


UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
ESCUELA DE POST GRADO

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
DOCTOR EN INGENIERÍA BIOQUÍMICA:

**“OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS AMBIENTALES DE LA
FERMENTACIÓN DE *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y-7571 PARA
LA PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE INULINASA”**

TESISTA: Augusto Castillo Calderón

ASESOR: Rolando A. Chamy Maggi



Aval Asesor

Nuevo Chimbote, Septiembre 2013

PERÚ

FICHA CATALOGRÁFICA

CASTILLO CALDERÓN AUGUSTO

TÍTULO:

“OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS AMBIENTALES DE LA FERMENTACIÓN DE *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y-7571 PARA LA PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE INULINASA”

TESIS DE DOCTORADO, ESCUELA POSTGRADO DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

ASESOR:

DR. Rolando A. Chamy Maggi

1. Optimización, inulinasa
2. *Kluyveromyces marxianus*

DEDICATORIA

A mis amores: Raquel mi esposa y compañera de toda la vida; Greta Magaly, Adrián Augusto y Ximena Raquel mis hijos, quienes con su amor, sus proyectos de vida, paciencia y su alegría radiante, motivaron la culminación de estos estudios.

A mis queridos padres Fernando e Inés, que gracias a Dios se conservan con salud, sembraron en mi un espíritu de superación, perseverancia y de triunfo.

A mis hermanos: César, Maruja, Fernando, Josefina, Adán, Julia y Nila y a cada una de sus familias. A mis suegros: Hildebrando y Wilma, siempre alegres y cariñosos, a mis cuñados y sus familias. A toda la familia siempre unida en la generosidad, en el amor y en la fe en Cristo Jesús.

AGRADECIMIENTO

Soy un creyente y convencido que solos no podemos alcanzar nuestros mejores y más altos propósitos, gracias a Dios Padre por haberme permitido enrumbar, disfrutar y compartir durante estos siete años, estas bellas experiencias, dándome tiempo preciado para conocerte más, tiempo para descubrir y transmitir nuevos conocimientos, amar mas a mi familia, fortalecerme con el amor de hermanos espirituales, recibir la fraternidad de colegas y alumnos, contactar con personas y clima de países de otros continentes, etc.

Por todo ello, debo mencionar nombres de personas e instituciones que han quedado grabadas en mí ser con sumo agradecimiento: A Robert Contreras Salomón por su apoyo y amistad hasta el final, a Williams Castillo presto a asesorarme con el software en diseños experimentales; a Bernardo Yépez S.; a Roberto Vega Paulino por la revisión preliminar y especializada del informe de tesis, a Flor Vargas y Berenice Córdova por estar siempre dispuestas a apoyar en el trabajo de laboratorio, a los compañeros profesores y alumnos de la Escuela de Ingeniería Agroindustrial mi centro específico de trabajo docente.

Me place agradecer a la Universidad Nacional del Santa por la calidad de esta primera promoción doctoral internacional, garantizada por sus profesores: Rejane M. Ghisolfi da Silva y José R. Damas Garlipp de la Universidad Federal Uberlandia – Brasil; Jorge Martínez Collantes de la Universidad Nacional de Colombia y Raúl J. Conejeros Risco de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso – Chile. Así como también agradecer por la media beca de estudios concedida.

Agradecer al CONCYTEC por su apoyo para difundir con presentación oral, los avances de la investigación doctoral en dos Congresos Mundiales: en el 43rd IUPAC World Chemistry Congress en San Juan - Puerto Rico (2011) y en el 9th World Congress of Chemical Engineering en Seúl – Corea del Sur (2013).

Agradecer muy de veras a mi Jurado Evaluador de Tesis, distinguidos Ingenieros Químicos, profesores de la Escuela de Postgrado de la Universidad Nacional de Trujillo: Dr. Pascual A. Castillo Valdiviezo, Dr. Guillermo D. Evangelista Benites y Dr. Jorge E. Flores Franco, por sus valiosos aportes a la mejora del informe y brindarme su tiempo.

Mi siempre agradecimiento especial al Dr. Rolando A. Chamy Maggi, Ingeniero Bioquímico, profesor titular de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso (PUCV) por haber aceptado guiarme en este trabajo de tesis doctoral, por su confianza y amistad como lo fue antes también en la PUCV, asesor en mis estudios del Magister. A todos de corazón: muchas gracias.

INDICE GENERAL

	Página
DEDICATORIA	
AGRADECIMIENTO	
INDICE GENERAL	
INDICE DE TABLAS	
INDICE DE FIGURAS	
INDICE DE ANEXOS	
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
CAPITULO I	3
INTRODUCCION	3
1.1. REALIDAD PROBLEMÁTICA	3
1.2. ESTADO DEL ARTE DEL TEMA DE LA INVESTIGACIÓN	6
1.3. CARACTERIZACIÓN Y NATURALEZA DEL OBJETO DE INVESTIGACIÓN	23
1.4. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	25
1.5. FORMULACIÓN DE LA HIPÓTESIS	25
1.6. FORMULACIÓN DE LOS OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	26
1.7. IMPORTANCIA Y JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	27
CAPITULO II	29
MARCO TEÓRICO	29
2.1. FUNDAMENTOS FILOSÓFICOS TEÓRICOS DE LA INVESTIGACIÓN	29
2.2. MARCO CONCEPTUAL.	29
DEFINICIÓN DE TÉRMINOS BÁSICOS	29
PLANTEAMIENTO DE ACTIVIDADES DE LA INVESTIGACIÓN	35
CAPITULO III	38
METODOLOGÍA EMPLEADA	38
3.1. MÉTODOS EMPLEADOS EN LA INVESTIGACIÓN	38
3.2. METODOLOGÍA PARA LA PRUEBA DE LA HIPÓTESIS	38
3.3. TECNICAS E INSTRUMENTOS EMPLEADOS.	42

3.4.	PROCEDIMIENTO DE LA RECOLECCIÓN DE DATOS.	50
	CAPITULO IV	57
	DESARROLLO DEL ANÁLISIS, INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN.	57
4.1.	CARACTERIZACIÓN DE LOS EXTRACTOS DE YACÓN Y ESPÁRRAGO.	57
4.2.	CULTIVOS POR LOTES PRELIMINARES	58
4.3.	ACTIVIDAD Y PARÁMETROS CINÉTICOS ENZIMÁTICOS.	66
4.4.	PLANEAMIENTO EXPERIMENTAL: SELECCIÓN DE VARIABLES SIGNIFICATIVAS UTILIZANDO UN DISEÑO DE Plackett & Burman.	71
4.5.	MAYOR OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES SIGNIFICATIVAS UTILIZANDO EL DCCR Y LA RSM	77
4.6.	VALIDACIÓN DEL MODELO EXPERIMENTAL	101
4.7	EXPERIMENTO CONFIRMATIVO EN EL FERMENTADOR BIostat-M	102
4.8.	CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE LA INULINASA EN EL EXTRACTO CRUDO.	104
	CAPITULO V	107
	CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS.	107
5.1.	CONCLUSIONES	107
5.2.	SUGERENCIAS	109
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110
	ANEXOS	117

INDICE DE TABLAS

	Página
1. Cepas de <i>Kluyveromyces marxianus</i> y rendimientos en inulinasa	17
2. Definición de variables en el Diseño de Plackett- Burman en la fermentación de <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL-Y-7571 para la producción de inulinasa en extracto crudo.	40
3. Plan Experimental según el Diseño de Plackett & Burman para la selección de variables de la fermentación de <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL-Y-7571 para la producción de inulinasa en extracto crudo.	40
4. Composición de medios de cultivo para <i>K. marxianus</i> para la producción de inulinasa.	45
5. Composición química de los extractos de yacón y espárragos ajustados a pH 4,0 y esterilizados.	57
6. Valores de actividad volumétrica a_v , específica a_e y actividad por volumen de reacción a_{reac} , del extracto enzimático del caldo de fermentación de <i>K. marxianus</i> actuando sobre sacarosa, rafinosa e inulina.	68
7. Valores de los parámetros cinéticos aparentes del extracto enzimático del caldo de fermentación de <i>K. marxianus</i> actuando sobre sacarosa, rafinosa e inulina.	70
8. Definición de variables y niveles utilizados en el Diseño Plackett - Burman en la fermentación de <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL-Y-7571 para la producción de inulinasa en extracto crudo.	72
9. El diseño experimental utilizando el método de Plackett-Burman para la selección de variables y actividades volumétricas de la inulinasa en el extracto crudo.	73
10. Analisis de varianza de todas las variables según el diseño experimental de Plackett-Burman.	74
11. Porcentaje de contribución de todas las variables a la variable respuesta.	75
12. Analisis de varianza de cinco variables preseleccionadas según el diseño experimental de Plackett-Burman.	76
13. Valores de variables independientes a diferentes niveles del diseño	78

experimental DCCR.

14. Matriz del Diseño Compuesto Central Rotacional para las variables independientes en su forma codificada y natural. 78
15. Diseño experimental de las tres variables y las respuestas observadas. 79
16. Analisis de Varianza (ANOVA) para el modelo de segundo orden de la respuesta actividad volumetrica de inulinasa respecto a inulina. 82
17. Analisis de Varianza (ANOVA) para el modelo **reducido** de segundo orden de la respuesta actividad volumetrica de inulinasa respecto a inulina. 85
18. Coeficientes de regresión y significancia del modelo de regresión de segundo orden, de la actividad volumetrica de inulinasa respecto a inulina. 86
19. Valores óptimos determinados a partir del modelo matemático experimental, actividad inulinasa, ajustado para las experiencias de validación. 86
20. Análisis de Varianza (ANOVA) para el modelo de segundo orden de la respuesta actividad volumetrica de inulinasa respecto a **sacarosa**. 92
21. Analisis de Varianza (ANOVA) para el modelo reducido de segundo orden de la respuesta actividad volumetrica de inulinasa respecto a **sacarosa**. 94
22. Coeficientes de regresión y significancia del modelo reducido de regresión reducido de segundo orden, de la actividad volumetrica de inulinasa respecto a **sacarosa**. 95
23. Valores óptimos determinados a partir del modelo matemático experimental ajustado, respuesta actividad **invertasa**, para las experiencias de validación. 96
24. Valores de actividad volumétrica a_v , específica a_e y actividad por volumen de reacción a_{reac} , del extracto enzimático del caldo de fermentación de *K. marxianus* actuando sobre sacarosa, rafinosa e inulina. 105
25. Valores de los parámetros cinéticos aparentes del extracto enzimático del caldo de fermentación de *K. marxianus* actuando sobre sacarosa, rafinosa e inulina. 106

INDICE DE FIGURAS

	Página
1. Estructura química de la inulina.	8
2. Células de lavadura <i>Kluyveromyces marxianus</i> creciendo en glucosa, bajo condiciones aeróbicas, cultivadas en matraces y en <i>shaker</i> a 45°C y 120 rpm.	12
3. Esquema hipotético para el mecanismo de acción de la inulinasa sobre la inulina.	20
4. Planteamiento de actividades de la investigación.	36
5. Extracto de yacón.	44
6. Extracto de espárrago.	44
7. Cultivo en matraz en el shaker.	53
8. Cultivo en el fermentador.	53
9. Sistema experimental para determinar los parámetros cinéticos de la inulinasa.	56
10. Cinética de crecimiento celular y producción de proteínas de <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL-Y7571 durante 30 horas en un medio de cultivo con sacarosa 10 g/L.	59
11. Cinética de crecimiento celular y producción de proteínas de <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL-Y7571 durante 30 horas en un medio de cultivo con inulina 10 g/L.	60
12. Cinética de crecimiento celular y producción de proteínas de <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL-Y7571, durante 30 horas en un medio de cultivo con extracto de espárrago al 30% (v/v).	61
13. Cinética de crecimiento celular y producción de proteínas de <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL-Y7571 durante 30 horas en un medio de cultivo con extracto de yacón al 50% (v/v).	62
14. Cinética de crecimiento celular y producción de proteínas de <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL-Y7571 durante 30 horas en un medio de cultivo sin fuente de	63

carbono específica (control).

15. Cinética de crecimiento celular y producción de proteínas de *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y7571 y variación del pH, fermentando durante 30 horas en un medio de cultivo con inulina 10 g/L. 65
16. Perfiles de rango de linealidad y actividad del extracto enzimático (diluciones: 1:01; 1:02 y 1:04) actuando sobre sacarosa. 66
17. Perfiles de rango de linealidad y actividad del extracto enzimático (diluciones: 1:01; 1:04 y 1:06) actuando sobre rafinosa. 67
18. Perfiles de rango de linealidad y actividad del extracto enzimático (diluciones: 1:01; 1:04 y 1:06) actuando sobre inulina. 67
19. Líneas de tendencia de mediciones de velocidad inicial de reacción a diferentes concentraciones de **sacarosa** (3,64 – 17,58 g/L) catalizada por el extracto crudo enzimático diluido 1:5. 69
20. Líneas de tendencia de mediciones de velocidad inicial de reacción a diferentes concentraciones de **rafinosa** (2,73 – 13,18 g/L) catalizada por el extracto crudo enzimático diluido 1:6. 69
21. Líneas de tendencia de mediciones de velocidad inicial de reacción a diferentes concentraciones de **inulina** (1,82 – 8,79 g/L) catalizada por el extracto crudo enzimático diluido 1:1. 70
22. Grafico de Pareto de los valores de los efectos estandarizados para la actividad volumétrica de inulinasa (U/mL) respecto a inulina, a las 30 horas de fermentación de *K. marxianus*. Las variables independientes (codificadas) fueron Extracto de yacon (x_1), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (x_2) y tamaño de inóculo (x_3). 80
23. Grafico de Pareto de los valores de los efectos estandarizados del **modelo reducido** para la actividad volumétrica de Inulinasa (U/mL) respecto a inulina, a las 30 horas de fermentación de *K. marxianus*. La variables independientes (codificadas) fueron Extracto de yacón (x_1), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (x_2) y tamaño de inóculo (x_3). 84
24. Planos de superficie de respuesta y de contorno a 30 h de fermentación de *K.marxianus* para la actividad volumétrica de inulinasa como función del extracto de yacón y del $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, tamaño de inóculo 4,28 %v/v. 88
25. Planos de superficie de respuesta y de contorno a 30 h de fermentación de *K.marxianus* para la actividad volumétrica de inulinasa como función del 89

extracto de yacón y del tamaño de inoculo, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,386 g/h.

26. Planos de superficie de respuesta y de contorno a 30 h de fermentación de *K.marxianus* para la actividad volumétrica de inulinasa como función del $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y del tamaño de inoculo, extracto de yacón 26,197 %v/v. 90
27. Grafico de Pareto de los valores de los efectos estandarizados para la actividad volumétrica de inulinasa (U/mL) respecto a **sacarosa**, a las 30 horas de fermentación de *K. marxianus*. Las variables independientes (codificadas) fueron Extracto de yacon (x_1), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (x_2) y tamaño de inoculo (x_3). 91
28. Grafico de Pareto de los valores de los efectos estandarizados del modelo reducido para la actividad volumétrica de Inulinasa (U/mL) respecto a **sacarosa**, a las 30 horas de fermentación de *K. marxianus*. La variables independientes (codificadas) fueron Extracto de yacon (x_1), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (x_2) y tamaño de inoculo (x_3). 93
29. Planos de superficie de respuesta y de contorno a 30 h de fermentación de *K.marxianus* para la actividad volumétrica como invertasa, como función del extracto de yacón y del $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, tamaño de inoculo 9,37 %v/v. 97
30. Planos de superficie de respuesta y de contorno a 30 h de fermentación de *K.marxianus* para la actividad volumétrica como invertasa, como función del extracto de yacón y del tamaño de inoculo, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,43 g/L. 99
31. Planos de superficie de respuesta y de contorno a 30 h de fermentación de *K.marxianus* para la actividad volumétrica como invertasa, como función del $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y del tamaño de inoculo, extracto de yacón 28,72 %v/v. 99
32. Cinética de crecimiento celular y producción de inulinasa por fermentación de *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y7571 durante 48 horas en las condiciones optimizadas para la actividad inulinasa. 102
33. Cinética de crecimiento celular y producción de inulinasa por fermentación de *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y7571 durante 48 horas en las condiciones optimizadas para la actividad inulinasa. 103

INDICE DE ANEXOS

	Página
ANEXO 1: Curva de calibración para la determinación de concentración de celular.	117
ANEXO 2: Curva de calibración para la determinación de concentración de azúcares reductores, en términos de fructosa, por el método del ácido dinitrosalicílico (DNS)	118
ANEXO 3: Curva de calibración para la determinación de proteínas por el método de Bradford	119
ANEXO 4: Cromatograma para la determinación de etanol	120
ANEXO 5: Cromatograma para la determinación de sacáridos en extracto de yacón	121
ANEXO 6: Cromatograma para la determinación de sacáridos en extracto de espárrago	122
ANEXO 7: Formato para la determinación de parámetros cinéticos de la inulinasa.	123

RESUMEN

La inulinasa (2,1- β -D fructano fructanohidrolasa (EC 3.2.1.7)) es una enzima que cataliza la hidrólisis de inulina a jarabe de fructosa de alta pureza, en un solo paso de reacción.

El objetivo general del estudio fue, determinar los valores óptimos de los parámetros ambientales de la fermentación de *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y-7571 para la producción y caracterización cinética de la inulinasa del extracto crudo actuando sobre sacarosa, rafinosa e inulina, respectivamente.

La estrategia experimental de optimización se basó en cuatro etapas secuenciales: el diseño de Plackett & Burman, el diseño compuesto central rotacional, la metodología de la superficie de respuesta y la validación de las condiciones optimizadas.

Los valores óptimos de los parámetros ambientales fueron: 26,2 %v/v de extracto de yacón, 0,386 g/L de $MgSO_4$ y 4,3 %v/v tamaño de inóculo; correspondiendo a una actividad de inulinasa máxima predicha de 2,2 U/mL y actividad invertasa 93,6 U/mL.

Con la validación, se alcanzaron actividades de inulinasa de 2,32 U/mL e invertasa de 78,3 U/mL. Con las experiencias confirmativas se alcanzo una actividad inulinasa de 1,8 U/mL.

Se concluyó que utilizando el plan experimental de optimización fue posible determinar los parámetros ambientales óptimos para una alta producción de inulinasa por *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y-7571.

Palabras claves: Optimización, inulinasa, *Kluyveromyces marxianus*

ABSTRACT

The inulinase (2.1 - β -D fructan fructanohydrolase (EC 3.2.1.7)) is an enzyme that catalyzes the hydrolysis of inulin to fructose syrup of high purity, in a single reaction step.

The study overall objective was to determine the optimal values of the environmental parameters of the fermentation of *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y-7571 for the production and kinetic characterization of the crude extract inulinase acting on sucrose, raffinose and inulin, respectively.

The experimental strategy of optimization was based in four sequential steps: the Plackett & Burman design, the rotational central composite design, the surface response methodology and the validation of optimized conditions.

The optimum values of environmental parameters were: 26,2 % v/v yacon extract, 0,386 g/L MgSO₄ and 4,3 % v/v inoculum size, corresponding to a predicted maximum inulinase activity of 2,2 U/mL and invertase activity of 93,6 U/mL.

In the validation, activities were achieved, inulinase 2,32 U/mL and invertase 78,3 U/mL. With these confirmatory experiences the inulinase activity was reached on 1, 8 U/mL.

It was concluded that using an optimization experimental plan was possible to determine the optimal environmental parameters for a producing high of inulinase by *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y-7571.

Key words: Optimization, inulinase, *Kluyveromyces marxianus*

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

1.1. REALIDAD PROBLEMÁTICA

La fructosa es un monosacárido presente principalmente en un gran número de frutas, particularmente en las manzanas y los tomates. Es el azúcar natural más edulcorante (Voet y Voet 1994), debido a ello en el mundo está compitiendo con la sacarosa la cual causa problemas de obesidad, arteriosclerosis y diabetes (Rocha, Catana, Ferreira, Cabral y Fernandes, 2006). Hasta la actualidad la fructosa se obtiene en forma industrial por un proceso convencional a partir de almidón, el cual incluye la acción sucesiva de tres enzimas: α -amilasa, amiloglucosidasa y glucosa isomerasa, rindiendo solamente 45% de fructosa en el producto final, por las fuertes limitaciones termodinámicas que elevan el costo de producción (Chen H, Chen X, Chen T, Xu X y Jin, 2011).

