. Rouwenhorst, R. y Van Dijken, J. 1988. Production, distribution, and kinetic properties of inulinase in continuous cultures of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. *Appl. Environ. Microbiol*, pp.1131-1137.
24. Sánchez A. y Bárcena I. 2007. El azúcar en la enseñanza secundaria. ISSN 1575-3417, pp.46-49.

25. Sangeetha, P.; Armes, M.; y Prapulla, S. 2005. Recent trends in the microbial production, analysis and application of fructooligosaccharides. Trends in Food Science & Technology, pp. 442-457.
26. Seminario, J.; Valderrama, M. y Manrique, I. 2003. El Yacón fundamentos para el aprovechamiento de un recurso promisorio. CIP y COSUDE, Lima Perú.
27. Sing, R. y Bhermi, H. (2008). Production of extracellular exoinulinase from *Kluyveromyces marxianus* YS-I using root tubers of *Asparagus officinalis*. Bioresource Technology. 99, 7418 – 7423.
28. Walter, W.; McBee, R. y Temple Ken. 1994. Introducción a la microbiología. Editorial CECSA México.
29. Wei, W.; Zheng, Z.; Liu, y. Zhu, X. 1998. Optimizing the culture conditions for higher inulinase production by *Kluyveromyces* sp. Y-85 and scaling – up fermentation. J. Ferment. Bioeng, pp. 395 -399.
30. Aldave, M. y Jorrín J. 2010. Estudio cinético de la actividad invertasa de levadura de panadería. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Colombia.

ANEXOS

**Anexo 1: Composición química
proximal de brácteas de
Alcachofa**

Anexo 1.1: Determinación de Humedad

Para determinar el contenido de humedad de los productos derivados de harina de trigo u otros cereales, se sigue el procedimiento establecido por la Norma Técnica ITINTEC 205.037 (1974), denominado "Método de desecación por estufa", el cual es el siguiente:

- ❖ Pesar las placas vacías en la balanza analítica.
- ❖ Agregar una muestra de 10 gramos de pan de molde.
- ❖ Llevar a la estufa por un lapso de 2.5 horas a 105°C.
- ❖ Una vez pasado el tiempo establecido, sacar la muestra y dejar reposar por 5 minutos.
- ❖ Luego del reposo, pesar la muestra en placa
- ❖ Mediante la fórmula, calcular el % de humedad de la muestra.

$$\% \text{ Humedad} = \frac{(P_1 - P_2)}{m} \times 100$$

Dónde:

- P_1 = Peso de la placa más muestra.
- P_2 = Peso de la placa más muestra seca
- m = Peso de la muestra.

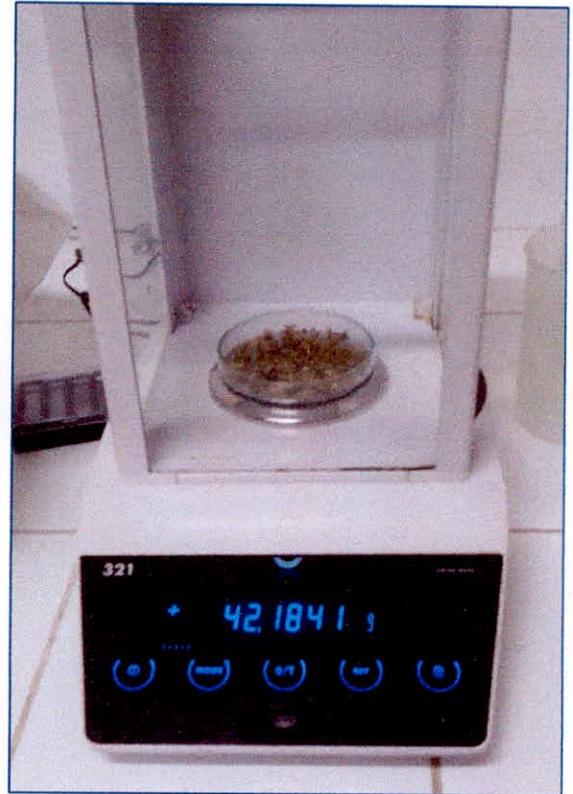
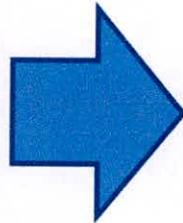


Figura 15. Procedimiento de humedad.