Durante las tres últimas décadas se ha desarrollado una nueva idea de producción de fructosa: por hidrólisis enzimática de inulina (fructano, encontrado en muchas plantas como oligosacárido almacenado) (Seminario, Valderrama y Manrique 2003; Valentová et al. 2006 y Rocha et al. 2006) catalizada por la enzima inulinasa. Este proceso de un solo paso rinde concentraciones de fructosa por sobre el 95% (Cazetta, Martins, Monti y Contiero, 2005; Sangeetha, Armes y Prapulla 2005 y Leite, Murr, Martinelli, Dal y Park 2007). También recientemente se ha publicado la habilidad de la inulinasa de catalizar la síntesis de fructooligosacáridos FOS, que son carbohidratos con propiedades funcionales y nutricionales de utilidad en alimentos (Vega y Zúñiga-Hansen, 2011).

La inulinasa puede obtenerse de plantas y por fermentación de muchos microorganismos, siendo estos últimos los que tienen mayor aplicación industrial. Lo que distingue a las enzimas producidas por diferentes microorganismos es el rendimiento (unidades de actividad / ml de caldo de cultivo) de la enzima obtenida y la propiedad de la enzima, las cuales dependen no solamente de la clase de microorganismo utilizado, sino

también del modo o de las condiciones ambientales de fermentación llevada a cabo.

El rendimiento enzimático y su localización de la actividad enzimática son determinados por la clase de microorganismos y las fuentes usadas como sustrato durante la fermentación.

En cultivos de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* en cuatro fuentes de carbono, en matraces de 250 mL, con 50 mL de medio líquido, 30°C, pH 4,5 y 200 rpm durante 72 horas y después de las etapas de purificación de la enzima inulinasa, se obtuvieron los siguientes valores de actividades específicas: 170; 35,5; 59,5 y 94,2 U/mg con inulina, sacarosa, glucosa y fructosa como fuentes de sustrato respectivamente, alcanzándose el mayor valor de actividad con inulina (Kushi, Monti y Contiero 2000).

En otro reporte (Cazetta et al. 2005) se investigó la producción de inulinasa por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045 creciendo en extracto de yacón, siendo óptimo el pH de 3,5, un factor que influyó fuertemente en la actividad y a la temperatura de 60 °C, alcanzándose un valor de actividad de 4,1 U/mL.

Por otra parte, turiones de espárragos fueron utilizados como fuente de inulina para la producción de inulinasa por fermentación de *K. marxianus* YS-1 en un reactor de 1,5 L, a 200 rpm y 0,75 vvm, alcanzándose una actividad de 50.2 U/mL rendimiento de casi seis veces más que con el medio basal usado inicialmente en matraces Erlenmeyer, sugiriéndose utilizar este recurso vegetal como una fuente barata de inulina para la producción de inulinasa, por su abundante disponibilidad en el mundo (Sing y Bhermi, 2008).

De los valores de rendimientos máximos antes mostrados, se observan muy dispersos, aunque se nota que la fuente de inulina como el extracto de alcachofa Jerusalén dio el más alto valor.

También se han reportado ensayos de caracterización de la inulinasa en el caldo crudo y también con la enzima purificada pero básicamente de fermentaciones de medios químicos definidos (Rouwenhorst, Hensing, Verbakel, Scheffers y Van Dijken 1990 ; Rocha et al. 2006 y Chen et al. 2009).

En general por lo expuesto, en esta investigación se estudió la siguiente realidad problemática:

“Rendimiento o actividad catalítica y caracterización de la enzima inulinasa de un caldo crudo, en función a la optimización de los parámetros ambientales de la fermentación por lotes de *Kluyvermyces marxianus* NRRL-Y-7571”

Esta realidad problemática posee las siguientes características:

a.- Conociéndose que las cepas de *Kluyvermyces marxianus*, tienen la calificación de seguras para ser utilizadas en la industria de alimentos, sin embargo no se ha sistematizado la información de los últimos 20 años, que dé cuenta del mejoramiento de la producción de la enzima inulinasa por fermentación.

b.- Si bien existen algunos reportes de producción de inulinasa por fermentación, de extractos de fuentes nutrientes sintéticos por distintos microorganismos (levaduras y mohos principalmente), todavía no existen suficiente información sobre el uso del yacón y del espárrago productos nacionales, como fuente vegetal de carbono y energía en la fermentación.

c.- No existe información de la evaluación del efecto de un conjunto amplio de parámetros o condiciones ambientales (Composición del medio líquido, tamaño del inóculo de células, pH, temperatura y velocidad de agitación) en la fermentación líquida de *K. marxianus* sobre el rendimiento y característica cinética de la enzima inulinasa de un caldo crudo de fermentación.

1.2. ESTADO DEL ARTE DEL TEMA DE LA INVESTIGACIÓN

La inulinasa es una enzima caracterizada por hidrolizar la inulina en fructosa prácticamente pura, ampliamente usada en la industria de alimentos como edulcorante dietético con un poder de dulzor de 1.5 a 2 veces la sacarosa (Ricca et al. 2007).

De ahí el interés por su estudio para producirla, purificarla y caracterizarla a partir de cultivos microbianos en medios sintéticos, siendo las levaduras *Kluyveromyces marxianus* las más estudiadas. Recientemente se han publicado estudios de la producción de inulinasa por fermentación de *Kluyveromyces marxianus* en extractos de yacón, de espárragos y de tubérculos de dalia, respectivamente con altos rendimientos de actividad enzimática (Caseta et al. 2005; Singh et al. 2008 y Singh et al.2007b).

Por tanto es necesario determinar recientes evidencias de mejoramiento de la producción de inulinasa por fermentación de *Kluyveromyces marxianus*, ya sea descubriendo nuevas cepas salvajes de esta levadura, obteniendo otras por inserción molecular u optimizando los componentes del medio de cultivo con nutrientes tanto sintéticos orgánicos e inorgánicos y sustratos complejos como el extracto de yacón y evaluando las condiciones del cultivo microbiano como son la temperatura, el pH y la velocidad de agitación del medio de cultivo.

En esta sección, se trata de determinar el avance científico y tecnológico de la fermentación de cepas de *Kluyveromyces marxianus*, para la producción de inulinasa logrados en los últimos veinte años, desde la información a escala de laboratorio como a escala piloto, que permita tener una visión completa del sistema teórico y del conocimiento científico tema de tesis.

En tal sentido, el trabajo comprendió el estudio de las materias primas fuentes de inulina, microorganismos productores de inulinasa, con énfasis a

la producción por fermentación de cepas *Kluyveromyces marxianus* y la determinación de las características y propiedades de la enzima.

- Sustratos fuentes 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 (Cazeta et al. 2005; Rocha et al. 2006; Sangeetha et al. 2005 y Sing y Bhermi 2008). La inulina puede ser usada ampliamente en alimentos así como en las industrias alimentaria, farmacéutica, química y biocombustibles (Chi et al. 2011).

La inulina es un fructano, un polisacárido almacenado en muchas plantas y consiste de una cadena lineal de enlaces β -D- (2-1) fructosil-fructosa; al final de la molécula está presente un residuo de glucosa a través de un enlace tipo sacarosa. En la figura 1 se muestra la estructura química de la inulina, en la primera se representa con una molécula terminal de glucosa β -D-glucopiranosil y en la segunda con una molécula terminal de fructosa β -D-fructopiranosil (Franck y Deleenheer, 2006). 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 por ello como un polifructano con un grado de número de polimerización de unidades poliméricas DP de al menos 30 (Pedreschi et al. 2003; Ricca et al. 2007 y Seminario et al. 2003).

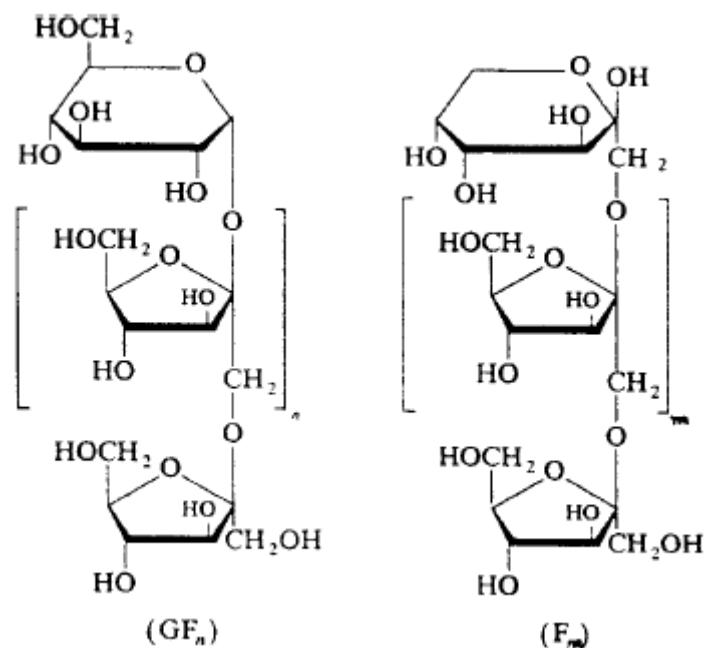


Figura 1. Estructura química de la inulina (Franck y Deleenheer, 2006).

Por ello, la hidrólisis completa de la inulina resulta en la formación de fructosa y glucosa con una razón 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 y jerusalem alcachofa, con un promedio de DP de alrededor 27-29. Recientemente 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 y Siomos et al. 2010).

Por otra parte una propiedad limitante del uso de inulina es su baja solubilidad en agua, como los valores que se muestran a continuación de alrededor 6% a 10 °C y 35 % a 90 °C. Sin embargo el proceso de extracción desde los vegetales es algo sencillo como se puede apreciar en los casos de producción de extracto de yacón y concentrado de inulina de raíces de achicoria y dalia y tubérculos de espárragos (Leite et al. 2007; Ricca et al. 2007; Sing y Bhermi 2008 y Kango 2008).

Ricca et al. (2007) muestran los contenidos de inulina de algunos vegetales, comúnmente usados como alimentación humana como por ejemplo la cebolla, alcachofa, ajo, plátano, achicoria, etc., observándose que los que tienen mayor contenido de inulina son la alcachofa Jerusalem y la chicoria de 19 y 20 % peso fresco respectivamente. Los rendimientos en inulina de las raíces y tubérculos son altos. Los tubérculos secos contienen sobre el 70% de inulina (Pandey et al. 1999).

Sin embargo la mayoría de cualquiera de las plantas investigadas es costosa o tiene limitada disponibilidad, mientras que los espárragos son raíces de hierbas perennes que contienen inulina sobre el 15% y la producción anual mundial de esta planta es más alta que 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 lo barato que signifique las materias primas (Sing y Bhermi 2008).

Correspondientemente, el yacón considerada en Europa como una nueva fuente de oligosacáridos prebióticos y en Sudamérica un alimento tradicional y relativamente barato, con un estatus de uso seguro (Ojansivu, Ferreira y Salminen, 2011) y la presencia de inulina en un 27% base seca en tubérculos de yacón (*Smallanthus sonchifolius*), aumenta el interés de estudiar este vegetal como sustrato para el crecimiento de microorganismos que usen este polisacárido para producir inulinasa (Cazetta 2005, Madrigal y Sangronis 2007 y Chi et al., 2011).

Se aprecia que estas fuentes de inulina han recibido especial atención en la investigación como materias primas renovables, para la producción de bioetanol, inulo oligosacáridos 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 después de un solo paso de hidrólisis enzimática, rinde hasta 95% de fructosa pura (Chi et al. 2009 y Ricca et al. 2007).

- Enzimas inulinasa

Las enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces β -D-(2-1)-fructosídicos en la inulina originando fructosa y glucosa se le denomina inulasa o β -D-(2-1)-fructano fructohidrolasa (E.C. 3.2.1.7), comúnmente conocida como inulinasa, perteneciendo al grupo de clasificación de enzimas hidrolasas glicosidasas (Kushi et al. 2000 y Laloux et al. 1991).

Las enzimas inulinasas se pueden dividir en exoinulinasas y endoinulinasas. Las exoinulinasas catalizan la remoción de las unidades de fructosa desde la primera hasta el final de la cadena con la hidrólisis del residuo de sacarosa. Las endoinulinasas catalizan la hidrólisis de los enlaces internos de la molécula de inulina, originando inulotriosa, inulotetrosa e inulopentosa (Inulooligosacáridos, IOS) sin actividad invertasa para hidrolizar el residuo de sacarosa (Rouwenhorst et al. 1990 y Sing, et al. 2007a).

La inulinasa puede ser obtenida a partir de especies vegetales y de muchos microorganismos, siendo los últimos capaces de producir suficiente enzima para aplicaciones industriales. Por esta razón en éstas tres últimas décadas se han realizado esfuerzos significativos por encontrar u obtener la mejor fuente microbiana para la producción de inulinasa, incluyendo hongos filamentosos (Otha et al. 2004 y Chen et al. 2011), levaduras (Rouwenhorst et al. 1988; Sing et al. 2007; Zhang et al. 2009, Yu et al. 2009 y Golunski et al. 2011) y bacterias (Zherebtsov et al. 2003 y Ricca et al. 2007).

- Microorganismos productores de inulinasa

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 las propiedades de la enzima que dependen de la clase de microorganismo usado, del modo de fermentación, del medio de cultivo y las condiciones ambientales (Gresham y Inamine 1986; Hensing et al. 1995; Liu et al. 2005 y Xiong et al. 2007)).

Muchas cepas de mohos, levaduras y bacterias son capaces de producir inulinasa y varios de ellos han sido cultivados con éxito y la enzima extraída, concentrada y purificada, como lo reportado en sendas publicaciones de revisión (Chi et al. 2009; Pandey et al. 1999; Otha et al. 2004 y Ricca et al. 2007). Estos trabajos muestran cronológicamente nuevos conocimientos sobre el mejoramiento de la producción de inulinasas, caracterización de nuevas inulinasas, clonación y expresión de genes de inulinasas y sus respectivas aplicaciones. También se confirmó que los microorganismos más comúnmente utilizados son las cepas de mohos como el *Aspergillus* sp y cepas de levadura como *Kluyveromyces* sp, aunque las cepas de levadura producen más inulinasa que las cepas de hongos y bacterias.

Entre las levaduras, además de *Kluyveromyces marxianus* que tienen alto potencial para producir inulinasa con altos rendimientos aceptables comercialmente, se han reportado últimamente que, se han seleccionado y mutado otras cepas nuevas como *Geotrichum candidum* (Mughal et al. 2009); la levadura marina *Pichia guilliermondii* (Yu et al. 2009) y se han clonado genes de inulinasa INU1 de *Pichia guilliermondii* en *Pichia pastoris* X-33 (Zhang et al. 2009) alcanzándose altos valores de rendimientos: 71,85 U/mL en 48 h de cultivo; 127,7 U/mL en 120 h y 286,8 U/mL en 120 h de fermentación respectivamente, siendo estos valores los más altos reportados a la fecha, aunque esto involucra mayores tiempos de fermentación.

Sin embargo, considerando que los mayores esfuerzos están dirigidos a producir inulinasa para aplicarlos en la producción de jarabe alto de fructosa, como un edulcorante de bajo poder calórico, las cepas de *Kluyveromyces marxianus* que tienen el *status* de GRAS (*Generally Recognized as Safe*) y QPS (*Qualified Presumption of Safety*) en los Estados Unidos y en la Unión Europea respectivamente, son preferidos para la producción de inulinasa para ser usado en la industria de alimentos. Estas designaciones significan que existen pocas restricciones contra su uso y enormemente realzan su potencial en el sector biotecnológico (Lane y Morrissey 2010).

Además de ser la inulinasa una enzima nativa de la levadura lechera *Kluyveromyces marxianus*, es especialmente adecuada para la aplicación industrial, por tener la mejor velocidad de crecimiento que cualquier otro microbio eucariote, termotolerante, con habilidad para crecer sobre los 52 °C, capacidad de asimilar un amplio rango de azúcares claves, como la lactosa e inulina y una alta capacidad secretoria de enzimas líticas, hacen de éste microorganismo líder de todas las levaduras para muchos procesos biotecnológicos. *Kluyveromyces marxianus* es una especie que incorpora muchos sinónimos, se describe como una levadura homotáctica, hemiascomyceto, es filogenéticamente relacionada a *Saccharomyces cerevisiae* y es una especie hermana de la mejor conocida *Kluyveromyces lactis* (Lane y Morrissey 2010). Una fotografía de *Kluyveromyces marxianus* se muestra en la figura 2.

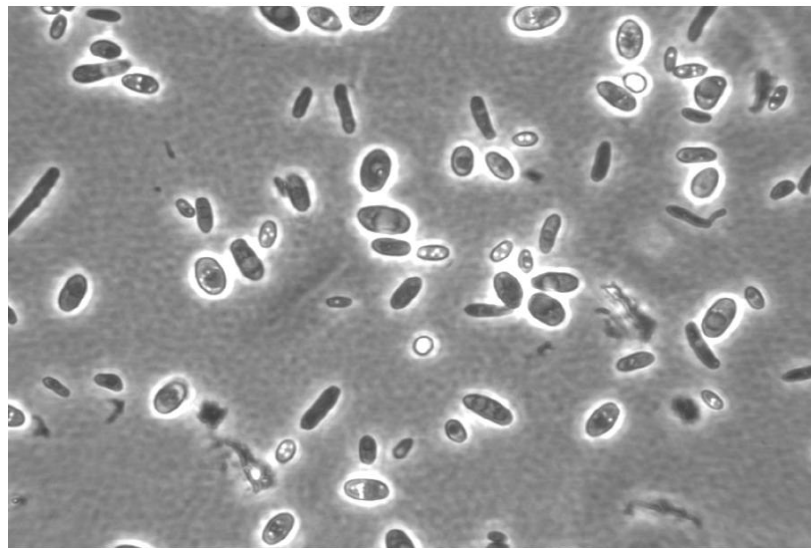


Figura 2: Células de levadura *Kluyveromyces marxianus* creciendo en glucosa, bajo condiciones aeróbicas, cultivadas en matraces y en *shaker* a 45°C y 120 rpm (Madeira 2004).

- Producción de inulinasa por cepas de *Kluyveromyces marxianus*

Comparativamente, según Pandey *et al.* (1999), en cuanto a la producción de inulinasa se puede notar que entre los mohos los mejores resultados son dados por *Aspergillus niger* (75 U/mL) y *A. niger* A42 (4600 U/g), también algunas cepas mutantes de levaduras como *K. marxianus* var. *marxianus*, CBS 6556

exhibieron rendimientos de 3000 U/mL, mientras que las bacterias no mostraron comparables rendimientos de inulinasa.

Las levaduras tienen la ventaja sobre los mohos de tener una mayor velocidad de generación celular y adaptabilidad a diferentes condiciones y modos de cultivo, y en esto las cepas de *Kluyveromyces marxianus* han sido últimamente más estudiados.

Cruz-Guerrero *et al.* (1995), demostraron que *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-278 fue una levadura híper productora de inulinasa parcialmente constitutiva y, aunque la cepa mostró tener una alta resistencia al 2-desoxiglucosa, la producción de inulinasa fue reprimida catabólicamente, al confirmarse que en una fermentación en un medio de 4 % de glucosa y 4 % de inulina, la inulinasa comenzó a producirse cuando los niveles de glucosa fueron lo suficientemente bajos, alcanzándose un rendimiento de 82 U/mL al término de las 24 horas.

También una levadura de *Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus* fue evaluada primero en cultivo continuo en medios con diferentes fuentes de carbono, en que los más altos rendimientos de inulinasa fueron obtenidos con sacarosa como nutriente limitante, resultando valores de 107 U/mL para una velocidad de dilución de $0,05 \text{ h}^{-1}$ y 0,81 U/mL para un valor de $0,45 \text{ h}^{-1}$, precisándose que los niveles de actividad de inulinasa en cultivos con sacarosa fueron fuertemente dependientes de la velocidad de dilución y la levadura regulada por el azúcar residual en el cultivo continuo. Después en cultivos en matraces de 250 mL, 50 mL de medio a $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$, velocidad de agitación 200 rpm, después de 72 horas y de las respectivas etapas de purificación se alcanzaron actividades específicas con inulina de 170 U/mg, la más alta, respecto con fructosa 94,2 U/mg, o con glucosa 59,5 U/mg o con sacarosa 35,5 U/mg (Kushi *et al.* 2000).

Kalil *et al.* (2001) en un estudio de optimización de la producción de inulinasa por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045 determinaron que las condiciones de cultivo fueron: 14 g/L de sacarosa, 10 g/L de extracto de levadura, 20 g/L de

peptona, 1 g/L de K_2HPO_4 y pH 3,5. La actividad enzimática fue de 127 U/mL. El K_2HPO_4 tuvo un efecto positivo débil sobre la actividad enzimática aunque estadísticamente fue significativa.

Desde un punto de vista industrial es importante señalar que la inulina proveniente de materias primas vegetales es considerada como la mayor fuente de carbono, más que la inulina pura, como ha sido comprobado en estudios recientes y que se reportan a continuación.

Se ha evaluado la fermentación de *Kluyveromyces* sp. Y-85 en un medio optimizado usando como fuente de carbono extracto de alcachofa, la experiencia primero fue realizada en matraces a 30 °C por 24 horas, alcanzándose el máximo rendimiento de 59.5 U/ ml de medio compuesto por 8.0% de extracto de alcachofa; 2% de úrea; 0.2% extracto de carne y 4% de licor dulce de maíz. Posteriormente se evaluó el efecto de la aireación variando los volúmenes de medio sobre la producción de inulinasa, infiriendo que el oxígeno no influyó mucho en el rendimiento. Esta propiedad sería muy importante para el caso de una producción industrial, en cuanto se ahorraría costos de producción (Wei et al. 1998).

Con el medio optimizado se escaló la fermentación en un fermentador de 15 litros, con un volumen de medio de 7 L, inóculo 5% (v/v), a 30 °C, aireación 1,5 vvm y velocidad de agitación 400 rpm, alcanzándose un rendimiento promedio de 67.6 U/mL. Las cinéticas de fermentación muestran que la síntesis de inulinasa se inhibió por la alta concentración de carbohidrato reductor (> 2 g/L) en el medio de cultivo. Cuando la experiencia se realizó en un fermentador de torre de 1000 L se obtuvo un rendimiento máximo de 68.9 U/mL, el más alto reportado a la fecha (Wei et al. 1998).

Se ha publicado la producción de inulinasa por *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* en extracto de yacón al 30 % (v/v), habiendo mostrado esta levadura un alto potencial de producción (4,1 U/mL a las 16 horas de incubación) y su gran capacidad de adaptación en diferentes sustratos y su gran crecimiento a

diferentes valores de pH (pH 3,5 fue el óptimo) y en amplios rangos de temperatura (20 a 40 °C) (Cazetta et al. 2005).

Xion et al. (2007) determinaron un medio de cultivo adecuado para obtener el mayor rendimiento de inulinasa por *Kluyveromyces* S120. El medio de fermentación estuvo compuesto de 12,72 % de inulina, 10,76% de licor de maceración de maíz como fuente de nitrógeno y 1,61% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, empleando salvado de trigo como sustrato sólido, alcanzándose un máximo rendimiento de inulinasa de 409,8 U/g de sustrato seco inicial, constituyéndose el valor más alto publicado en la literatura de esa fecha. En la cinética de fermentación se observa que el máximo rendimiento lo alcanzó después de las 96 horas de cultivo. Debido al decaimiento del crecimiento celular después de 84 h o la degradación parcial de inulinasa por enzimas proteolíticas, la producción de inulinasa decayó después de 96 h; por lo que sugirieron que la inulinasa producida por *Kluyveromyces* S120 pudo ser un ejemplo de un producto asociado al crecimiento.

Singh y Bhermi (2008) obtuvieron una alta actividad de inulinasa (50.2 U/mL) a partir de la fermentación *K. marxianus* YS-1 usando extracto pulverizado de raíz de espárrago (con 4 % de inulina), en un reactor de 1.5 Litros, bajo agitación de 1200 rpm y 0.75 vvm a 30 °C y después de 60 horas de fermentación, por lo que se concluyó utilizar esta fuente como materia prima, por ser abundante y barato. Además se demostró por fermentación de *K. marxianus* YS-1 en matraces Erlenmeyer sobre el extracto de espárrago conteniendo un máximo de 1.54% de inulina, que los métodos de extracción de inulina desde los tubérculos de raíz de espárragos, ejercieron también efecto sobre el rendimiento de inulinasa.

Se ha demostrado que el tipo de sustrato tiene efecto sobre la naturaleza extra e intracelular de la enzima. Esta propiedad depende principalmente de la clase de microorganismo empleado, particularmente, la mayoría de hongos produce enzima extracelular, mientras que las levaduras producen ambas, tanto en el medio de cultivo como en el interior de la célula (Rouwenhorst et al. 1990).

Singh et al. (2007), en un estudio de optimización de medio y parámetros de proceso para la producción de inulinasa a partir de una nueva cepa de *Kluyveromyces marxianus* YS-1, en matraces, demostraron que el rendimiento de enzima aumento con el incremento del pH inicial del medio hasta un valor de 6,5 a una producción máxima de enzima de 24,5 U/mL y de ahí el rendimiento declinó. Se recomendó trabajar a un intervalo de pH inicial de 6,4 a 6,5 y temperatura de 30°C para una producción óptima con esta cepa. En este estudio también se evaluó el efecto de la aireación y agitación sobre la producción de inulinasa. La velocidad de agitación de 150 rpm y una aireación de 1 vvm han sido reportadas como óptimas para cultivos en matraces. La variación de la velocidad de agitación no solo afecta la disponibilidad de oxígeno, si no también ejerce influencia sobre la disponibilidad de otros nutrientes en el medio. Por tanto la aireación y agitación son factores críticos para *K. marxianus*, los que son responsables de la viabilidad y producción enzimática.

Cuando *K. marxianus* NRRL Y-7571 creció en un cultivo sólido conteniendo bagazo de caña de azúcar como soporte y fuente de carbono y suplementado con licor de maíz como fuente de nitrógeno, la concentración de inulinasa extracelular alcanzó el valor de 391,9 U/g de bagazo seco fermentado (Bender et al. 2006). Cuando se usó salvado de soja el tiempo de fermentación para alcanzar la actividad máxima decreció de 96 a 24 h y la productividad máxima alcanzada por *K. marxianus* NRRL Y-7571 fue de 8.87 U/ g.h (Mazutti et al. 2006).

Mazutti et al. (2010), evaluaron la cinética del crecimiento celular y producción de inulinasa por *K. marxianus* NRRL Y-7571 en un reactor de lecho empacado con bagazo de caña, melaza de caña, licor de maíz y salvado de soja por efecto de la temperatura del aire de ingreso y el caudal volumétrico de aire, los mismos que correspondieron a valores óptimos de 30 °C y 3 m³/h, alcanzando una actividad promedio de 463 U/g de sólido seco. Concluyeron que estos resultados pueden ser usados para el escalamiento y optimización de la configuración de bioreactores de lecho empacado para la producción de inulinasa.

Una lista resumen de cepas de *K. marxianus* productoras de inulinasa se reporta en la tabla 1, notándose que ellas producen inulinasa con una alta actividad enzimática. Para mejorar los resultados mostrados es importante evitar los efectos de represión por glucosa sobre la producción de inulinasa y utilizar fuentes naturales de inulina como extractos de yacón, espárragos y alcachofas. Por tanto la factibilidad del escalamiento para la producción enzimática industrial está basada grandemente en el alto rendimiento del microorganismo, el sustrato base a emplear y el diseño del proceso de fermentación.

Tabla 1. Cepas de *Kluyveromyces marxianus* y rendimientos en inulinasa

Microorganismo	Tipo de cultivo	Rendimiento U/mL	Referencia
<i>Kluyveromyces sp.</i> Y-85	Líquido	59,5	Wei et al. 1998
<i>K. marxianus</i>	Líquido	43,7	Pandey et al. 1999
<i>K. marxianus</i> ATCC 36907	Líquido	260	Pandey et al. 1999
<i>K. marxianus</i> ATCC 52466	Líquido	0,418	Pandey et al. 1999
<i>K. marxianus</i> CDBB-L-278	Líquido	82	Cruz-Guerrero et al. 1995
<i>K. marxianus var. marxianus</i> CBS 6556	Líquido	3000	Pandey et al. 1999
<i>K. marxianus</i> UCD(FST) 55-82	Líquido	212	Pandey et al. 1999
<i>K. marxianus var. bulgaricus</i>	Continuo	107	Kushi et al. 2000
<i>K. marxianus</i> ATCC 16045	Líquido	121	Silva-Santisteban y Filho 2005
<i>K. marxianus var. bulgaricus</i>	Líquido	4,1	Cazzeta et al. 2005
<i>K. marxianus</i> (A1 y A2)	Líquido	32	Cruz-Guerrero et al. 2006
<i>K. marxianus</i> NRRL Y-7571	Sólido	3 91,9 U/g	Bender et al. 2006
<i>K. marxianus</i> NRRL Y-7571	Líquido	8,87 U/g.h	Mazutti et al.2006
<i>Kluyveromyces</i> S120	Sólido	409,8 U/g	Chen et al. 2007
<i>K. marxianus</i> YS-1	Líquido	24,5	Singh et al. 2007b
<i>K. marxianus</i> YS-1	Líquido	50,2	Singh y Bhermi, 2008
<i>K. marxianus</i> NRRL Y-7571	Sólido	463 U/g	Mazutti et al.2010

- Caracterización y propiedades de la inulinasa

La inulinasa (E.C. 3.2.1.7) es una enzima miembro de la familia de glicósido hidrolasa 32(GH32), la cual catalisa la hidrólisis de inulina a fructosa. La purificación de inulinasa microbiana extracelular es hecha por métodos convencionales de centrifugación, ultrafiltración, precipitación con solventes o sales, cromatografía de intercambio iónico y de permeación en gel, mientras que la inulinasa intracelular requiere disrupción celular antes de practicar los métodos reportados para las enzimas extracelulares (Kushi et al. 2000).

El proceso de extracción de la inulinasa, además de determinar el rendimiento y si la enzima es 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 y efecto de la concentración de sustrato (Chi et al. 2009).

Se ha reportado diferentes valores de MW dependiendo de la fuente de microorganismo, del método de determinación, así por ejemplo para la *K. marxianus* var. *bulgáricus* varía de 57 a 77 KDa (Kushi et al.2000) y para *K. marxianus* CBS 6556 se determinó un valor de 64 KDa (Rouwenhorst et al. 1990).

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-inulinasas (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 de la unidad de sacarosa y la endo-inulinasa (64 KDa) actúa sobre enlaces internos y rinde un conjunto de inulo-oligosacáridos (inulotriosa, inulotetrosa y inulopentosa) pero sin actividad invertasa. Estas propiedades dependen del origen microbiano de la enzima. De este punto de vista la mejor cepa sería la que tenga ambas propiedades, como el caso del *A. ficuum* (Pandey et al. 1999), dado que una mezcla de endo y exo

inulinasa puede resultar en una mejor conversión de inulina a fructosa que solo utilizar enzimas puras aisladas, dado que las endo-inulinasas romperían las moléculas de inulina en muchos oligosacáridos, aumentando así los puntos de ataque para las exo-inulinasas, con el consecuente incremento de la velocidad de reacción de inulina a fructosa.

Por tanto queda probado que las exo-inulinasas también ejercen actividad catalítica sobre la sacarosa, desdoblándola en glucosa y fructosa, es decir tienen actividad de invertasa. Se afirma que la actividad invertasa es mayor en enzimas producidas por levaduras que en aquellas obtenidas a partir de mohos (Ricca et al. 2007). Notoriamente una actividad invertasa de inulinasa es deseable. Laloux et al. (1991), sostienen que las inulinasas poseen sitios catalíticos comunes, pero diferentes sitios de enlace para la hidrólisis de inulina y sacarosa.

Un esquema hipotético para el mecanismo de acción de la inulinasa de *B. polymyxa* 722 se muestra en la figura 3. La presencia de grupos de imidazol y sulfidrilos en el centro activo de la enzima fue demostrado con el mecanismo propuesto (Zherebtsov, N., 2003).

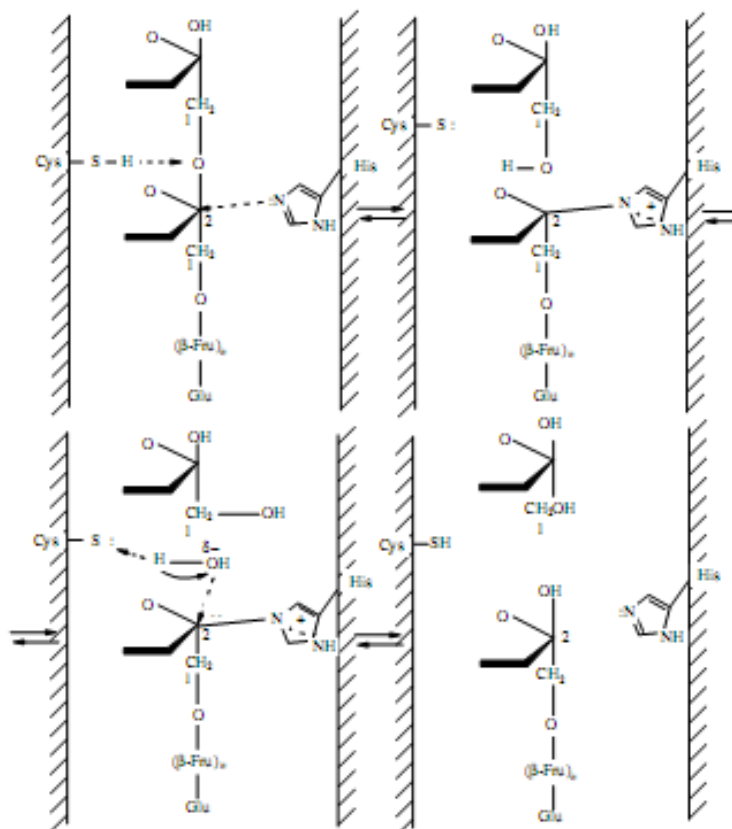


Figura 3. Esquema hipotético para el mecanismo de acción de la inulinasa sobre la inulina (Zharebtsov, N., 2003).

La actividad y estabilidad dependen de la respuesta de la enzima a los cambios 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 mohos. Así se tienen los rango de valores de pH, para mohos 4,5 – 7,0, para levaduras 4,4- 6,5 y para las bacterias 4,8 – 7,0 (Ricca et al. 2007). Singh et al. 2007b, determinaron que la exo-inulinasa de *Kluyveromyces marxianus* YS-1 exhibió considerable actividad a un valor de pH óptimo de 5.5 en que mantuvo estable su actividad catalítica al 100% durante 3 h a la temperatura óptima de 50 °C. Se observa que todavía existe la necesidad de investigar la actividad y estabilidad de la inulinasa contra la temperatura, así como los modelamientos y simulación de procesos o cinética de desactivación de la enzima.

Por otra parte se han evaluado los parámetros cinéticos de inulinasas provenientes de diferentes fuentes de microorganismos en torno a solo un valor de temperatura óptima. Kushi et al.(2000) determinaron los valores de los parámetros cinéticos aparentes K_m y V_{max} de la inulinasa purificada por HPLC de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* ATCC 16045 en presencia de inulina y sacarosa siendo 86.9 mg/ml y 53.7 U/mg de proteína y 4,58 mg/mL y 441,0 U/mg de proteína a 55 °C y pH 4,4 óptimos, respectivamente, demostrando que la enzima producida es una exo-inulinasa con más alta afinidad y reactividad por la sacarosa que por la inulina. de Paula et al. (2008) también determinaron los valores de los parámetros cinéticos de un caldo crudo exento de células conteniendo inulinasa de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* ATCC 16045 siendo de K_m igual a 61,83 mM y V_{max} igual a 37.60 U/mg de proteína a 55 °C y pH 3,5 óptimos.

- Inmovilización

Un medio crudo libre de células de un cultivo de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* ATCC 16045, fue inmovilizado en gelatina tratado con glutaraldehído, resultando con una actividad de inulinasa del 82,20 %. Sus parámetros cinéticos fueron de K_m igual a 149,28 mM y V_{max} igual a 31,45 U/mg de proteína a 55 °C y pH 3,5 óptimos. La inulinasa inmovilizada actuó con una eficiencia de conversión de sacarosa del 58,12 % en un reactor continuo de lecho fijo operando por 33 días (de Paula et al. 2008).

Células de *Kluyveromyces marxianus* con actividad de inulinasa, fueron inmovilizados en alginato de bario tratado con glutaraldehído, manteniéndose una actividad residual del 85 % y una eficiencia del sistema (η) de 0,79 para un diámetro de partícula de 1,43 mm. El coeficiente de difusión (D_E) de la inulina hacia el interior del soporte fue de $2,5 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ mientras que el módulo de Thiele (ϕ) fue cercano a 1, confirmándose que el factor limitante del sistema fue la resistencia difusional del sustrato. Sus parámetros cinéticos fueron de K_m igual a 0.522 mM y V_{max} igual a 113,7 μmolmin^{-1} de proteína (Barranco- Florido, E. et al. 2001).

Pratima y Argyrios (1985a) inmovilizaron células *Kluyveromyces marxianus* con actividad de inulinasa, en una matriz de gelatina de poro abierto tratado con glutaraldehído, manteniéndose una actividad residual mayor al 90 %. El procedimiento de inmovilización no alteró el valor del pH que fue de 6.0 tanto para las células libres como para las inmovilizadas. La temperatura de hidrólisis de la inulina fue 10° C más alto para las células inmovilizadas. Los valores de K_m fueron de 8 y 9,52 mM para las células libres e inmovilizadas respectivamente. Estas células inmovilizadas conservaron su actividad hasta por 30 días cuando se le conservó a 4° C.

También Pratima y Argyrios (1985b) evaluaron la producción por lotes y en continuo de jarabe de fructosa a partir de alcachofa Jerusalem con células inmovilizadas de *Kluyveromyces marxianus* con actividad de inulinasa, en una matriz de gelatina de poro abierto tratado con glutaraldehído. En el reactor por lotes la hidrólisis fue del 93 % alcanzándose una concentración de fructosa de 42 g/L al término de 3 horas. Estos mismos resultados se obtuvieron cuando las células inmovilizadas se reusaron durante 10 lotes. Cuando se operó el reactor continuo con 65.7 g/l de células inmovilizadas se obtuvo un aproximado del 100 % de hidrólisis, a velocidades de dilución menores a 1,26 h⁻¹.

- Conclusiones

En este estudio de revisión, se han determinado a la actualidad, un conjunto cepas de *Kluyveromyces marxianus* con gran potencial biotecnológico para producir inulinasa, pero la investigación para una fuente vegetal de inulina económicamente interesante todavía está en curso. Desde un punto de vista industrial, el uso de inulina de especies vegetales como materia prima para la producción de inulinasa por fermentación, se vislumbra como promisorio, sobre todo para el espárrago y el yacón, el primero por ser actualmente uno de los cultivos de mayor producción mundial, respecto a las materias primas comerciales actuales y de alto contenido de inulina y el segundo por ser un alimento tradicional con un estatus de seguro de uso y también con mayor contenido de inulina.

Para propósitos de escalamiento del bioproceso será necesario tener en cuenta que, la aireación y agitación son factores críticos para la fermentación de *Kluyveromyces marxianus*, los que son responsables de la viabilidad y producción enzimática. Se ha visto que hay necesidad de investigar la actividad y estabilidad de la inulinasa frente a la temperatura, modelando y simulando la cinética de desactivación. Los parámetros cinéticos de la inulinasa están en función al tipo de microorganismo, las condiciones ambientales de la fermentación y del modo de acción de la enzima.

1.3. CARACTERIZACIÓN Y NATURALEZA DEL OBJETO DE INVESTIGACIÓN

El objeto de la investigación es la fermentación sumergida por lotes de *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y-7571 y la caracterización cinética de la enzima inulinasa del caldo crudo de fermentación, como producto (Kushi et al. 2000, Rouwenhorst et al.1990, Sangeetha et al. 2005, Wei et al. 1998 y Ricca et al. 2009).