Anexo 1.2: Determinación de Proteínas

Para determinar el contenido de Proteínas, se siguió el procedimiento establecido por la NTP ISO 5983 – Primera Edición 2002; y Met. AOAC 984.13, 1995. Edición 16; el cual es el siguiente:

Digestión de la materia orgánica

- ❖ Se pesó aproximadamente 4 gr. De muestra molida sobre papel glassine y se coloca dentro del balón Kjendhal.
- ❖ Se agregan 15 gr. De Sulfato de Potasio Anhidro y 1 gr. De Sulfato de Cobre Anhidro.
- ❖ Se agregan 25 ml de ácido sulfúrico concentrado y luego se agita cuidadosamente la mezcla con movimiento circular.
- ❖ Inclinar en el digestor del equipo y calentar suavemente hasta la desaparición de la espuma.
- ❖ Se debe tener precaución de que no queden adherida sustancias orgánicas en las paredes del tubo para prevenir la descomposición de las sustancias orgánicas en las paredes y ocurran perdidas de nitrógeno, estas no deben sobrecalentarse.
- ❖ Una vez que le liquido se haya aclarado, se continua el hervor por espacio de 2 horas.
- ❖ Enfriar a temperatura ambiente.

Destilación del Amoniaco

- ❖ Después de enfriar se le agrego al balón Kjendhal 350 ml de agua destilada.
- ❖ Posteriormente se agregó 100 ml de hidróxido de sodio al 33% teniendo cuidado de hacerlo resbalar por las paredes del balón.
- ❖ Inmediatamente después de agregar la solución de hidróxido de sodio se conecta el Kjendhal al bulbo del refrigerante, el otro extremo del refrigerante o su prolongación debe estar sumergido en 100 ml de H₂SO₄ 0.1 N, contenidos en el Erlenmeyer, se agita el balón para mezclar perfectamente el contenido y se calienta hasta que todo el amoniaco haya destilado, hasta un volumen aproximado de 300 a 350ml, (volumen total).
- ❖ Antes de retirar el Erlenmeyer se lava con agua destilada el extremo o su prolongación. Se titula el exceso de ácido con solución 0.1 N de NaOH, usando tashiro como indicador. El indicador se vuelve de rosado a verde esmeralda.

$$\% \textit{Proteina} = \frac{(14 * N_{HCl} * V * 100 * \textit{factor})}{m * 1000} \times 100$$

Dónde:

- P_1 = Peso de la placa más muestra.
- P_2 = Peso de la placa más muestra seca
- m = Peso de la muestra.

Anexo 1.3: Fibra cruda

Anexo 1.4: Determinación de Grasa

- ❖ Se utilizó aproximadamente 4 gr. De muestra seca y molida pesados, en papel filtro rápido previamente tarado. Se utilizó el método de la extracción con hexano.
- ❖ Se colocó la muestra seca de material prima, contenida en el papel filtro en la cámara de extracción soxhlet o cámara de extracción del equipo buchi, la extracción se hace con éter de petróleo (hexano) bidestilado durante 4 horas y regulando la temperatura de manera que el sifoneo ocurra 16 veces por hora. Es extracto etéreo se recibe en vaso buchi seco y tarado o en un balón soxhlet.
- ❖ El extracto obtenido, se evapora y se seca en la estufa durante 1 hora a 100°C, enfriar en el desecador hasta temperatura ambiente y pesar.
- ❖ Calculamos el % de Grasa a través de la siguiente formula.

$$\% \text{ Grasa} = \frac{(P_2 - P_1)}{P_m} \times 100$$

Dónde:

- **P₁**= Peso de balón vacío.
- **P₂**= Peso de balón más residuo seco
- **P_m**= Peso de la muestra.

Anexo 1.4: Determinación de Carbohidratos

$$CT = 100\% - (\textit{Humedad} + \textit{Proteinas} + \textit{Grasas} + \textit{Fibra})$$

Anexo 1.4: Determinación de Ceniza

Para la determinación del porcentaje de cenizas, es decir, el porcentaje de sólidos y minerales en el producto, se puede seguir el procedimiento establecido por la norma técnica ITINTEC 205.038 (1974), llamado "Método De Incineración", el cual es el siguiente:

- ❖ Pesar el crisol vacío en la balanza analítica.
- ❖ Agregar 3 ó 4 gramos de muestra.
- ❖ Quemar previamente la muestra en la cocina eléctrica, para evitar la expansión de malos olores y el manchado de la mufla por unos 15 minutos.
- ❖ Llevar la muestra a la mufla por un lapso de 2.5 horas a 600°C.
- ❖ Pasado el tiempo establecido, retirar la muestra de la mufla y dejar reposar por 15 minutos.
- ❖ Pesar la muestra en la balanza analítica.
- ❖ Mediante la fórmula, calcular el % de cenizas de la muestra.

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{(P_1 - P_0)}{P} \times 100 \times \frac{85}{100 - H}$$

Dónde:

- P_1 = Peso del crisol más las cenizas
- P_0 = Peso del crisol
- P = Peso inicial de la porción de muestra
- H = Humedad de la muestra (%)

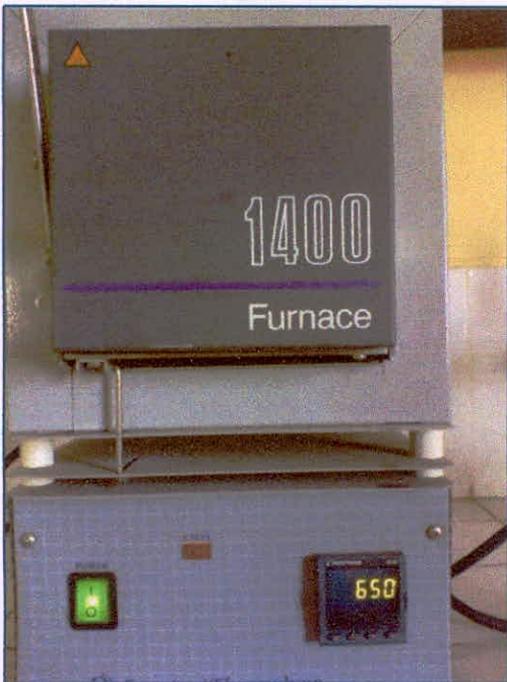
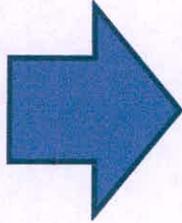


Figura 17. Procedimiento de cenizas.

Anexo 2: Caracterización del extracto de Alcachofa.

Anexo 2.1: Determinación de Azúcares Reductores

Para la determinación de azúcares reductores por el método DNS (Miller, 1972), el cual es el siguiente:

- ❖ Se añade 1 mL de reactivo DNS a un 1mL de muestra a analizar.
- ❖ Se mantiene la mezcla en baño de agua a ebullición durante 5 minutos para luego enfriar con agua helada.
- ❖ Se añaden 5 ml de agua destilada, y se deja reposar por 10 minutos, luego agitar.
- ❖ Se lee la absorbancia a 540 nm, utilizando agua como blanco.
- ❖ La concentración se obtiene interceptando la medida de absorbancia en la curva de calibrado.

La curva de calibrado

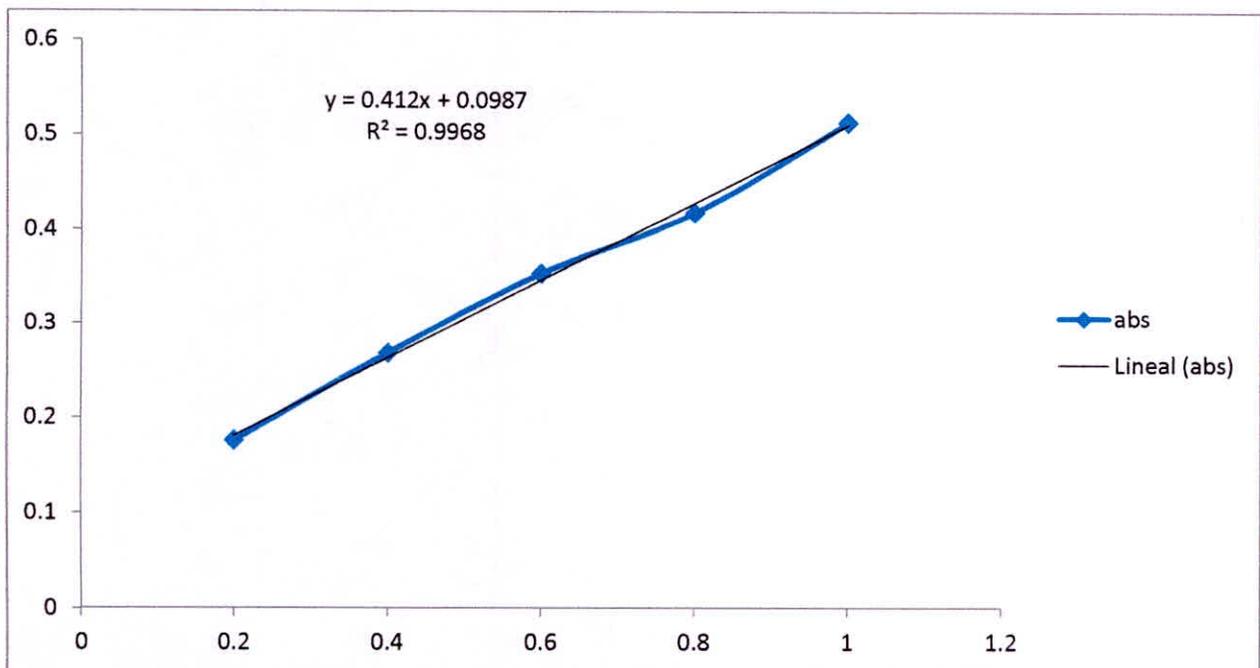


Gráfico 12. Curva de calibrado para azúcares reductores

$$[\text{Azúcares reductores}]_{g/l} = \left[\frac{\text{Absorbancia} - a}{b} \right]$$



Figura 18. Procedimiento de azúcares reductores.