La fermentación es un proceso de biotransformación de materia orgánica por la acción de células (de microorganismos o de animales) en sustancias químicas o metabolitos, llevada a cabo bajo ciertas condiciones ambientales y en recipientes adecuados llamados fermentadores o bioreactores. 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 hidrógeno). El dióxido de carbono y otros gases también se consideran como productos de la reacción o respiración de los microorganismos (Walter et al. 1994).

El género *Kluyveromyces* corresponde a los microbios de levadura, los que son muy conocidas por su habilidad en crecer sobre fructanos tales como la

inulina (Cazetta et al. 2005 y Lane y Morrissey, 2010). La inulina es un fructooligosacárido formada por unidades de fructosa unidas entre sí por enlaces β -D- (2-1) fructosil-fructosa de hasta $n= 60$ con una molécula de glucosa al inicio de la cadena. La inulina se encuentra en muchas plantas como en la achicoria, la dalia, la cebolla, el ajo, el espárrago y en el yacón (Ojansivu et al. 2011y Franck y Deleenheer 2006).

En cepas de *Kluyveromyces* como *cicerisporus*, *fragilis*, *marxianus*, sp.Y-85, etc. (Rouwenhorst et al. 1988 y Wei et al. 1998) 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.

La inulinasa de 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 β -2,1- D-fructan-fructanohidrolasa; (EC 3.2.1.7), caracterizada por hidrolizar la inulina en fructosa prácticamente pura, ampliamente usada en la industria de alimentos como edulcorante dietético.

En este trabajo, el caracterizar la enzima inulinasa del caldo crudo de fermentación, comprenderá determinar los valores de los parámetros cinéticos de la enzima en el caldo crudo en condiciones de pH, temperatura y concentración de sustrato, definidas en base al análisis de las referencias bibliográficas. Los valores de los parámetros cinéticos también son indispensables conocerlos para los cálculos de diseño de un reactor enzimático, siendo ellos la constante de afinidad, K y la velocidad máxima, V (Kushi et al., 2000, Ricca et al. 2009, Rocha et al. 2006 y Singh y Bhermi 2008).

1.4. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿ Cómo determinar los valores óptimos de los parámetros ambientales de la fermentación por lotes, de *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y-7571, para la producción y caracterización cinética de la inulinasa en el extracto crudo?.

1.5. FORMULACIÓN DE LA HIPÓTESIS

H: Por un planeamiento experimental de optimización en cultivo microbiano por lotes, es posible determinar los valores óptimos de los parámetros ambientales de la fermentación de *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y-7571 para la producción y caracterización cinética de la inulinasa del extracto crudo

A continuación se definen las variables de estudio:

Variable compleja independiente: Lo constituye, los parámetros ambientales de la fermentación de *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y-7571, dado por el conjunto de variables independientes siguientes:

- **Fuente de carbono:** Extracto de yacón (Cazetta et al 2005) y extracto de turiones de espárragos (Singh y Bhermi 2008)
- **Fuente de nitrógeno:** $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Singh et al 2007b)
- **Factores de crecimiento:** Extracto de levadura (Kushi et al., 2000 y Singh et al. 2007b)
- **Iones metálicos:** Mg^{2+} (Mg SO_4) (Kampen, 1997)
- **Tamaño de inóculo de células microbianas** de *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y-7571. (Liu, Y., Liu, Q. y Tay, J. 2005)
- pH inicial. (Cazetta et al 2005)
- **Temperatura.** (Kushi et al., 2000 y Singh et al 2007b)
- **Velocidad de Agitación.** (Singh et al 2007b)

Variable dependiente: Lo constituye la producción de inulinasa o rendimiento, expresada como actividad enzimática (volumétrica, U/mL y específica U/mg). Así mismo las variables para la caracterización cinética del extracto crudo enzimático lo constituyen los parámetros cinéticos de la enzima K y V , determinados por mediciones de velocidad inicial de reacción a diferentes concentraciones de sustrato (Ettalibi y Baratti, 2001y Illanes 2008).

1.6. FORMULACIÓN DE LOS OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

Objetivos generales:

- A) Determinar los valores óptimos de los parámetros ambientales de la fermentación de *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y-7571 para la producción de inulinasa del extracto crudo.

- B) Determinar los valores de los parámetros cinéticos de la enzima inulinasa del extracto crudo de la fermentación de *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y-7571, actuando sobre sacarosa, rafinosa e inulina, respectivamente.

Objetivos específicos:

- a) Obtener y caracterizar los extractos de yacón y de espárragos, que sirvan en los experimentos de fermentación de *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y-7571, como fuentes de carbono y energía.
- b) Producir el caldo celular por cultivo en matraces Erlenmeyer de *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y-7571 en medio definido químicamente puro, a evaluarse como tamaño de inóculo en los experimentos.
- c) Identificar a partir de un total de 12 experimentos según el diseño de Plackett- Burman, aquellos parámetros o variables que afectan sensiblemente las respuestas.
- d) Determinar los valores óptimos de los parámetros que afectan significativamente las respuestas según el diseño factorial (Diseño compuesto central rotacional DCCR) y el análisis o metodología de superficie de respuesta (RSM).

- e) Realizar los estudios de validación y confirmativos de la fermentación por lotes sumergida de *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y-7571 en matraces y en un bioreactor automatizado de 2 litros.
- f) Determinar los valores de los parámetros cinéticos K y V de la inulinasa del extracto crudo, actuando sobre sacarosa, rafinosa e inulina, respectivamente.

1.7. IMPORTANCIA Y JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

La inulinasa es una enzima caracterizada por hidrolizar la inulina en fructosa prácticamente pura (sobre un 95%) en un solo paso de reacción, pudiendo ser una alternativa al proceso tradicional originando la reducción de las etapas de bioprocesamiento, tiempo y costos en la industria de alimentos. El producto jarabe de fructosa, es un azúcar natural ampliamente usada en la industria de alimentos como edulcorante dietético con un poder de dulzor de 1,5 a 2 veces la sacarosa (Ricca et al. 2009). Las inulinasas también pueden ser aplicadas en la producción de fructooligosacáridos; éstas macromoléculas últimamente han logrado alcanzar mucha atención debido a su aplicación como ingredientes funcionales (Vega y Zúñiga-Hansen, 2011 y Sangeetha et al. 2005).

De ahí el interés por esta enzima para producirla, purificarla y caracterizarla a partir de cultivos microbianos en medios sintéticos, siendo la levaduras *Kluyveromyces* las más estudiadas (Cazetta et al. 2005, Kushi et al. 2000, Rouwenhorst et al. 1990 y Wei et al. 1998). Recientemente se han publicado estudios de la producción de inulinasa por fermentación de *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045 en extracto de yacón (Cazetta et al. 2005) un tubérculo de producción nacional que almacena inulina y fructooligosacáridos, y también se reportó la producción a partir del extracto del turión de espárragos, siendo estos, raíces de hierbas perennes que contienen inulina sobre el 15%; de ahí que la producción anual mundial de

esta planta es más alta que la achicoria, la alcachofa Jerusalem y la dalia (Singh y Bhermi 2008).

Por lo expuesto la investigación se justifica dado que el tema se enfoca con un criterio novedoso, de mejorar el proceso fermentativo de *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y-7571 en medios de cultivo definidos, utilizando extractos de recursos naturales nacionales como son el de yacón y del turión de espárrago y posteriormente, caracterizando la inulinasa producida, con la determinación de los parámetros cinéticos y condiciones ambientales (temperatura, pH y velocidad de agitación).

De la información que se logre a escala de laboratorio se espera motivar la realización de estudios de escalamiento, a nivel de planta piloto y estudios factibilidad de instalación de una planta de producción de enzimas inulinasa, en el país.

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. FUNDAMENTOS FILOSÓFICOS TEÓRICOS DE LA INVESTIGACIÓN

En este trabajo de investigación, se aplicó el método científico experimental, que comprendió un conjunto de conceptos normativos, epistemológicos, como son la objetividad por los métodos y técnicas a considerar para probar la hipótesis, verificar los resultados y lograr la verdad fáctica o de hecho, con sistematicidad del tratamiento estadístico matemático de los valores de las variables de estudio, coherencia entre los valores calculados con los modelos matemáticos y los valores experimentales.

El principio de causalidad será evidente, puesto que se logrará optimizar los parámetros de fermentación por lotes de *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y-7571 en medios de cultivo líquidos definidos, para mejorar la producción de la enzima inulinasa, al tratar las variables independientes en base a un diseño factorial (DCCR) y la metodología del análisis de superficie de respuesta (RSM). Finalmente corresponderá a la validación del modelo matemático obtenido.

2.2. MARCO CONCEPTUAL.

Partiendo de los diferentes enfoques y conclusiones que tienen los autores de las referencias bibliográficas sobre el problema de investigación planteada, las ideas y criterios de la realidad nacional y mundial y los fundamentos del objeto de la investigación, se planteo una línea filosófica fáctica (materialista) para el desarrollo de este trabajo empleándose el método científico experimental.

DEFINICIÓN DE TÉRMINOS BÁSICOS

Inulinasa

La inulinasa es una enzima denominada inulasa o β -D-(2-1)-fructano fructohidrolasa (E.C. 3.2.1.7), pertenece al grupo de clasificación de enzimas hidrolasas glicosidasas y catalizan la hidrólisis de enlaces β -D-(2-1)-fructosídicos en la inulina, originando fructosa y glucosa (Kushi et al. 2000 y

Laloux et al. 1991). Esta enzima puede ser utilizado para la producción de jarabe de fructosa de alta pureza, el cual es extensamente usado en la industria de alimentos y bebidas (Ettalibi y Baratti, 2001).

Kluyveromyces marxianus

Kluyveromyces marxianus, es una levadura especialmente adecuada para la aplicación industrial, por tener la mejor velocidad de crecimiento que cualquier otro microbio eucariote, termotolerante, con habilidad para crecer sobre los 52 °C, capacidad de asimilar un amplio rango de azúcares claves, como la lactosa e inulina y una alta capacidad secretoria de enzimas líticas, hacen de éste microorganismo líder de todas las levaduras para muchos procesos biotecnológicos. *Kluyveromyces marxianus* es una especie que incorpora muchos sinónimos, se describe como una levadura homotáctica, hemiascomyceto, es filogenéticamente relacionada a *Saccharomyces cerevisiae* y es una especie hermana de la mejor conocida *Kluyveromyces lactis* (Lane y Morrissey 2010).

Kluyveromyces marxianus NRRL-Y-7571, ATCC 26548 ó CBS 6556, es una cepa aislada en Chiapas México, es considerada como una de las levaduras que tiene gran potencial biotecnológico para producir inulinasa (Rouwenhorst et al. 1990; Mazutti et al. 2010 y Golunski et. al 2011).

Cinética de fermentaciones por lotes

La fermentación es un proceso microbiano que suministra energía, en el cual los compuestos orgánicos sirven de aceptores terminales de electrones (o de hidrógeno). El dióxido de carbónico y otros gases también se consideran como productos de la reacción o respiración de los microorganismos (Walter, McBee y Temple, 1994).

La fermentación o cultivo por lotes se define como aquel que se realiza sin intercambio de materia con los alrededores, salvo lo referente a los gases (aireación, producción de CO₂ y otros gases), los que se suministran y retiran del sistema en forma continua. En esta modalidad de cultivo se cargan

inicialmente los nutrientes y luego se inocula con una determinada cantidad de células viables.

El conocimiento de la cinética de un cultivo permite la predicción del transcurso de la fermentación, la evaluación de velocidades, rendimientos y productividades y entrega información útil para establecer estrategias de producción y optimización del proceso. El crecimiento de una población bacteriana y de levaduras (X) en función al tiempo de cultivo (t) se puede modelar con la siguiente ecuación:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X$$

Donde μ es la velocidad específica de crecimiento y su valor tiene especial relevancia en el estudio cinético de fermentaciones.

El comportamiento cinético de una población está determinado por un conjunto de factores genéticos y ambientales (Stanbury, Whitaker y Hall, 1995).

Influencia de los parámetros ambientales de fermentación

El valor de μ y por tanto la sobreproducción de un determinado metabolito dependen del microorganismo que se trate y de los parámetros ambientales del cultivo. Entre los parámetros o factores ambientales está la composición del medio de cultivo, la temperatura, el pH, etc. además para los procesos aerobios interesa la velocidad de agitación y aireación.

El efecto cuantitativo de la naturaleza de un nutriente (S) en el crecimiento microbiano no inhibido, está modelado por la ecuación de Monod:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S}$$

Donde K_s representa la constante de saturación y μ_{\max} la velocidad específica máxima de crecimiento.

La reproducción celular requiere de ciertos nutrientes (Kampen 1997), los que deben ser suministrados a través de los componentes del medio de cultivo: la fuente de carbono y energía puede ser un carbohidrato (sacarosa, inulina, etc.), la fuente de nitrógeno amonio, aminoácidos, urea, etc., y el resto de los elementos son proporcionados por sales inorgánicas en menor concentración

como el sulfato de magnesio, fosfato de potasio, etc. Debido a deficiencias genéticas algunas cepas requieren de factores de crecimiento tales como aminoácidos, vitaminas y nucleótidos.

La aireación (vvm) y agitación (N) en los procesos fermentativos aerobios cumplen los objetivos de, suministrar oxígeno necesario a los microorganismos para alcanzar sus actividades metabólicas apropiadas y mantenerlos en el medio líquido en suspensión. A nivel de laboratorio los valores típicos de vvm y N son de 0.5 a 2 y de 200 a 900 rpm. respectivamente (Casas et al. 2006).

Actividad y parámetros cinéticos enzimáticos

La producción de enzimas se expresa en términos de actividad enzimática. Se define a una unidad internacional de actividad (U.I.), 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 óptimas (Illanes, 2008).

La cinética enzimática se sostiene sobre la consideración básica de que, la velocidad de la reacción catalizada es proporcional a la concentración de proteína enzimática activa en la zona de linealidad de la relación producto-tiempo (velocidad inicial). Salvo situaciones muy excepcionales, esto es válido (Illanes, 2008).

El estudio del comportamiento cinético de una enzima es de vital importancia para establecer los mecanismos moleculares de la acción enzimática. La expresión matemática para un modelo cinético generalizado considera reacciones esencialmente irreversibles del tipo $S \rightarrow P$ y se expresa según la ecuación de Michaelis -Menten: $v = V_{ap} \cdot S / (K_{ap} + S)$.

Donde K_{ap} y V_{ap} son los parámetros cinéticos denominados, constante de afinidad aparente del enzima por el sustrato y la velocidad máxima aparente de reacción (reactividad del complejo activo enzima sustrato) respectivamente.

La expresión cinética anterior, es utilizada conjuntamente con el balance de materia respectivo, en el diseño y evaluación del comportamiento del reactor enzimático. Para ser aplicada requiere de la evaluación experimental de todos los parámetros cinéticos que la conforman. La forma usual es a través de mediciones de velocidad inicial de reacción a diferentes concentraciones de sustrato o concentraciones de efectores.

La validación de la dependencia de v y S y la determinación de los parámetros o constantes cinéticas se realizan por interpolación lineal, usando la ecuación de Lineweaver–Burk, obtenida a partir de la ecuación de Michaelis -Menten (Ricca et al., 2009): $1/v = K_{ap}/V_{ap}.S + 1/V_{ap}$.

El yacón

El yacón es una de las raíces reservantes comestibles, perteneciente a la familia *Compositae*, con mayor contenido de agua, entre el 83 y 90% del peso fresco es agua. En términos generales los carbohidratos representan alrededor del 90% del peso seco de las raíces recién cosechadas, de los cuales entre el 50 y el 70% son fructooligosacáridos (FOS). El resto de los carbohidratos (entre el 15% y 40%) lo conforman la sacarosa, la fructosa y la glucosa (Seminario, Valderrama y Manrique, 2003). También se ha determinado que el yacón es fuente de inulina (Madrigal y Sangronis 2007 y Chi et al., 2011), un polisacárido de cadena lineal de enlaces β -D- (2-1) fructosil-fructosa, al final de la cadena está presente una unidad de glucosa a través de un enlace tipo sacarosa.

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 como en este caso extracto de yacón (Castillo, 2009, Cazetta 2005, Sing y Bhermi, 2008 y Ricca, et al. 2009). Sin embargo, la composición relativa de los diferentes azúcares varía significativamente debido a diferentes factores como el cultivar, la época de siembra y cosecha, tiempo y temperatura en pos cosecha, entre otros (Seminario, et al. 2003).

El espárrago

El espárrago es una hortaliza jugosa, de la familia *Liliaceae*, nombre científico *Asparagus officinalis* L. planta perenne, que en la tierra forma una capa o corona la cual produce numerosos tallos, de rizomas con raíces y yemas de las cuales emergen brotes o renuevos, que son propiamente la parte comestible cuando tiene una longitud determinada, y se denomina espárrago, brotes, renuevos, turiones, tallos o puntas.

Turión: los turiones o tallos del espárrago se originan de una corona subterránea de raíces y se cosechan al emerger de la tierra. Los espárragos verdes tienen la yema terminal y todo el turión de color verde.

El espárrago fresco: significa que el tallo no es blando o flojo y que no se ha sometido a ningún proceso de beneficio que cambie sus características naturales. Es una planta vivaz que crece todos los años a partir del rizoma. Dura varios años en el terreno. Mientras crece en el suelo es el espárrago blanco, pero si se le deja vegetar por encima y se le recoge antes de dar ramificaciones es el espárrago verde. El espárrago recién cosechado contiene en promedio 95% de agua, carbohidratos 1.5 % y proteínas 2.7% entre otros componentes (Anastasios, 2010)

Estrategia experimental de optimización de la fermentación

Por la necesidad creciente de optimizar productos y procesos, minimizando costos y tiempos, maximizando rendimientos, productividades y calidad de productos, entre otros objetivos, ha conducido a utilizar técnicas de planificación de experimentos. El método usado para este propósito se llama optimización, el mismo que puede llevarse a cabo por un planeamiento factorial, seguido por un análisis o metodología de superficie de respuesta, RSM (Bas D. y Boyaci I. 2007).

Una estrategia secuencial para lograr alcanzar las condiciones optimizadas, incluye cuatro etapas (Rodrigues M. y lemma A. 2005):

1.- Selección de los parámetros o variables independientes e identificación de sus niveles. Un experimento *screening* o de selección recomendado es el de Plackett & Burman (Chen H. et al., 2011, Kalil et al. 2000).

2.- Selección del diseño de optimización. Por la planificación experimental factorial completo (según el número de variables en estudio), se recomienda el diseño compuesto central rotacional (DCCR) para construir el modelo matemático predictivo, que generalmente es una ecuación de segundo orden.

3.- Determinación de los valores óptimos. Por la RSM, que permite visualizar la ecuación predictiva en un plano tridimensional, mostrando la relación entre la variable respuesta o dependiente y las variables independientes. Además los planos de contorno ayudan a visualizar una superficie de respuesta (Bas D. y Boyaci I. 2007).

4.- Validación de las condiciones optimizadas. Con la realización de experimentos confirmativos para la verificación de la adecuación al modelo.

La RSM es una colección de técnicas estadísticas y matemáticas usadas para desarrollar, mejorar y optimizar procesos en el cual una respuesta de interés está influenciada por varias variables con el objetivo de optimizar esta respuesta. Esta metodología genera un modelo matemático el cual describe el proceso químico o bioquímico (Rodrigues M. y lemma A. 2005, Bas D. y Boyaci I. 2007 y Chen et al. 2011).

PLANTEAMIENTO DE ACTIVIDADES DE LA INVESTIGACIÓN

El planteamiento de las actividades de la investigación se hicieron, en torno a optimizar los parámetros ambientales de la fermentación de *K. marxianus* NRRL-Y-7571, para la producción y caracterización cinética de la enzima inulinasa mediante una planificación experimental de optimización.

La figura 4, describe el marco de acción en la cual se sustentan los objetivos propuestos y la verificación de la hipótesis del trabajo de tesis. Según como se aprecia, se obtienen los extractos de yacón y espárragos y se caracterizan sus componentes químicos, por técnicas analíticas e instrumentales, para utilizarlos como las fuentes de carbono y energía en preparación y esterilización de los medios de cultivo de las fermentaciones.

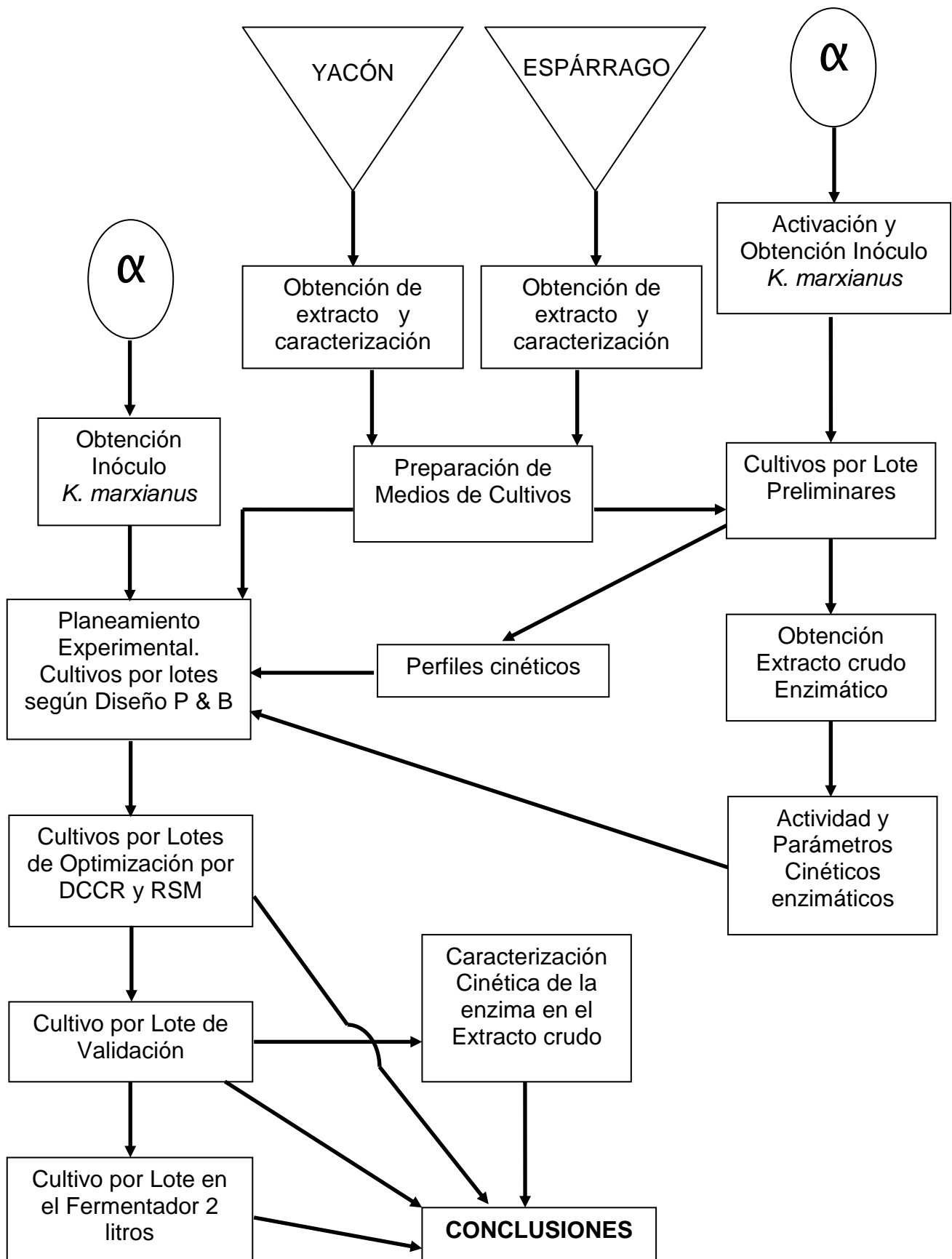


Figura 4: Planteamiento de actividades de la investigación

Las cepas de *K. marxianus* se activaron desde su estado de mantención liofilizadas, por cultivos en medio rico, hasta constituir los inóculos activos para las diferentes fermentaciones experimentales. Se realizaron cultivos por lotes preliminares, tanto en medios con componentes puros como con los extractos de yacón y espárragos, para conocer los perfiles cinéticos de crecimiento y producción y obtener el crudo enzimático de inulinasa para definir la técnica de la actividad catalítica y determinar los parámetros cinéticos de la enzima.

Con el análisis de las experiencias antes expuestas, el estudio de la información bibliográfica, los aportes de la estadística y el conocimiento de la ingeniería de fermentaciones y enzimas, se definieron las variables de estudio (fuentes de carbono: extractos de yacón y espárragos; fuente de nitrógeno; factor de crecimiento; ión metálico; tamaño de inóculo; pH inicial; temperatura y velocidad de agitación) , que sirvieron para planificar y ejecutar el planeamiento experimental de optimización.

Se realizaron cultivos en matraces según el diseño factorial de Plackett & Burman para seleccionar tres variables independientes de un total de nueve, y definir el valor de sus niveles cuantitativos. A continuación se realizaron cultivos en matraces según el diseño factorial DCCR para construir el modelo predictivo de la fermentación dentro de una región óptima y por RSM determinar los valores óptimos de las variables en estudio.

Posteriormente se realizaron experiencias de cultivo en matraces para validar las condiciones optimizadas, así como también cultivos en un fermentador Biostat M de 2 litros como experimento confirmativo.

Finalmente se realizaron experiencias en reactores enchaquetados, de mediciones de velocidad inicial de reacción de inulinasa en extracto crudo para la caracterización cinética de la enzima.

CAPITULO III

METODOLOGÍA EMPLEADA

3.1. MÉTODOS EMPLEADOS EN LA INVESTIGACIÓN

En este trabajo de investigación, se empleó el método científico experimental, con tipo de análisis predominantemente cuantitativo aplicado. El método consistió en aplicar una estrategia experimental de optimización de la fermentación, el mismo que pudo llevarse a cabo por un planeamiento factorial, seguido por un análisis o metodología de superficie de respuesta.

3.2. METODOLOGÍA PARA LA PRUEBA DE LA HIPÓTESIS

Con el objetivo de mejorar los valores de la actividad catalítica de la enzima inulinasa en el extracto crudo, optimizando la composición del medio y las condiciones del cultivo de *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y-7571 la hipótesis de trabajo se sometió a prueba, aplicando el siguiente diseño de investigación: El trabajo de optimización de los parámetros ambientales de la fermentación, se realizó por cultivos de *K. marxianus* en matraces Erlenmeyer (Calam, Ch. 1986; Singh R. et al. 2007b) y su correspondiente experimento de validación, además del estudio confirmativo en un fermentador automatizado de 2 L.

En una primera etapa, se trabajaron con nueve variables independientes con el objetivo de evaluar la influencia de cada variable independiente (causa) con la dependiente (efecto) y la influencia conjunta de todas las variables independientes con la dependiente (Greasham y Inamine 1986 y Rodrigues y lenma 2005), la hipótesis se sometió a un análisis estadístico (Diseño *screening*), y la segunda etapa fue de optimización final aplicándose el método de optimización a través del diseño factorial completo para tres variables seleccionadas en la primera etapa, el diseño compuesto central rotacional (DCCR) para construir el modelo matemático predictivo, que es una ecuación de segundo orden. y el estudio de la metodología de las superficies de respuesta (RSM) (Kalil S. et al.; 2000 y Chen H. et al. 2011).

- **Determinación de las Condiciones óptimas de Fermentación:**

Se realizó mediante dos etapas: Diseño de selección o *screening* y optimización final, en ambas, la variable dependiente (\tilde{y}) fue la actividad catalítica enzimática. Para la caracterización del extracto crudo enzimático de la fermentación optimizada, se determinaron los valores de los parámetros cinéticos de la enzima inulinasa por medidas de velocidad inicial.

1. Diseño de selección o *screening*

El objetivo principal de esta etapa fue identificar y seleccionar aquellas variables independientes más importantes desde una gran lista de variables candidatas, que al hacerlas variar sus valores de un nivel bajo (-) a un nivel alto (+) afecten sensiblemente las respuestas. Para ello se utilizó el Diseño de Plackett- Burman. Los experimentos se realizaron por cultivos por lotes en matraces de *K. marxianus* según se detalla en la sección 3.4.

Diseño de Plackett- Burman

El diseño de Plackett – Burman, es una técnica eficiente para optimización de los componentes de un medio (Xion et al. 2007), fue utilizado para recoger los factores o variables que influenciaron significativamente la producción de inulinasa y descartar aquellas insignificantes, con el propósito de obtener un set de tres factores más manejables y seleccionarlos para realizar un diseño factorial completo.

Se empleó un diseño con 11 variables, dos de las cuales fueron ficticias (*dummy*), con un total de 12 experimentos. Las variables *dummy* se usan para la medida de la variabilidad por Plackett y Burman y estos dan un estimado directo del error estándar del efecto de un factor (Kalil S. et al. 2000). Tanto la definición de las variables independientes (en base a experiencias preliminares y publicaciones previas) como el plan experimental de Plackett-Burman en una matriz de orden estándar (Greasham y Inamine 1986), se indican en las Tablas 2 y 3, respectivamente.

Los resultados estadísticos se obtuvieron usando el *software Design Expert V. 7,0*, empleándose el análisis de Varianza (ANOVA) o prueba F para los análisis estadísticos para un nivel de confianza del 95%, de donde se obtuvo el polinomio de primer grado con las variables significativas de la forma:

$$\hat{y} = b_0 + b_1X_1 + \dots + b_nX_n$$

Por el manejo de la herramienta de factores del *software Design Expert* y de acuerdo con la práctica de un bioproceso se hicieron los cálculos, para determinar los mejores niveles de las variables significativas seleccionadas.

2.- Planeamiento experimental de optimización

Una vez que se han definido las tres variables significativas por *screening*, el experimento se llevó a cabo según el diseño factorial completo (Diseño Central Compuesto Rotacional – DCCR) y el análisis o metodología de superficie de respuesta (RSM). En este estudio el diseño experimental consistió de 17 corridas (8 ensayos factoriales, 6 axiales y 3 puntos centrales) y las tres variables independientes fueron estudiadas a cinco niveles diferentes. Todas las corridas fueron hechas por duplicado y el promedio de los valores de actividad volumétrica fue tomado como la variable dependiente o respuesta.

También los experimentos se realizaron por cultivos por lotes en matraces de *K. marxianus* según se detalla en la sección 3.4.

La región experimental que encierra el óptimo, se describe apropiadamente por modelos matemáticos empíricos de segundo orden de la forma:

$$\hat{y} = \hat{\beta}_0 + \sum_{i=1}^k \hat{\beta}_i x_i + \sum_{i=1}^k \hat{\beta}_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j} \hat{\beta}_{ij} x_i x_j$$

Los coeficientes del modelo matemático de segundo orden fueron calculados y analizados usando el *software Statistica 8.0*, y graficado para estimar la superficie de respuesta de la variable dependiente, analizar los efectos de las variables independientes. y determinar los valores óptimos de las variables significativas.

El análisis estadístico del modelo fue desarrollado para evaluar el análisis de varianza (ANOVA). La significancia estadística del modelo matemático fue determinada por el valor F, y la proporción de la varianza explicada por el modelo, fue dado por el coeficiente múltiple de determinación, R^2 . Para cada combinación de par de variables dependientes, los modelos cuadráticos fueron representados por curvas de superficie de respuestas y por planos de contorno.

La validación del modelo matemático obtenido se verificó, por la aplicación del análisis de varianza y determinación de las desviaciones relativas entre, los valores calculados usando el modelo matemático y los valores experimentales (Leite J. et al.; 2007 y Bas y Boyaci 2007).

3.- Estudios en un fermentador Biostat – M.

Finalmente estudios confirmativos de la fermentación sumergida de *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y-7571, para la producción de inulinasa, se realizarán en matraces agitados y en un bioreactor Biostat-M de 2 litros con control automático de temperatura, agitación y pH, más aireación.

3.3. TECNICAS E INSTRUMENTOS EMPLEADOS.

Las técnicas empleadas en la investigación son: el experimento y la observación:

Materiales:

Microorganismo

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

Extracto de yacón

El yacón procedente de Pariacoto- Ancash, fue lavado, sanitizado y pelado. Se pesó 100 g de yacón y en trozos puestos en 200 ml de agua destilada caliente se licuó, se filtró con una tela doble de muselina acodada, se ajustó el pH a 4,

se esterilizó a 121 °C por 15 min, se dejó enfriar, se envasó en botellas de vidrio con tapa y se guardó en refrigeración (Cazetta, 2005). El extracto obtenido fue caracterizado para azúcares reductores, sacarosa, glucosa, fructosa, fructooligosacáridos (FOS) y proteínas. Antes de usarlo como fuente de carbono y energía se diluyó hasta alcanzar los 8 °Brix. La figura 5 muestra un volumen del extracto de yacón obtenido.

Extracto de espárrago

El espárrago blanco pelado procedente de Virú, fue lavado con agua de grifo caliente y cortados en trozos, se dejó secar en estufa a 80 °C por 20 horas. Luego se molió en un mortero. Se mezclaron 26.6 g de polvo de espárrago en 200 ml de agua destilada caliente, agitado durante 10 minutos. Se filtró con una tela doble de muselina acodada, se dejó enfriar y se ajustó el pH a 4, se esterilizó a 121 °C por 10 min, se dejó enfriar, se envasó en botellas de vidrio con tapa y se guardó en refrigeración (Singh y Bhermi, 2008). El extracto obtenido fue caracterizado para azúcares reductores, sacarosa, glucosa, fructosa, fructooligosacáridos (FOS) y proteínas. Antes de usarlo como fuente de carbono y energía se diluyó hasta alcanzar los 8 °Brix. La figura 6 muestra un volumen del extracto de espárrago obtenido.

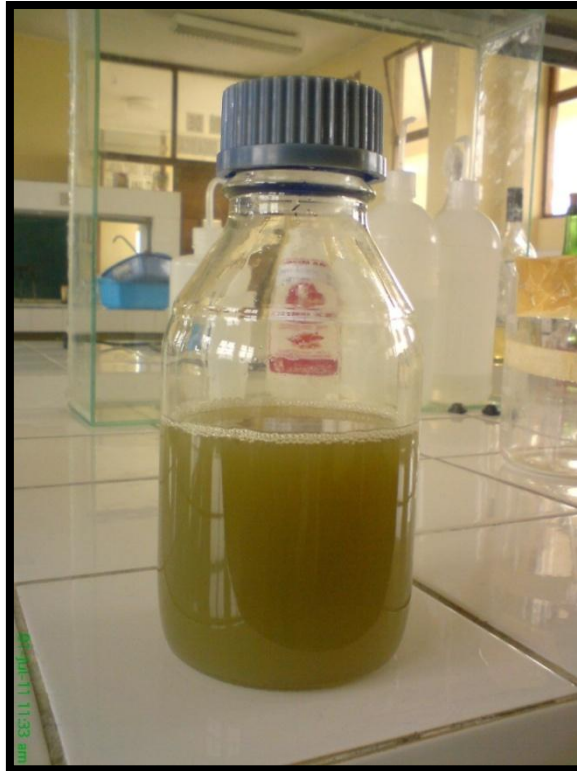


Figura 5. Extracto de yacón



Figura 6. Extracto de espárrago

Medios de cultivo

Se emplearon tres medios de cultivo de acuerdo a la composición descrita en la tabla 4, en base a las referencias (Cazetta et al. 2005; Singh et al. 2007 y Singh y Bhermi 2008) y según los resultados sucesivos obtenidos de aplicar la estrategia experimental. El medio de fermentación fue para desarrollar los diferentes cultivos por lotes para la evaluación y optimización de la producción de la enzima inulinasa por fermentación de *K. marxianus* en matraces y en el bioreactor de laboratorio Biostat- M.

Tabla 4. Composición de medios de cultivo para *K. marxianus* para la producción de inulinasa.

Medio	Nutriente	Concentración (g/L)
Sólido de mantención YM	Extracto de levadura Peptona Extracto de malta glucosa agar	3 5 3 10 20
Activación	Sacarosa (Loba Chemie) Extracto de levadura (Merck) Peptona (Bioceno) MgSO ₄ .7H ₂ O (Sigma) pH 6,0 T 30°C, N 180 rpm	10 3,0 5,0 0,65
Fermentación	Carbohidratos (Sacarosa, inulina de achicoria, extracto de yacón y extracto de espárragos) Extracto de levadura KH ₂ PO ₄ (NH ₄) ₂ SO ₄ MgSO ₄ .7H ₂ O pH ₀ T °C N rpm	1,0

Reactivo del método DNS

El reactivo se utiliza para la determinación de azúcares reductores totales. Para la preparación de este reactivo, se disuelve 30g tartrato de sodio y potasio tetrahidratado y 1.6g de hidróxido de sodio, en aproximadamente 50 ó 60 ml de agua, sobre esta disolución se agrega de a pocos 1 g de ácido 3,5 dinitrosalicílico (Sigma) y se agita hasta la completa disolución de todos los componentes, para posteriormente aforar a 100ml con agua destilada (Bruner 1964).

Reactivo del método de Bradford

El reactivo se utiliza para la determinación de proteínas. Su preparación requiere disolver 0.1 g de azul de Coomassie G-250 (Sigma) en 50 ml de etanol al 98%, más 100 ml de ácido fosfórico al 85% y con agua destilada aforar a un litro (Bradford 1976).

Equipos e instrumentos principales

Microscopio electrónico

Refractómetro automático J157 Rudolph.

Agitador de tubos Maxi Mix. Marca: Thermolyne. Modelo: N°M 37615

Agitador magnético. Marca Thermolyne Corporation. Nuova II. Modelo N° S18520-26

Agitador Orbital Shaker. Marca: Lab Line. Modelo: 4628-1

Fermentador de laboratorio BIostat M, de 2 litros, con tres rotores tipo turbina, con control de T y velocidad de agitación N

Reactor de vidrio enchaquetado de 200 ml.

Autoclave. Marca: Pselecta. Modelo: S-477 MED

Balanza analítica. Marca: OHAUS Corp. U.S.A. Modelo: Item N° AR2140

Centrifuga. Marca P-selecta. Modelo: N° 143078

Equipo de baño María. Marca: Biotron. Modelo: Electronic Thermostat Btr-65

Espectrofotómetro Marca: Milton Roy Company. Modelo: Spectronic 20D

Estufa. Marca: P-selecta. Modelo: 209

Incubadora. Marca: P-selecta. Modelo: 206

Micro pipetas de 200-1000 µl. Marca: Brand. Modelo: Transferpette®

1pH-metro. Marca WTW. Modelo: Inolab pH Level 2

Refrigerador. Marca Phillips. Volumen 12 pies³

Cromatógrafo de gases GC-2010 Mitsubishi.

Cromatógrafo líquido de alta performance (HPLC) con equipamiento Perkin-Elmer series 200, con detector de índice de refracción y columna BP-100 Ag⁺.

Técnicas e instrumentos de análisis:

Técnica de medición concentración celular

La concentración celular de los caldos de fermentación se cuantificó por densidad óptica a 640 nm, en base a una curva de calibración (Anexo 1) (Cooney, 1981).

Técnicas de análisis de azúcares reductores

Para la cuantificación de azúcares reductores totales se utilizó el método DNS.

El procedimiento de análisis fue el siguiente:

- a) Se añade un volumen del reactivo DNS a un volumen de muestra a analizar.
- b) Se mantiene la mezcla en un baño de agua a ebullición durante 5 minutos para luego dejar enfriar.
- c) Se añaden 10 volúmenes de agua destilada.
- d) Se lee la absorbancia a 540 nm, utilizando agua como blanco.
- e) La concentración se obtiene interceptando la medida de absorbancia en la curva de calibrado.

La curva de calibrado obtenida, a partir de muestras de solución de fructosa de concentración conocida y analizadas según este procedimiento se muestra en el Anexo 2.

Técnicas de análisis de proteínas

Para la determinación de proteínas del caldo de cultivo por el método de Bradford. El procedimiento de análisis fue el siguiente:

- a) Se agrega a un tubo de ensayo 500 μ l de muestra convenientemente diluida.
- b) Se añade 5 ml de reactivo de Bradford (a cada muestra) y se deja reaccionar durante 5 minutos.
- c) Se lee la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm, contrastándola con un blanco de agua destilada de 500 μ L.
- d) La concentración se obtiene interceptando la medida de absorbancia en la curva de calibrado.