Anexo 2.2: Determinación de Glucosa

Procedimiento

1. Preparación de la curva de calibración

| Tubo | [mg/L] | reactivo 4 (μL) | Agua (μL) | reactivo 3 (μL) | H ₂ SO ₄ 12 N (μL) | Abs. (540 nm) |
|---------------|--------|------------------------------|------------------------|------------------------------|---|---------------|
| 1 (blanco) | 0 | ----- | 500 | 1000 | 1000 | |
| 2 | 20 | 20 | 480 | 1000 | 1000 | |
| 3 | 40 | 40 | 460 | 1000 | 1000 | |
| 4 | 60 | 60 | 440 | 1000 | 1000 | |
| 5 | 80 | 80 | 420 | 1000 | 1000 | |

2. En tiempo cero, empiece la reacción por la adición de 1000 μL del **reactivo 3** al primer tubo y mezcle. Permita un intervalo de **2 min** entre adiciones del **reactivo 3** para cada uno de los tubos subsecuentes.
3. Después de que cada tubo ha reaccionado exactamente 30 min a 37 °C. Detener la reacción en intervalos de 2 min mediante la adición de 1 mL (1000 μL) de H₂SO₄ 12 N en cada tubo. Cuidadosamente mezcle cada tubo vigorosamente.
4. Medir la absorbancia de cada tubo contra el reactivo blanco a 540 nm.

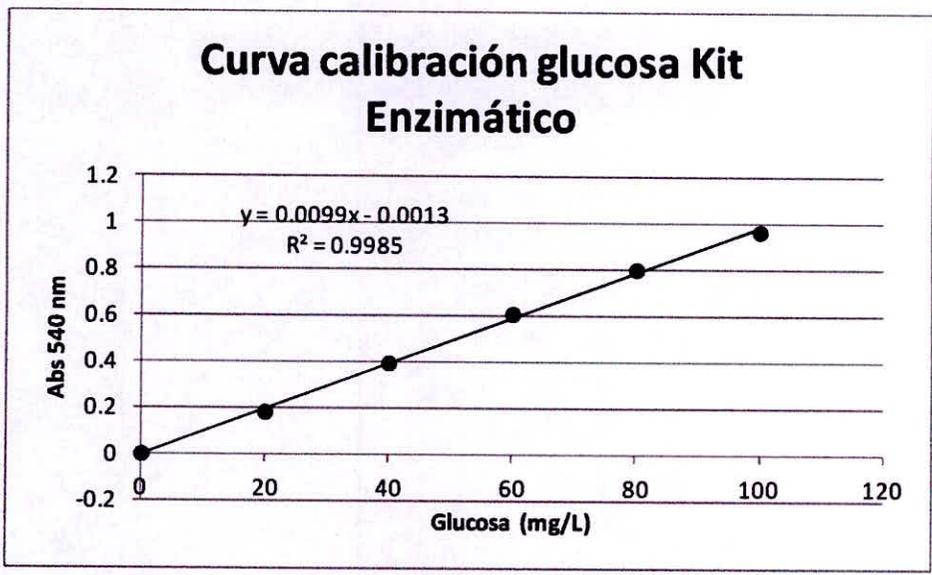


Grafico 13. Curva de calibrado para glucosa Kit enzimático

Figura 19. Procedimiento de glucosa.

Anexo 2.3: Determinación de °Brix

Para la determinación mediante método refractómetro recomendado por AOAC (1995), el cual es el siguiente:

- ❖ Medir la temperatura de las sustancias a trabajar.
- ❖ Extraer el extracto – mezclar – homogenizar – filtrar.
- ❖ Colocar algunas gotas sobre el prisma del refractómetro digital.
- ❖ Esperar lectura.

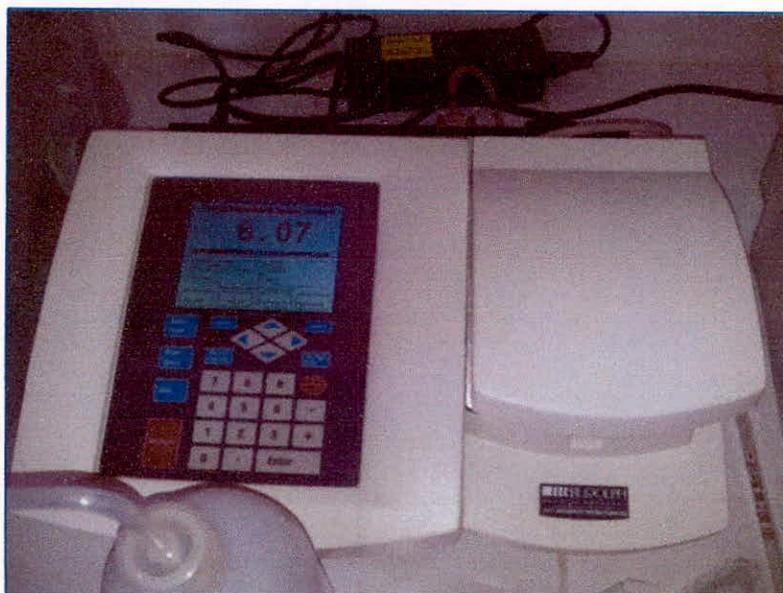


Figura 20. Procedimiento de °Brix.