La curva de calibrado obtenida, a partir de muestras de solución de suero bovino de concentración conocida y analizadas según este procedimiento se muestra en el Anexo 3.

Técnica de análisis de sólidos disueltos

La determinación de sólidos disueltos (sacarosa, otros azúcares, minerales) para el extracto de yacón y el extracto de espárrago, se utilizó el método de refractometría con el refractómetro automático, expresándose los valores en °Bx.

Técnica de análisis de sacarosa, glucosa, fructosa, FOS y etanol.

La determinación del etanol se realizó por cromatografía de gases para examinar la presencia de alcohol en las experiencias de validación. El análisis de sacarosa, glucosa, fructosa y FOS se hizo por HPLC (Vega y Zúñiga-Hansen 2011) para determinar los sacáridos o azúcares presentes en los extractos de yacón y espárragos. Estos análisis se realizaron en los laboratorios de la Escuela de Ingeniería Bioquímica de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso por HPLC-RI. Los cromatogramas respectivos se muestran en los anexos 4, 5 y 6.

Técnica de determinación del rango de linealidad y actividad de la enzima

El rango de linealidad enzimático se determinó midiendo a tiempos cortos, la producción de azúcares reductores por la reacción catalítica de cada sustrato a diferentes diluciones del extracto crudo enzimático, según como convino. Se graficó la concentración de producto contra el tiempo de reacción y se expresó correctamente los valores de las actividades volumétrica y específica.

A partir de la información de la determinación del rango de linealidad, la **actividad enzimática** del sobrenadante de cada muestra de caldo de fermentación, se determinó midiendo la velocidad inicial de producción de azúcares reductores en condiciones controladas. La fructosa de 2 g/L como solución estándar se utilizó para elaborar la curva de calibrado para determinar los azúcares reductores por DNS.

Una unidad de actividad de inulinasa (U) fue definida como la cantidad de enzima que libera 1 micromol de azúcares reductores (medidos como fructosa) desde inulina, sacarosa o rafinosa según la experiencia planificada, bajo las condiciones ambientales usadas en esta investigación.

La actividad volumétrica (U/mL), definida como una unidad de actividad de inulinasa por ml de extracto crudo enzimático.

La actividad específica (U/mg), definida como una unidad de actividad de inulinasa por mg de proteína del extracto crudo enzimático.

Técnica de determinación de los parámetros cinéticos

La determinación de los parámetros cinéticos aparentes de la inulinasa, se determinaron por mediciones de velocidad inicial de producción de azúcares reductores a diferentes concentraciones de sustrato saturante (El formato se muestra en el anexo 7).

Técnicas de análisis estadístico

Para la etapa del diseño de selección de Plackett & Burman, los resultados fueron analizados usando el *software for experiments Design Expert* versión 7,0 (Stat_Ease 2005, USA) (Kalil S. et al. 2000) y para la etapa de optimización final según el diseño factorial completo (Diseño Central Compuesto Rotacional – DCCR) y el análisis o metodología de superficie de respuesta (RSM), los resultados fueron analizados usando el *software STATISTICA* para Windows versión 8.0 (Stat Soft. Inc. 2007, USA) (Vega y Zúñiga 2011). Las diferencias fueron consideradas significativas a valores de $p \leq 0.05$.

3.4. PROCEDIMIENTO DE LA RECOLECCIÓN DE DATOS.

Preparación del inóculo

Los inóculos fueron preparados en un medio de activación celular (Tabla 4) esterilizado. Una azada de células de *K. marxianus* mantenidas en el agar inclinado, se transfirió en condiciones de asepsia, dentro de un matraz Erlenmeyer de 125 mL conteniendo 30 mL del medio de activación e incubados en un agitador rotatorio (shaker) a 180 rpm y a 30°C por 10 horas.

Según cada experimento, se mezclaron y homogenizaron varios inóculos preparados en un solo matraz Erlenmeyer estéril de 500 mL, luego se distribuyeron fracciones de 22,5 mL de inóculo, en varios balones con tapa de 100 mL esterilizados y fueron guardados en refrigeración. Antes de ser usados, cada inóculo se le dejaba activar en una incubadora a 30°C por una hora.

El inóculo para la fermentación en el bioreactor Biostat-M, se preparó en un matraz Erlenmeyer de 500 mL, conteniendo 68,4 mL de medio de activación incluyendo el 10%(v/v) de inóculo inicial, incubados a 30 °C y agitados en shaker a 180 rpm por 10 horas.

Cultivos por lote

Las experiencias de cultivos celulares por lotes fueron realizados en matraces Erlenmeyer conteniendo el 20 %(v/v) de volumen de medio líquido, para asegurar la mayor área de transferencia de oxígeno, incubados en un shaker con control automático de velocidad de agitación y temperatura. El ajuste del pH inicial de cada medio de fermentación se hizo con H_3PO_4 0,1M inmediatamente después de inoculado.

Las muestras tomadas del caldo de fermentación fueron para determinar crecimiento celular por densidad óptica y el valor de pH, luego centrifugadas a 5000 rpm por 15 minutos y los sobrenadantes constituyeron los extractos crudos enzimáticos, que se utilizaron para determinar la concentración de proteínas por el método espectrofotométrico de Bradford y la actividad catalítica inulinasa.

Los cultivos por lotes preliminares se realizaron para determinar los perfiles característicos de las cinéticas de crecimiento y producción del microorganismo, comparar sus cinéticas actuando sobre distintas fuentes de carbono y energía: sacarosa 10 g/L (Kalil S. et al. 2000), inulina de achicoria 10 g/L, extracto de espárrago 30 % v/v (Singh y Bhermi 2008), extracto de yacón 50 % v/v (Cazetta et al. 2005) y una de control sin fuente de carbono específica. La composición de los demás nutrientes fue: Extracto de levadura 5 g/L; KH_2PO_4 1 g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5 g/L y $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L. Las cinéticas de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 se siguieron durante 30 horas en matraces Erlenmeyer de 500 ml conteniendo 100 ml de medio, inoculados con 10 %v/v, pH inicial 5,0 y agitados en shaker a 180 rpm y temperatura controlada de 30 °C.

El caldo obtenido después de las 30 horas de cultivo celular en inulina achicoria, fue centrifugado a 5 000 rpm por 15 minutos y el líquido sobrenadante constituyó el **extracto crudo enzimático** el que sirvió para realizar las experiencias previas de determinación de actividad y parámetros cinéticos de la inulinasa en el extracto, que sirvieron para estandarizar la técnica de determinación de actividad inulinasa a ser utilizada en las experiencias de optimización de la fermentación.

En base a las referencias (Kushi, Monti, y Contiero, 2000 y de Paula, Cazetta, Monti y Contiero, 2008) se definieron las condiciones ambientales de reacción catalítica y las actividades de inulinasa, para cada sustrato a experimentar.

Los cultivos por lotes para desarrollar el plan experimental según el Diseño de Plackett & Burman fueron doce y por duplicado, se realizaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 50 mL de medio líquido con la composición y condiciones ambientales y operacionales según el diseño. Durante estos cultivos se tomaron muestras de 3 mL a las 0, 24 y 30 horas y se determinaron, biomasa celular, pH, concentración de proteínas y actividad catalítica de la inulinasa del extracto crudo sobre sustrato sacarosa. Esta experiencia sirvió para identificar y seleccionar tres variables independientes más importantes, que al hacerlas variar sus valores de un nivel bajo (-) a un nivel alto (+) afectaron sensiblemente el valor de la actividad.

El número de los cultivos por lotes para desarrollar el plan experimental de optimización por DCCR y RSM, fueron diecisiete y por duplicado, también se realizaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 50 mL de medio líquido con la composición y condiciones ambientales y operacionales según el diseño. Durante estos cultivos se tomaron muestras de 3 mL a las 0, 24 y 30 horas y se determinaron, biomasa celular, pH, concentración de proteínas y actividad catalítica. Esta experiencia sirvió para mejorar la producción de inulinasa de *K. marxianus*, optimizando la composición del medio y las condiciones ambientales de fermentación.

Los cultivos por lote para validación del modelo matemático, se realizaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 50 mL de medio líquido con valores de la composición y condiciones ambientales y operacionales de la región óptima del experimento. También se siguió una cinética de crecimiento y producción de inulinasa con los parámetros optimizados en matraces de 500 mL conteniendo 100 mL de medio líquido.

Finalmente estudios confirmativos de la fermentación sumergida del **cultivo por lotes** con seguimiento de la cinética en el **fermentador Biostat-M** de 2 litros, se realizó por duplicado, conteniendo 1600 mL de medio líquido de composición optimizado y condiciones ambientales y operacionales optimizados, aireación 1.7 L/min por 30 horas, tomándose muestras planificadas de 3 mL cada una.

En cada muestra primero se midió la absorbancia para la determinación de biomasa celular, luego fue centrifugada a 5 000 rpm por 15 minutos y el sobrenadante fue utilizado para la determinación de proteínas y la actividad enzimática. Las figuras 7 y 8 muestran los equipos de fermentación utilizados.



Figura 7. Cultivo en matraz en el shaker



Figura 8. Cultivo en el fermentador

Caracterización cinética de la inulinasa en el extracto crudo

La caracterización cinética de la inulinasa en el extracto crudo comprendió las experiencias de, la determinación del rango de linealidad, la actividad catalítica actuando sobre sacarosa, rafinosa e inulina y la determinación de los parámetros cinéticos K y V.

Técnica de determinación del rango de linealidad y actividad de la enzima

Una unidad de actividad de inulinasa (U) definida como la cantidad de enzima que libera 1 micromol de azúcares reductores (medidos como fructosa) desde inulina, sacarosa o rafinosa según convino, por minuto a pH 5.0 y 55 °C.

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

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

Las experiencias para la determinación del rango de linealidad se realizaron a diferentes diluciones del extracto crudo enzimático, 1:1,1:2, 1:4 y 1:6 según como convino. Se graficó la concentración de producto contra el tiempo de reacción y se expresó correctamente los valores de las actividades volumétrica y específica. El procedimiento fue el siguiente:

- Se prepararon 4 tubos de ensayo con tapa, se agregó a cada uno 2.5 mL de solución de sustrato a la concentración definida: concentraciones estándares de **sacarosa 20 g/L; rafinosa 15 g/L e inulina achicoria 10 g/L**, a pH 5,0 con **tampón citrato- fosfato 0,05 M** (Kalil et al. 2001 y Rouwenhorst et al. 1988) y se calentaron en un baño maría a 55°C durante 2 minutos.
- Se adicionó 0.25 mL de extracto crudo enzimático a cada uno de los 4 tubos de ensayo y se dejó reaccionar por los tiempos requeridos por el experimento: 5, 10, 15 y 20 minutos, respectivamente (Ettalibi y Baratti

2001; Ricca et al. 2009; Singh, R.; Singh, B. y Puri, M. 2007b y Singh y Bhermi 2008).

- La reacción se detuvo introduciendo cada tubo en baño de agua a 100 °C por 3 minutos y luego puestos en agua helada.
- Simultáneamente en otros 2 tubos se hicieron los blancos para el sustrato y para el extracto crudo enzimático.
- Finalmente se hicieron las determinaciones de azúcares reductores.

En base a la información de la determinación del rango de linealidad, la **actividad enzimática** del sobrenadante de cada muestra, tomada durante las experiencias de los cultivos celulares por lote, fue determinada a través del ensayo de azúcares reductores formadas por incubación durante 10 minutos de 0.25 ml del extracto enzimático en 2.5 mL de solución estándar de inulina de 10 g/L o solución estándar de sacarosa 20 g/L, en tampón citrato-fosfato pH 5,0 y 0,05 M, usando el método del DNS. La fructosa de 2 g/L como solución estándar se utilizó para elaborar la curva de calibrado.

Técnica de determinación de los parámetros cinéticos

La determinación de los parámetros cinéticos aparentes, se determinaron por mediciones de velocidad inicial de reacción a diferentes concentraciones de sustrato saturante, para ello fueron utilizados dos reactores de vidrio enchaquetados con volúmenes líquido de 33 mL, con control de temperatura a 55 °C, agitación magnética 180 rpm y pH 5,0 regulado con buffer citrato-fosfato 0,05 M. El sistema reactor se muestra en la figura 9.



Figura 9. Sistema experimental para determinar los parámetros cinéticos de la inulinasa.

CAPITULO IV

DESARROLLO DEL ANÁLISIS, INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN.

4.1 CARACTERIZACIÓN DE LOS EXTRACTOS DE YACÓN Y ESPÁRRAGO.

La obtención de los extractos de yacón y espárrago se hizo conforme a lo indicado en la sección 3.3. La caracterización de los sacáridos o azúcares en los extractos se presenta en la tabla 5, información obtenida a partir de los cromatogramas del HPLC-IR que se muestran en los anexos 5 y 6.

Tabla 5. Composición química de los extractos de yacón y espárragos ajustados a pH 4.0 y esterilizados.

Componente	Extracto de yacón	Extracto de espárrago
Sólidos disueltos °Bx	11,0	9,8
Azúcares reductores g/L	32,14	43,0
Proteínas mg/L	204,3	366,9
Fructosa g/L	24,71	18,78
Glucosa g/L	12,20	2,97
Sacarosa g/L	4,29	No identificado
Kestosa (GF3) g/L	6,98	No identificado
Nistosa (GF4) g/L	6,06	No identificado
Fructofuranosilnistosa (GF5) g/L	4,26	No identificado

A partir del cromatograma para el extracto de yacón se estimó aproximadamente una concentración de oligosacáridos (DP de seis y más monómeros) de 23 g/L. Los resultados mostrados en la tabla 5 están en acuerdo con los reportados en la literatura para los extractos de yacón y espárragos (Hernan, Freire y Pazos, 1999 y Singh y Bhermi, 2008).

En la Tabla 5 se aprecia para el extracto de yacón que, la concentración de fructosa es aproximadamente dos veces que la de glucosa, y esta a su vez tres veces la de sacarosa y en conjunto entre fructosa y glucosa se ha encontrado un 64% más de éstos azúcares en el extracto de yacón que en el extracto de espárragos. Sin embargo esta relación está en desacuerdo con el valor para la

concentración de los azúcares reductores obtenido por el método DNS. Estos resultados sugieren que con el método de DNS hay interferencias por ser este un método colorimétrico espectrofotométrico y el color café intenso y otros componentes no identificados del extracto de espárragos estarían sobredimensionando este valor.

4.2 CULTIVOS POR LOTES PRELIMINARES

El objetivo de estas experiencias fue, determinar y comparar los perfiles característicos del crecimiento celular y producción de proteínas en matraces de *K. marxianus*, en diferentes fuentes de carbono y energía, evaluar el valor del pH durante el cultivo y determinar el tiempo de la fermentación en la que se evaluará la actividad del extracto enzimático.

Los experimentos se desarrollaron conforme a los procedimientos de la sección 3.4. Las figuras del 10 al 14 muestran los perfiles de crecimiento celular y producción de proteínas de *K. marxianus* actuando sobre sacarosa, inulina de achicoria, extracto de espárragos, extracto de yacón y un experimento de control, los cuales representan típicos modelos cinéticos de producción asociados al crecimiento celular.

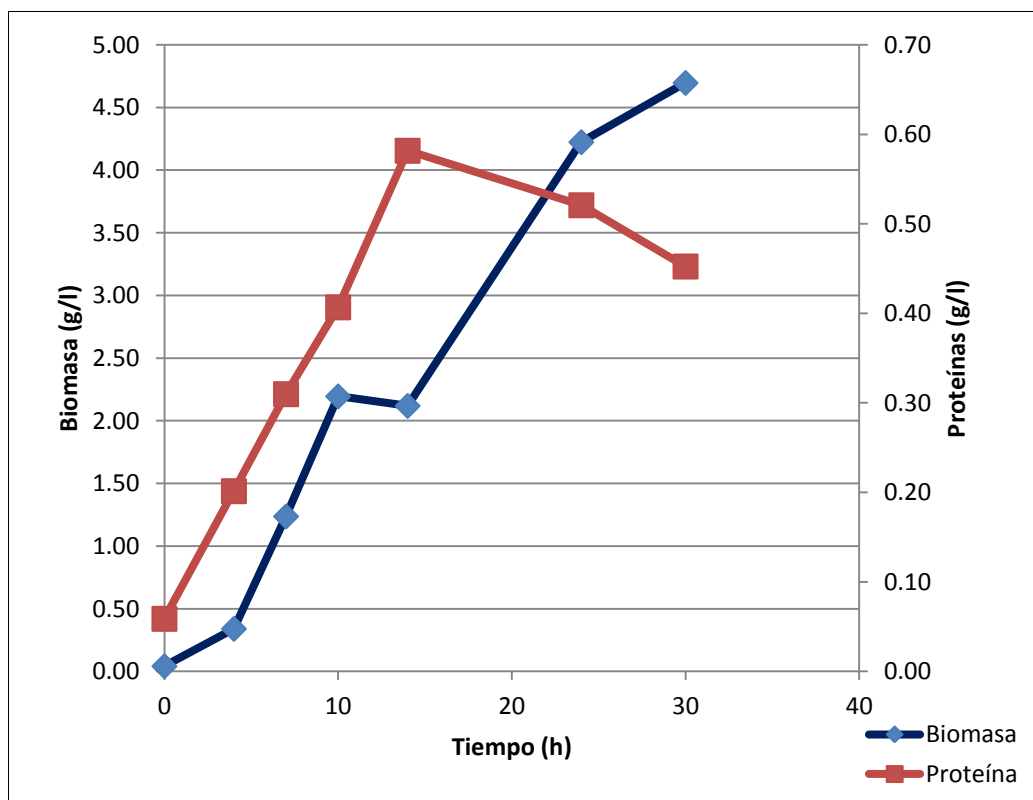


Figura 10. Cinética de crecimiento celular y producción de proteínas de *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y7571 durante 30 horas en un medio de cultivo con sacarosa 10 g/L. Experiencia realizada a pH_0 5.0 a 30 °C y por lote en matraces Erlenmeyer de 500 mL con 100 mL de medio de cultivo y agitado en shaker a 180 rpm.

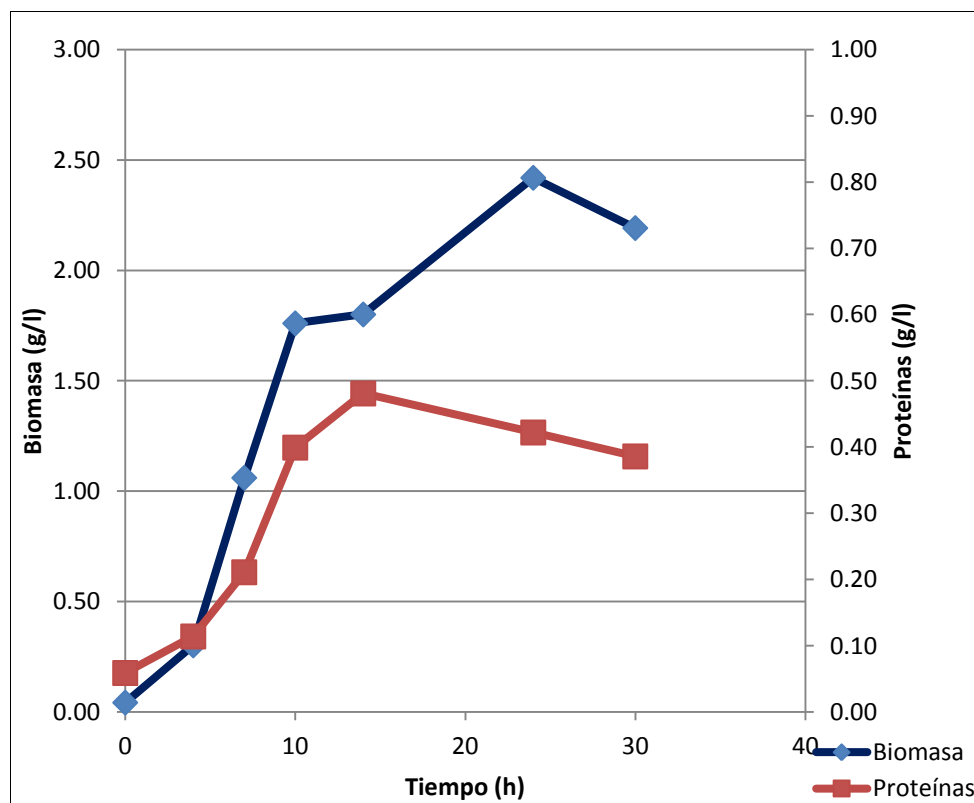


Figura 11. Cinética de crecimiento celular y producción de proteínas de *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y7571 durante 30 horas en un medio de cultivo con inulina 10 g/L. Experiencia realizada a pH_0 5.0 a 30 °C y por lote en matraces Erlenmeyer de 500 mL con 100 mL de medio de cultivo y agitado en shaker a 180 rpm.

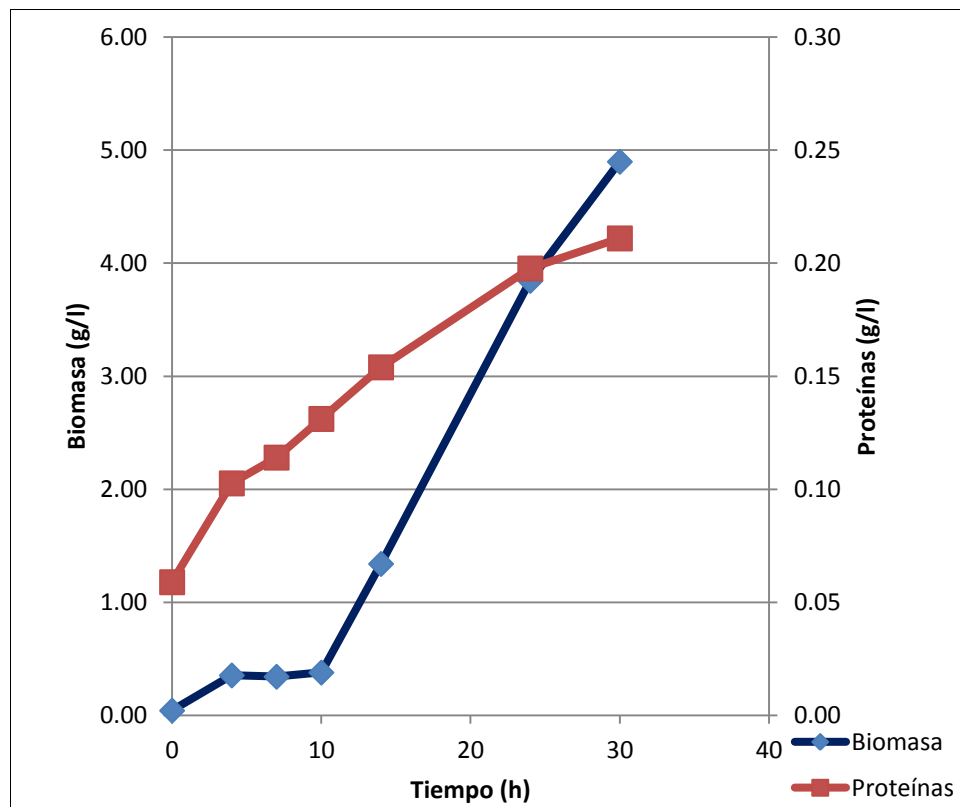


Figura 12. Cinética de crecimiento celular y producción de proteínas de *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y7571, durante 30 horas en un medio de cultivo con extracto de espárrago al 30% (v/v). Experiencia realizada a pH_0 5.0 a 30 °C y por lote en matraces Erlenmeyer de 500 mL con 100 mL de medio de cultivo y agitado en shaker a 180 rpm.

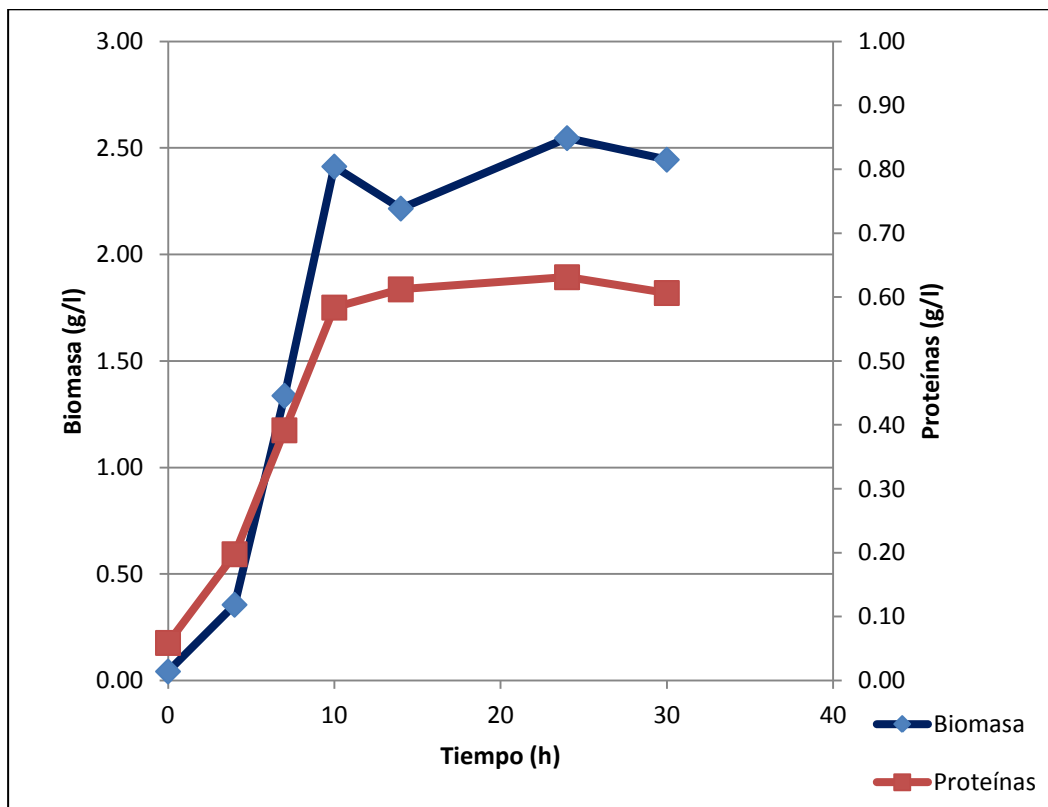


Figura 13. Cinética de crecimiento celular y producción de proteínas de *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y7571 durante 30 horas en un medio de cultivo con extracto de yacón al 50% (v/v). Experiencia realizada a pH₀ 5.0 a 30 °C y por lote en matraces Erlenmeyer de 500 mL con 100 mL de medio de cultivo y agitado en shaker a 180 rpm

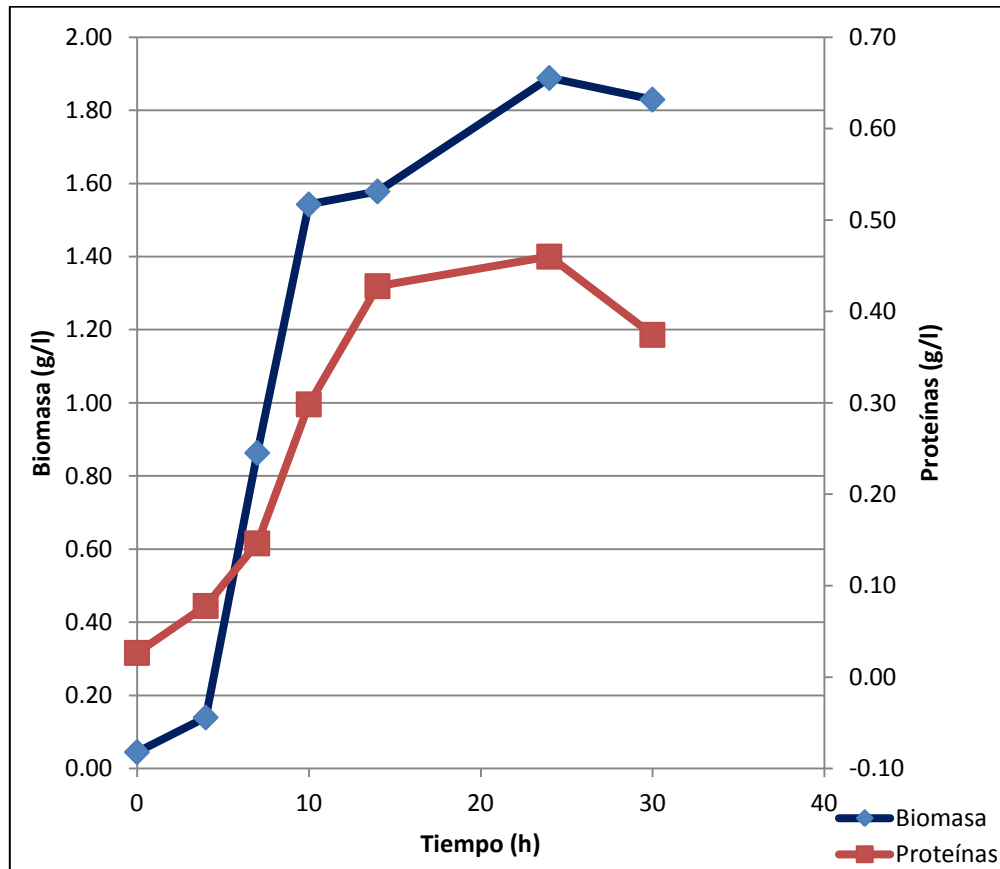


Figura 14. Cinética de crecimiento celular y producción de proteínas de *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y7571 durante 30 horas en un medio de cultivo sin fuente de carbono específica (control). Experiencia realizada a pH_0 5.0 a 30 °C y por lote en matraces Erlenmeyer de 500 mL con 100 mL de medio de cultivo y agitado en shaker a 180 rpm.

Cuando comparamos estas figuras, el crecimiento celular máximo a las 30 h de cultivo se alcanzó, con el medio que contuvo el extracto de espárrago correspondiendo a 4,9 g/L. Sin embargo, con este sustrato se obtuvo la menor concentración de proteínas de 0,211 g/L.

En las fermentaciones con cada uno de las fuentes de carbono y energía se monitoreó, el valor del pH el cual incrementó con el transcurso del tiempo desde un valor inicial de 5,0 para todos los sustratos. Con sacarosa el incremento del pH fue hasta 6,23; con inulina hasta 7,67; con extracto de espárrago hasta 6,07; con extracto de yacón hasta 7,07 y con el medio control hasta 7,42. El valor del pH del cultivo influye significativamente en la actividad de la inulinasa. Por ejemplo la actividad de inulinasa para levaduras se ha reportado entre 3,5 a 5,3 (Cazetta et al 2005). Sin embargo estudios más recientes (Singh y Bhermi 2008) utilizando una cepa de *Kluyveromyces marxianus* YS-1 han alcanzado una actividad de inulinasa máxima en un pH 6,5. En otro estudio Singh et al 2007, sobre la producción de inulinasa con *Kluyveromyces sp*, reportaron un rango de pH desde 6,0 a 7,0. En los cultivos con inulina, extracto de yacón y en el control, en que el valor del pH superó el valor de 7, se alcanzaron los valores más bajos de crecimiento celular.

En general se observó que el pH varió de acuerdo al tipo de nutrientes empleados y los extractos de espárrago y yacón son medios complejos que muestran en su composición proteínas, vitaminas, sales, etc. que influyen en la fermentación microbiana. En el cultivo de control, sin fuente de carbono específico (únicamente extracto de levadura), se experimentó un menor crecimiento celular de 1,83 g/L y proteínas de 0.37 g/L debido al aporte de nitrógeno y carbono del extracto de levadura en el medio de cultivo. Se comprobó que la proteína del caldo de fermentación del control no experimentó actividad inulinasa.

Con los resultados de estas experiencias, se decidió realizar una fermentación de *K. marxianus* en un medio conteniendo inulina de achicoria en una concentración de 10 g/L y los otros nutrientes como en las experiencias previas y a las mismas condiciones ambientales. La única diferencia fue que se empleó un inóculo recién activado y aproximadamente 3,5 veces más concentrado que

el anterior cultivo, dado que la cinética de crecimiento en un cultivo por lote depende de sus condiciones iniciales (Liu Y, Liu Q y Tay 2005).

La cinética de crecimiento celular y producción se ilustra en la figura 15, en donde se observa que el pH del cultivo disminuyó ligeramente desde 5,0 a 4,36, lo que sugiere que las células podrían haber metabolizado el sulfato de amonio durante las 30 h de fermentación, acarreado la liberación de iones hidronio lo que conlleva a una caída del pH. En este valor de pH de fermentación se estimó una mayor actividad de la inulinasa.

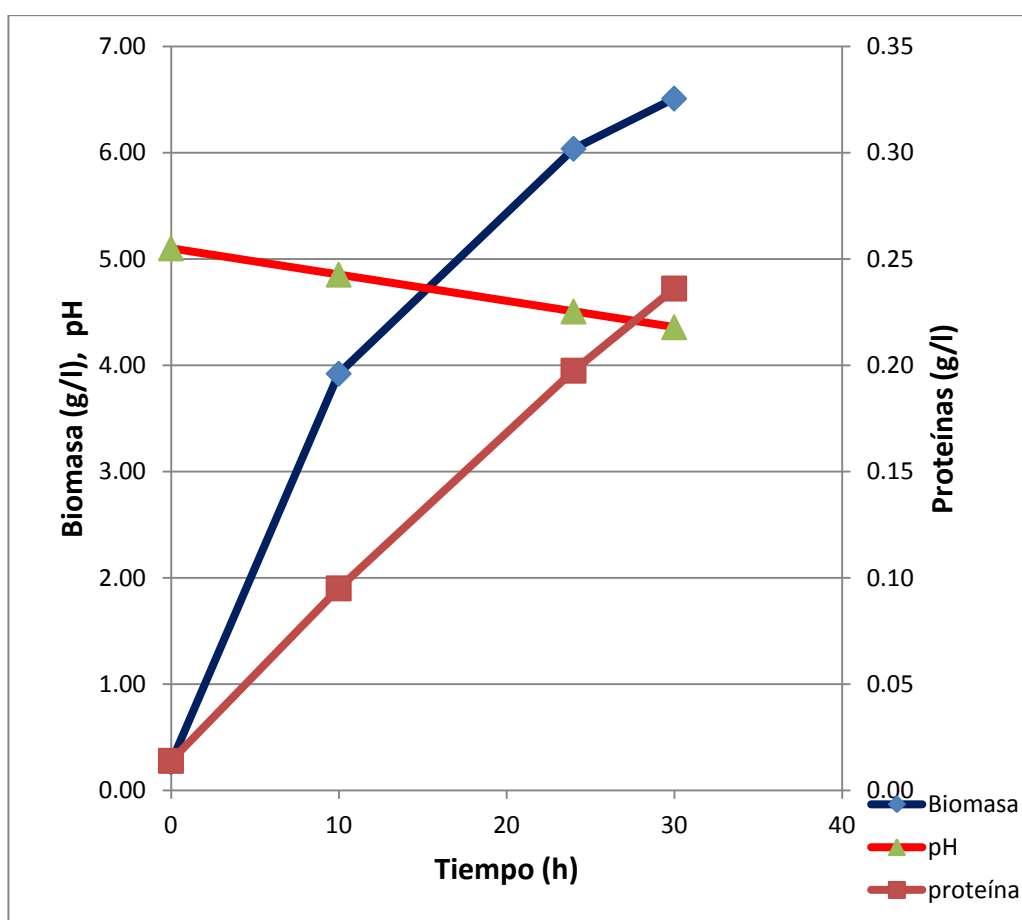


Figura 15. Cinética de crecimiento celular y producción de proteínas de *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y7571 y variación del pH, fermentando durante 30 horas en un medio de cultivo con inulina 10 g/L. Experiencia realizada a pH₀ 5.0 a 30 °C y por lote en matraces Erlenmeyer de 500 mL con 100 mL de medio de cultivo y agitado en shaker a 180 rpm.

El caldo obtenido al término de las 30 horas de cultivo celular con inulina achicoria, fue centrifugado a 4500 rpm por 15 minutos y el líquido sobrenadante constituyó el extracto crudo enzimático, el que se empleó para realizar las experiencias previas de determinación de actividad y parámetros cinéticos de la inulinasa en el extracto, que sirvieron para estandarizar la técnica de determinación de actividad a ser utilizada en las experiencias de optimización de la fermentación.

4.3 ACTIVIDAD Y PARÁMETROS CINÉTICOS ENZIMÁTICOS.

La determinación del rango de linealidad, actividad y los parámetros cinéticos de la inulinasa en el extracto crudo se realizó según lo detallado en la sección correspondiente 3,4.

El extracto enzimático del caldo de fermentación en matraces de *K. marxianus* tuvo una concentración proteica de 232 mg/L.

Las figuras 16, 17 y 18 muestran los perfiles de los rangos de linealidad del extracto enzimático catalizando la hidrólisis de sacarosa, rafinosa e inulina respectivamente.

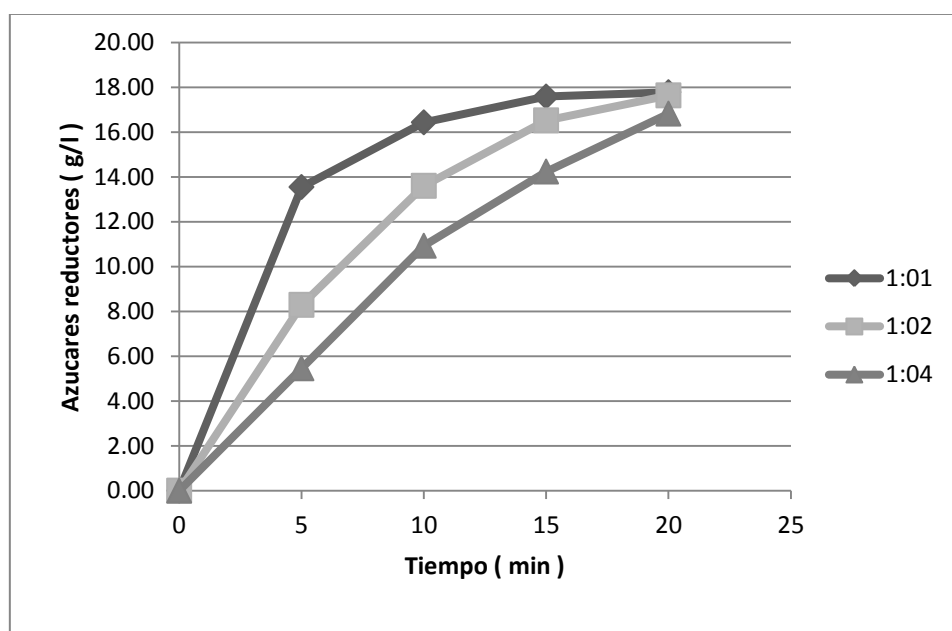


Figura 16. Perfiles de rango de linealidad y actividad del extracto enzimático (diluciones: 1:01; 1:02 y 1:04) actuando sobre sacarosa.

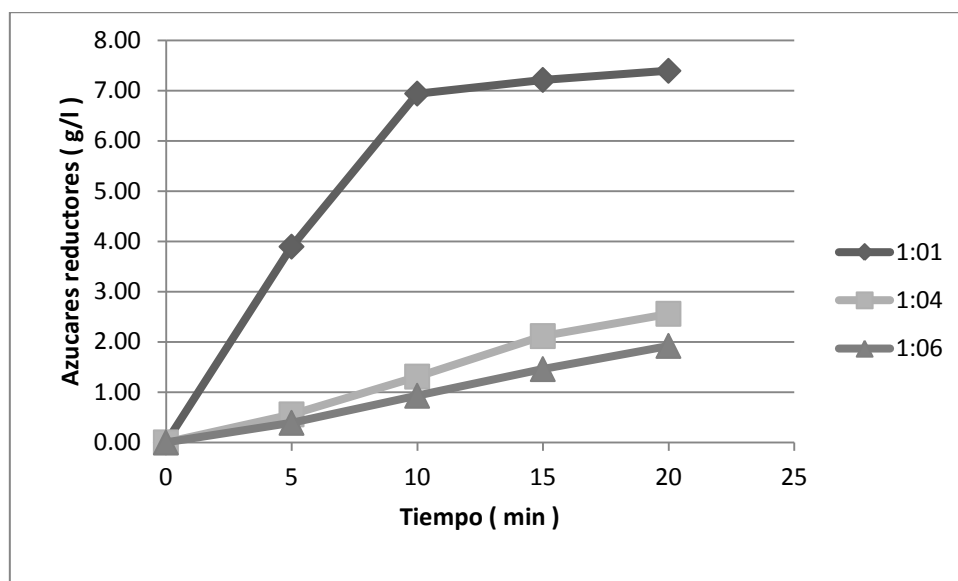


Figura 17. Perfiles de rango de linealidad y actividad del extracto enzimático (diluciones: 1:01; 1:04 y 1:06) actuando sobre rafinosa.