Anexo 2.4: Determinación de Acidez

Para la determinación mediante titulación potenciométrica por el método AOAC (1995), el cual es el siguiente:

- ❖ Armar el montaje para la medición de la acidez.
- ❖ Colocar debajo de la bureta el agitador magnético.
- ❖ Llenar la bureta con soda 0.1 N y mantenerla en cero.
- ❖ Tomar 10 ml de jugo filtrado y homogenizado.
- ❖ Colocar en un Erlenmeyer de 150 ml, colocar la barra magnética.
- ❖ Color el electrodo del potenciómetro en el jugo 3 o 4 gotas de fenolftaleína.
- ❖ Verter la solución de soda gota a gota hasta llegar a un pH=8.2 o hasta observar el cambio rosado/naranja.
- ❖ Hacer los cálculos:

$$\% \text{ Acidez} = \frac{(G * N * mEq * 100)}{M}$$

Dónde:

- **G**= ml de NaOH
- **N**= normalidad de NaOH
- **mEq**= mili equivalente del ácido predominante
- **M**= peso molecular en mg o ml

Anexo 2.5: Determinación del pH

Para la determinación mediante un potenciómetro, el cual es el siguiente:

- ❖ Tomar más o menos 25 ml. de muestra en un vaso de 50 ml.
- ❖ Introducir los electrodos en la solución y leer directamente el pH en el pH-metro.

Anexo 3: Preparación de extracto Alcachofa



Recepción de la materia



Selección



Lavado



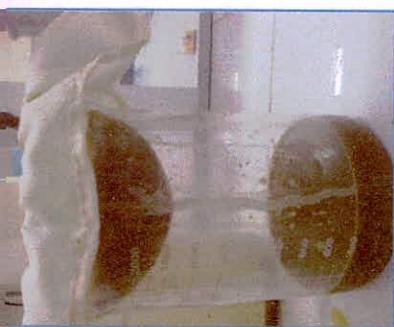
Sanitizado



Escaldado



Extractor



Filtrado



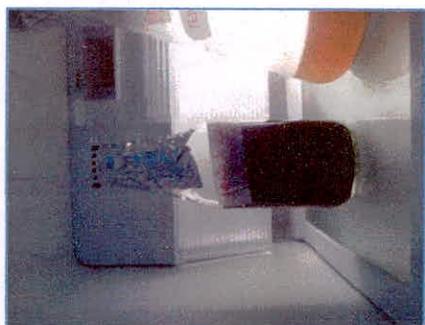
Centrifugado



Envasado



Esterilizado



Almacenado

Anexo 4: Preparación del medio de cultivo

Anexo 4.1 Medio de mantención.

Tabla 27. Composición del medio de Mantención.

| Nutriente | Concentración (g/l) |
|----------------------|------------------------|
| Extracto de levadura | 10 |
| Peptona | 20 |
| Glucosa | 20 |
| Agar | 20 |

1. Los nutrientes se pesan las cantidades requeridas para 50 ml de la tabla 23.
2. Cada nutriente se disuelve en vasos de precipitación de 20 ml, con agua destilada y se colocara en un matraz Erlenmeyer (250ml), con un volumen útil de 50 ml. Donde se le adiciona el agar la cual lo solidifica al medio y se tapa el matraz con papel de aluminio. El contenido total en el matraz debe ser de 50 ml.
3. Calentar con el mechero Bunsen la mezcla disuelta en el matraz; agitando constantemente con la ayuda de una varilla de vidrio, hasta la aparición de la primera burbuja, a partir de ello se espera 2 minutos, después de ello se espera a que tenga unos 60 °C, para colocarlos en 10 tubos de ensayos e inmediatamente son tapados con tapones de algodón.
4. Colocar los tubos en un vaso de precipitado y llevarlos a la olla a presión, para la esterilización del medio a una temperatura de

121°C por 15 minutos y se dejará por un lapso de 5 minutos para despurgar, para poder abrir la olla.

5. Finalmente se dejará enfriar los tubos en forma inclinada para la solidificación del medio de cultivo, la cual está listo para la siembra del microorganismo.

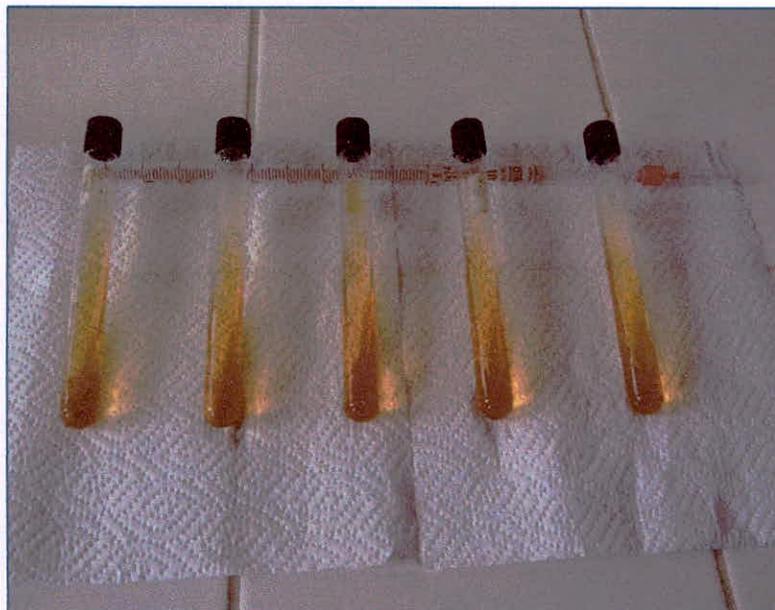


Figura 21. Procedimiento de Medio de Mantension.

Anexo 4.2 Medio de activación.

Tabla 28. Composición del medio de Activación.

| Nutriente | Concentración (g/l) |
|--------------------------------------|---------------------|
| Sacarosa | 10 |
| Extracto de levadura | 3 |
| Peptona | 5 |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0.65 |
| pH 6 | |

1. Pesar los nutrientes de acuerdo a la tabla 24.
2. Se usa un matraz de 250 ml y se diluye la sacarosa con 50 ml de agua destilada, luego se tapaná con un tapón de gasa y algodón y se cubrirá con papel aluminio.
3. En un tubo de ensayo se diluye con 3 ml de agua destilada el extracto de levadura y la peptona.
4. En otro tubo de ensayo se diluye con 2 ml de agua destilada el MgSO₄.7H₂O, esto para evitar la reacción entre los componentes. Establecer el pH con la solución tampón previamente preparado
5. Luego se procederá a esterilizar por 15 minutos, y se dejará por un lapso de 5 minutos para despurgar, para después proceder a cerrar completamente los tubos que contienen el medio de cultivo.
6. Luego procederemos a sacarlos de la autoclave y se enfriará al ambiente.
7. Posteriormente se mezclaron las 2 disoluciones en el matraz de 250 ml utilizado.



Figura 22. Procedimiento de Medio de Activación.

Anexo 4.3 Medio de fermentación.

Tabla 29. Composición del Medio de Fermentación.

| Nutriente | Concentración (g/l) |
|---|---------------------|
| Extracto de Alcachofa | (20 – 50) % (v/v) |
| Extracto de levadura | 3 |
| KH_2PO_4 | 1 |
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 5.0 |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.5 |
| pH | 4 |

1. Pesar los nutrientes en pequeños capachos de papel aluminio tal como indica la tabla 25.
2. Luego usando un matraz de 1 litro se diluye el extracto de yacón y el extracto de levadura, con agua destilada variando el volumen, y luego taparemos con gasa, algodón y papel aluminio el matraz.
3. En un tubo de ensayo se diluye $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ con 5 ml de agua destilada.
4. Luego se procederá a esterilizar a 121 °C por 15 minutos, para después dejarlo por un lapso de 5 minutos para despurgar y luego proceder a cerrar completamente los tubos.
5. Se procederá a sacarlos de la autoclave.

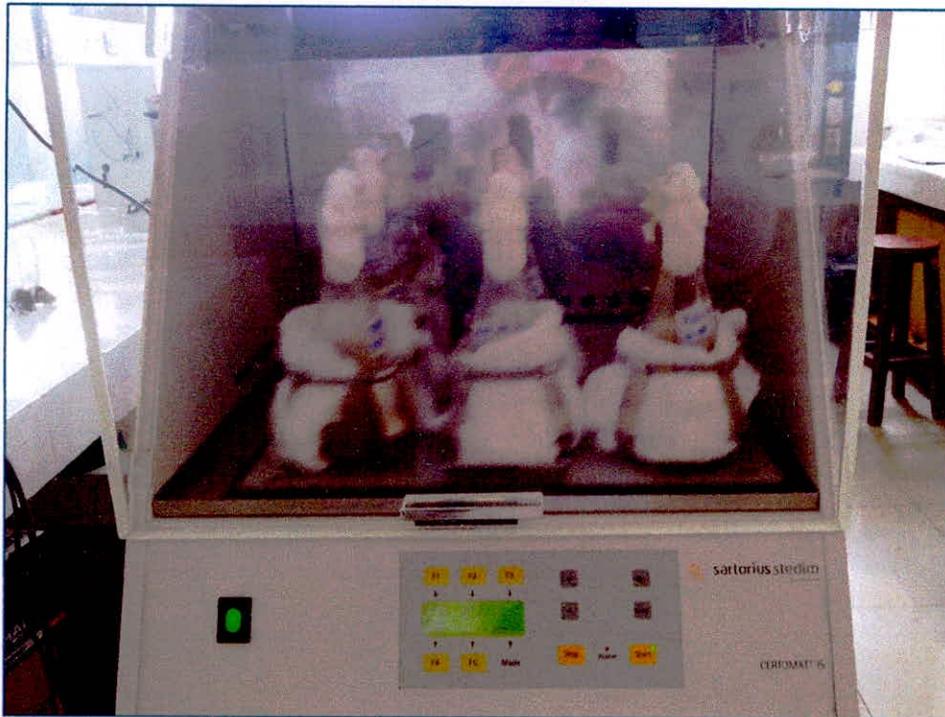


Figura 15. Procedimiento de Medio de Fermentacion.

Anexo 5: Técnicas de análisis

Anexo 5.1. Optimización de la aireación y concentración de extracto en el medio de fermentación para determinar la actividad.

a) Procedimiento para sustrato sacarosa.

1. Preparar 6 ml de enzima diluida 1 en 3 , en diferentes frascos.
2. Preparar:
 - 2 tubos de enzima
 - 1 tubo blanco sustrato
 - 1 tubo blanco enzimático
3. Colocar los tubos 1 por 1 en baño maría y agregar los 0.250ml de enzima y tampón a los 3 minutos de estar en baño maría.
4. Dejar actuar la enzima por 10 minutos en baño maría, luego pasar al agua hirviendo por 3 minutos y luego pasar a un deposito con hielo, el blanco enzimático será por 5 minutos.
5. Repetir la experiencia para cada fermentación efectuada..
6. Medir actividad enzimática por DNS.

Tabla 30. Optimización de la aireación y concentración de extracto en el medio de fermentación para maximizar la actividad enzimática sobre sacarosa.

| Tiempo | Descripción | M1 | M2 | Blanco sustrato | Blanco Enzimático |
|---------|----------------------|----|----|-----------------|-------------------|
| 3 min. | Ingreso a baño maría | | | | |
| 10 min. | Agregar enzima | | | | |
| 3 min. | Calor Salida | | | | |
| | • Absorbancia | | | | |

b) Procedimiento para sustrato inulina.

1. Preparar 6 ml de enzima, en diferentes frascos.
2. Preparar:
2 tubos de enzima
1 tubo blanco sustrato
1 tubo blanco enzimático
3. Colocar los tubos 1 por 1 en baño maría y agregar los 0.250ml de enzima y tampón a los 3 minutos de estar en baño maría.
4. Dejar actuar la enzima por 10 minutos en baño maría, luego pasar al agua hirviendo por 3 minutos y luego pasar a un depósito con hielo, el blanco enzimático será por 5 minutos.
5. Repetir la experiencia para cada fermentación.
6. Medir actividad enzimática por DNS

Tabla 31. Optimización de la aireación y concentración de extracto en el medio de fermentación para maximizar la actividad enzimática sobre inulina.

| Tiempo | Descripción | M1 | M2 | Blanco sustrato | Blanco Enzimático |
|---------|----------------------|----|----|-----------------|-------------------|
| 3 min. | Ingreso a baño maría | | | | |
| 10 min. | Agregar enzima | | | | |
| 3 min. | Calor | | | | |
| | Salida | | | | |
| | • Absorbancia | | | | |

Anexo 5.2. Proceso para obtención de actividad enzimática.

a) Proceso para obtención de actividad volumétrica.

Análisis de Azúcares reductores por DNS (ácido dinitrosalicílico).

Para realizar este procedimiento primero se debe llevar a cabo una hidrólisis con la finalidad de obtener azúcares reductores.

Se precisa realizar los siguientes pasos para el análisis de la muestra:

- Se añade 0.5mL de reactivo DNS a un 0.5mL de muestra a analizar.
- Se mantiene la mezcla en baño de agua a ebullición durante 5 minutos para luego enfriar con agua helada.
- Se añaden 5 ml de agua destilada, y se deja reposar por 10 minutos, luego agitar.
- Se lee la absorbancia a 540 nm, utilizando agua como blanco.
- La concentración se obtiene interceptando la medida de absorbancia en la curva de calibrado.

La curva de calibrado para el azúcar se obtiene a partir de muestra de concentración conocida y analizadas según este procedimiento.

Tabla 32. Curva de calibrado para DNS.

| Nº | Volumen estándar | Volumen de Agua | Azúcares Reductores | Abs |
|----|------------------|-----------------|---------------------|-----|
| 1 | 0.25 | 0.25 | 1 | |
| 2 | 0.2 | 0.3 | 0.8 | |
| 3 | 0.125 | 0.375 | 0.5 | |
| 4 | 0.1 | 0.4 | 0.4 | |

| | | | |
|---|------|------|-----|
| 5 | 0.05 | 0.45 | 0.2 |
| 6 | 0 | 0.5 | 0 |

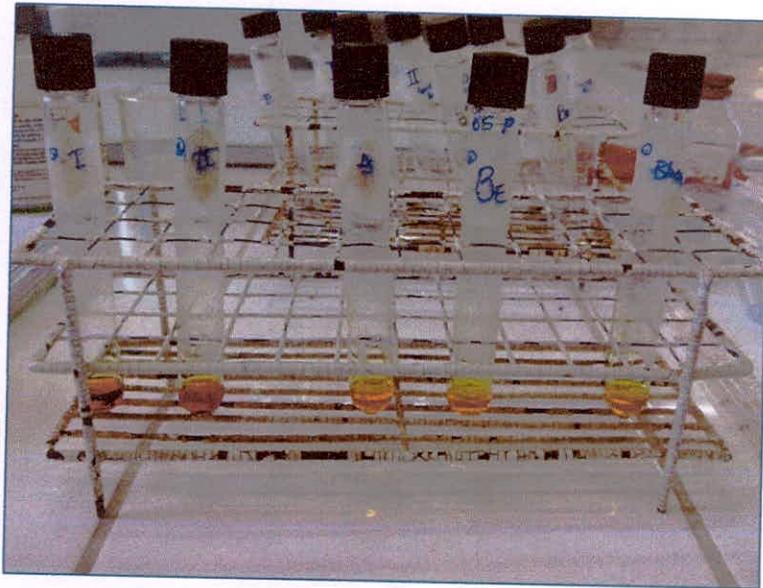


Figura 24. Procedimiento de azúcares reductores para actividad volumétrica.

Anexo 5: Curva de Calibrado

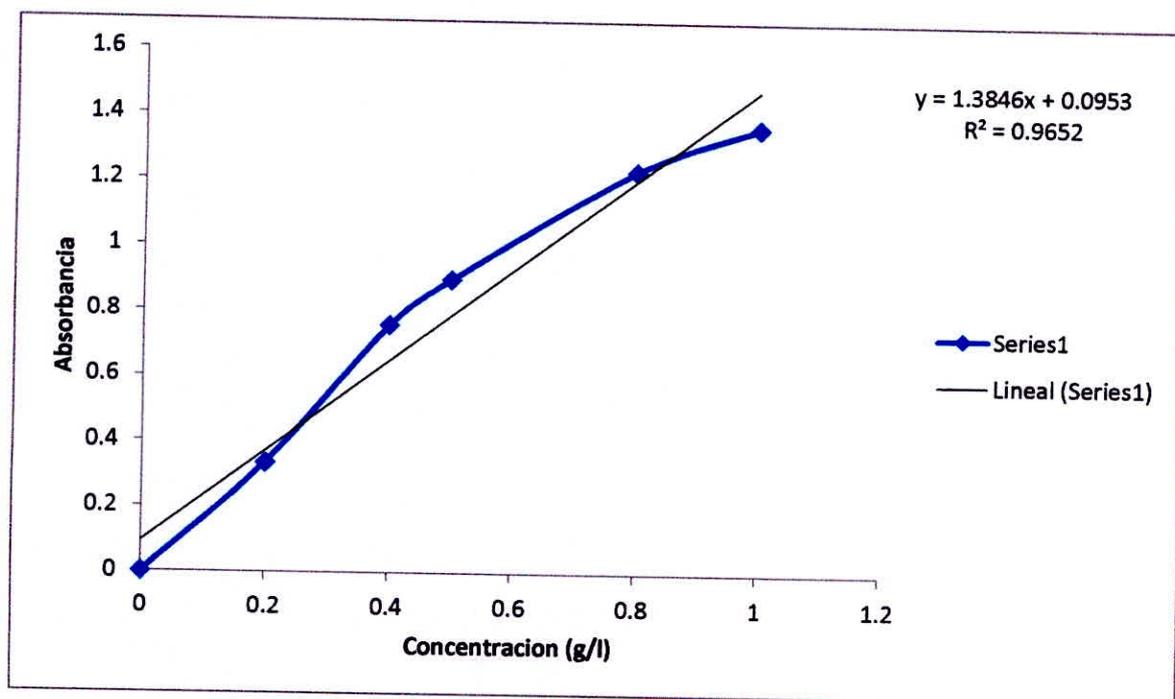


Grafico 14. Curva de calibración para la determinación de concentración de azúcares reductores,