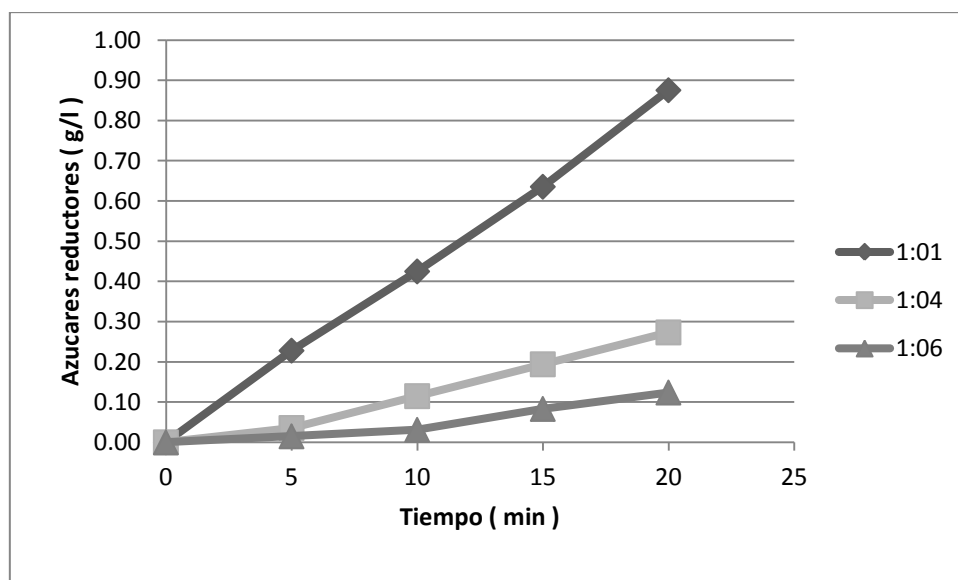


Figura 18. Perfiles de rango de linealidad y actividad del extracto enzimático (diluciones: 1:01; 1:04 y 1:06) actuando sobre inulina.

Las figuras muestran perfiles típicos de las velocidades de reacción inicial, ya que con menor concentración del extracto enzimático se obtienen menores pendientes del rango lineal para cada sustrato.

La tabla 6 muestra los valores de actividad calculados a partir de los perfiles, en las zonas de linealidad, de las tres figuras anteriores.

Tabla 6. Valores de actividad volumétrica a_v , específica a_e y actividad por volumen de reacción a_{reac} , del extracto enzimático del caldo de fermentación de *K. marxianus* actuando sobre sacarosa, rafinosa e inulina.

sustrato	a_v (U/mL)	a_e (U/mg)	a_{reac} (U/L)
Sacarosa	266,93	1150,57	6066,67
Rafinosa	35,93	154,89	544,44
Inulina	2,63	11,35	239,44

Se puede observar en la tabla 6, que el extracto crudo enzimático exhibe actividad catalítica para la hidrólisis de sacarosa, rafinosa e inulina, sin embargo la actividad relativa de sacarosa respecto a inulina fue de 101 veces mayor. Así mismo la actividad específica alcanzada sobre inulina fue de 11 350 U/g, dos veces mayor que lo reportado para una enzima comercial Fructozyme LTM de 5 500 U/g (Rocha et al. 2006). Los resultados sugieren que las inulinasas del caldo de cultivo poseen sitios catalíticos comunes, pero diferentes sitios de enlace para la hidrólisis de inulina y sacarosa (Rocha et al. 2006, Kushi et al. 2000 y Rouwenhorst, y Van Dijken 1988).

Las figuras 19, 20 y 21 muestran los resultados de mediciones de velocidad de reacción inicial en diferentes concentraciones saturantes para la enzima, de sustratos sacarosa, rafinosa e inulina convenientemente diluidas, catalizadas por el extracto crudo enzimático.

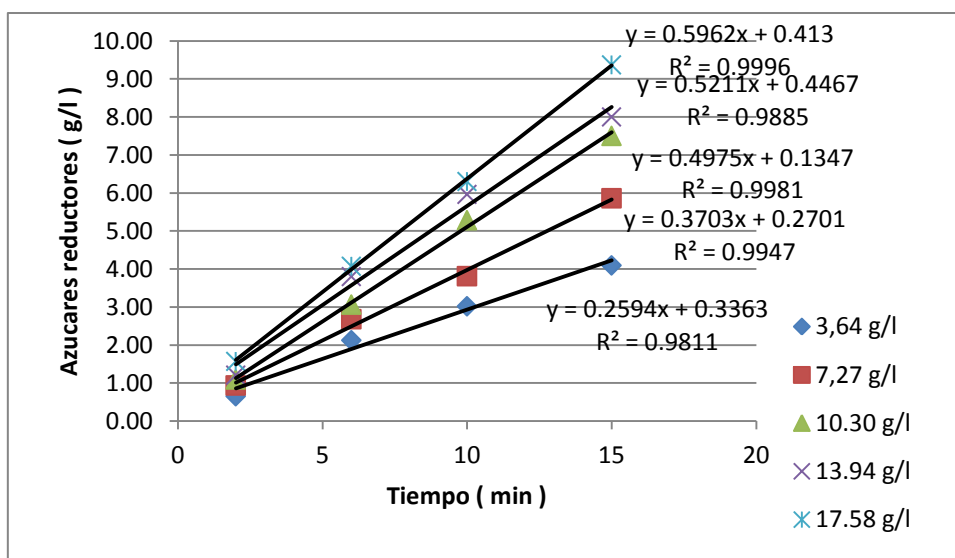


Figura 19. Líneas de tendencia de mediciones de velocidad inicial de reacción a diferentes concentraciones de **sacarosa** (3,64 – 17,58 g/L) catalizada por el extracto crudo enzimático diluido 1:5.

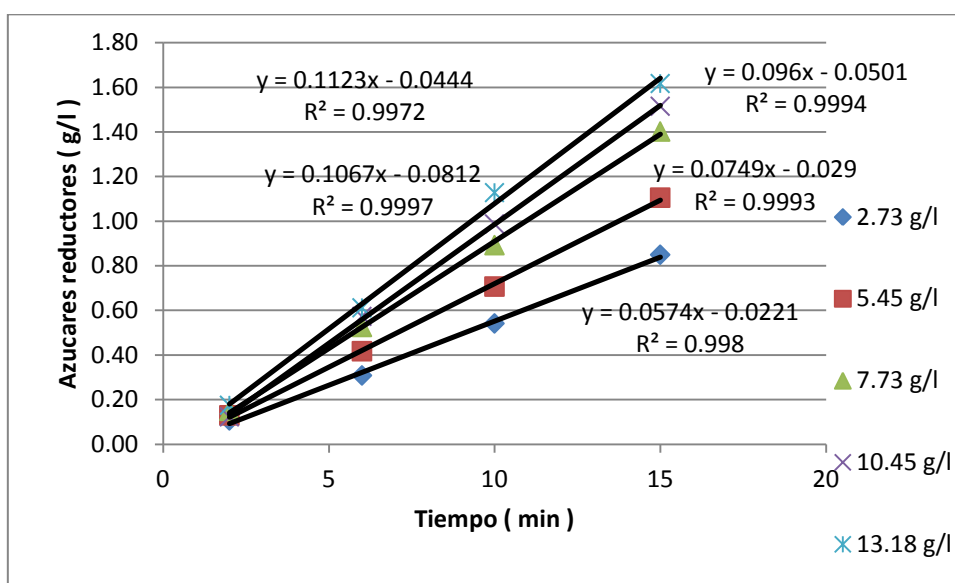


Figura 20. Líneas de tendencia de mediciones de velocidad inicial de reacción a diferentes concentraciones de **rafinosa** (2,73 – 13,18 g/L) catalizada por el extracto crudo enzimático diluido 1:6.

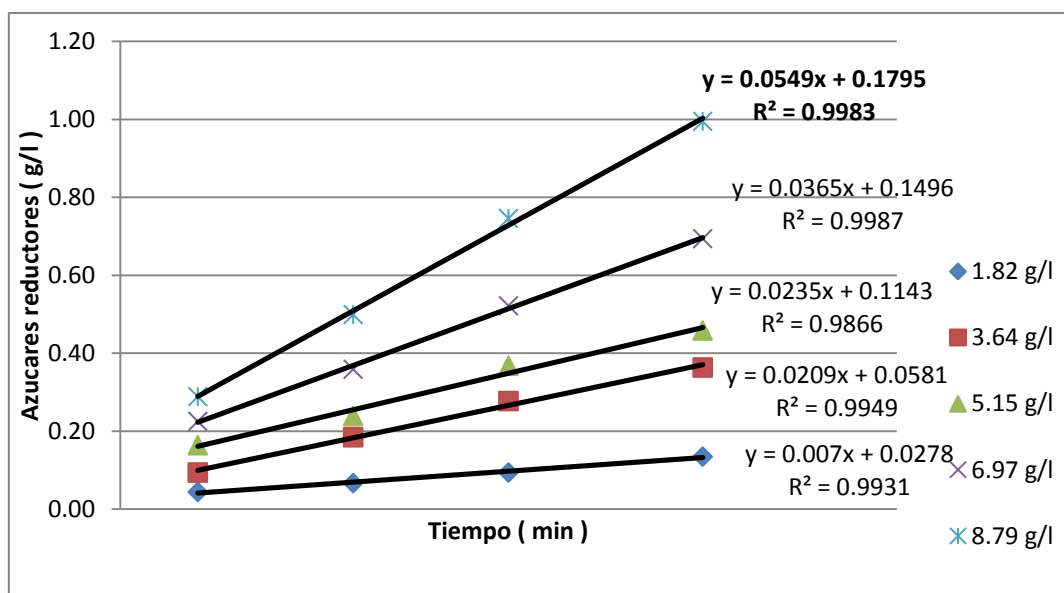


Figura 21. Líneas de tendencia de mediciones de velocidad inicial de reacción a diferentes concentraciones de **inulina** (1,82 – 8,79 g/L) catalizada por el extracto crudo enzimático diluido 1:1.

De las figuras 19 a la figura 21, se observa que las velocidades de reacción iniciales aumentaron con el incremento en la concentración del sustrato, lo cual se explica con en el modelo de Michaelis- Menten.

En la tabla 7 se muestra los valores de los parámetros cinéticos aparentes V_{ap} y K_{ap} estimados a partir de los datos de las tres figuras anteriores, usando el gráfico de inversos de Lineweaver-Burk.

Tabla 7. Valores de los parámetros cinéticos aparentes del extracto enzimático del caldo de fermentación de *K. marxianus* actuando sobre sacarosa, rafinosa e inulina.

sustrato	$V_{ap}(g/L \cdot min)$	$K_{ap}(g/L)$
Sacarosa	4,3077	42,9327
Rafinosa	0,8802	26,2623
Inulina	0,0867	8,5904

Al comparar los valores de V_{ap} de la tabla 7, se observa que el extracto enzimático ejerce reactividad catalítica más alta sobre las moléculas de

sacarosa que de los otros sustratos, mientras que comparando los valores de K_{ap} se observa que la enzima experimenta más afinidad por la inulina, seguida por la rafinosa. Sin embargo en un estudio por Kushi et al. 2000, reportaron que el orden de afinidad se invierte primero la sacarosa, seguido por rafinosa y finalmente por inulina, aunque el orden con la reactividad catalítica si coincide. Esta falta de congruencia entre los datos se puede explicar por que, Kushi et al. 2000 utiliza otra cepa de *K. marxianus* ATCC 1645.

Se puede también observar en la tabla 7 que el valor de V_{ap} , del extracto crudo enzimático actuando sobre inulina es la mitad que el dato publicado (0,1724 g/L*min) (Ricca et al. 2009), lo que implica, es decir expresa menor reactividad catalítica que la enzima comercial, mientras que ésta por su valor de K_{ap} (34,1g/L), el extracto crudo enzimático obtenido expresa cuatro veces mayor afinidad por la inulina (8,59 g/L).

Por lo tanto, en las experiencias de optimización se decidió trabajar a pH 5 regulado con tampón citrato-fosfato 0,05 M, a 55 °C y 10 minutos de reacción para la determinación de la actividad de inulinasa del extracto enzimático. Para la determinación del poder catalítico fructosidasa, utilizar como sustrato inulina de achicoria a 10 g/L y el extracto enzimático sin diluir. Para la determinación del poder catalítico invertasa utilizar como sustrato sacarosa a 20 g/L y el extracto enzimático diluido 1:5.

4.4 PLANEAMIENTO EXPERIMENTAL: SELECCIÓN DE VARIABLES SIGNIFICATIVAS UTILIZANDO UN DISEÑO DE Plackett & Burman.

En base a experimentos previos y referencias bibliográficas (Cruz-Guerrero et al. 1995; Kushi et al. 2000; Kalil et al. 2001; Wei et al. 1998; Cazetta et al. 2005; Xion et al. 2007 y Singh y Bhermi 2008) se estudiaron nueve factores o variables, más dos variables *dummy* a dos niveles diferentes, alto (+) y bajo (-) (Tabla 8), fueron analizados en 12 corridas para evaluar su efecto sobre la producción de inulinasa utilizando el diseño experimental de Plackett-Burman (Tabla 9). Los rendimientos de la fermentación de *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y-7571 expresados como actividad volumétrica de inulinasa del extracto

crudo, determinados para cada corrida experimental del diseño, se muestra en la tabla 9.

Tabla 8: Definición de variables y niveles utilizados en el Diseño Plackett - Burman en la fermentación de *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y-7571 para la producción de inulinasa en extracto crudo.

Código	Factor o Variable	Unidad	Tipo	Nivel Bajo (-)	Nivel Alto (+)
A	Fuente de Carbono	% (v/v)	Numérico	30	60
B	(NH ₄) ₂ SO ₄	g/L	Numérico	5	10
C	Extracto de levadura	g/L	Numérico	5	10
D	Fuente		Categórico	Esparrago	Yacon
E	MgSO ₄ .7H ₂ O	g/L	Numérico	0,5	0,7
F	Tamaño Inoculo	% (v/v)	Numérico	5	15
G	pH inicial		Numérico	4	8
H	Dummy1		Numerico	-1	1
J	Temperatura	°C	Numerico	25	45
K	Dummy2		Numerico	-1	1
L	Velocidad de Agitacion	RPM	Numerico	150	250

Tabla 9: El diseño experimental utilizando el método de Plackett-Burman para la selección de variables y actividades volumétricas de la inulinasa en el extracto crudo

St d	Ru n	A Fuente de Carbono % (v/v)		B Fuente de Nitrógeno (g/L)		C Factor de Crecimient o (g/L)		D Fuente		F Ion metálico (g/L)		G Tamaño Inoculo % (v/v)		H pH inicial		I Dummy 1	J Temperatura (°C)		K Dummy 2	L Velocidad de Agitación (RPM)		Respuesta Actividad volumétrica (U/mL)
		rang	Real	rang	Real	rang	Real	rang	Real	rang	Real	rang	Real	rang	Real		rang	Real		rang	Real	
3	1	+	60	-	5	+	10	+	Yacon	-	0,5	+	15	+	8	+	-	25	-	-	150	9,3
7	2	+	60	-	5	-	5	-	Esparrago	+	0,7	-	5	+	8	+	-	25	+	+	250	1,82
6	3	-	30	-	5	-	5	+	Yacon	-	0,5	+	15	+	8	-	+	45	+	+	250	0,51
9	4	+	60	+	10	+	10	-	Esparrago	-	0,5	-	5	+	8	-	+	45	+	-	150	0,95
11	5	+	60	-	5	+	10	+	Yacon	+	0,7	-	5	-	4	-	+	45	-	+	250	1,89
1	6	+	60	+	10	-	5	+	Yacon	+	0,7	+	15	-	4	-	-	25	+	-	150	10,46
2	7	-	30	+	10	+	10	-	Esparrago	+	0,7	+	15	+	8	-	-	25	-	+	250	0,33
5	8	-	30	-	5	+	10	-	Esparrago	+	0,7	+	15	-	4	+	+	45	+	-	150	0,79
4	9	-	30	+	10	-	5	+	Yacon	+	0,7	-	5	+	8	+	+	45	-	-	150	0,2
8	10	+	60	+	10	-	5	-	Esparrago	-	0,5	+	15	-	4	+	+	45	-	+	250	1,33
12	11	-	30	-	5	-	5	-	Esparrago	-	0,5	-	5	-	4	-	-	25	-	-	150	88,16
10	12	-	30	+	10	+	10	+	Yacon	-	0,5	-	5	-	4	+	-	25	+	+	250	46,84

De la tabla 9 se puede observar que el mayor valor de actividad (88,16 U/mL) se obtuvo con el caldo enzimático de la fermentación del extracto de espárragos y los demás factores todos en sus niveles bajos, correspondiente al experimento 11. Le sigue en valor de actividad (46,84 U/mL) el caldo enzimático de la fermentación del extracto de yacón, con tres factores en estudio en sus niveles altos: la fuente de nitrógeno, el factor de crecimiento y la velocidad de agitación y corresponde al experimento 12.

Se calculó el análisis de varianza (ANOVA) para el diseño experimental de Plackett-Burman y los niveles significativos para cada variable se determinaron por la prueba F, a un nivel de probabilidad o confianza del 95% significativamente estadístico (Tabla 10). Los resultados muestran que no hay términos significativos del modelo al nivel de confianza estudiado, dado que los p-valores fueron mayores que 0,05.

Tabla 10: Analisis de varianza de todas las variables según el diseño experimental de Plackett-Burman

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	G.L.	Media de Cuadrados	Valor F	p-valores Prob (> F) ^a
Modelo	7690,564933	9	854,507215	6,11653687	0.1484
A-Fuente de Carbono	1028,230533	1	1028,23053	7,36004314	0.1132
B-Fuente de Nitrogeno	149,5308	1	149,5308	1,07033696	0.4096
C-Factores de Crecimiento	149,6720333	1	149,672033	1,0713479	0.4094
D-Fuente	48,7227	1	48,7227	0,34875562	0.6147
E-Iones metalicos	1443,213333	1	1443,21333	10,3304775	0.0847
F-Tamaño Inoculo	1143,481633	1	1143,48163	8,18500704	0.1035
G-pH inicial	1549,504133	1	1549,50413	11,0913038	0.0796
J-Temperatura	1906,128133	1	1906,12813	13,6440077	0.0661
L-Velocidad de Agitación	272,0816333	1	272,081633	1,94755212	0.2976
Residual	279,4088333	2	139,704417		
Cor Total	7969,973767	11			

G.L.: Grados de Libertad

p-Valores = Probabilidad p (>F)

R²=0,9649 y R²_{Adjustado}=0,905

^a **Significativo para p-Valores <= 0,05**

Por el manejo de la herramienta de factores del *software Design Expert* se obtuvo la tabla 11 que indica el % de contribución o influencia de las 11 variables en estudio a la variable respuesta.

Tabla 11. Porcentaje de contribución de todas las variables a la variable respuesta

	Term	Stdized Effects	Sum of Squares	% Contribution
	Intercept			
M	A-Fuente de Carbono	-18.51	1028.23	12.90
M	B-Fuente de Nitrogeno	-7.06	149.53	1.88
M	C-Factores de Crecimiento	-7.06	149.67	1.88
M	D-Fuente	-4.03	48.72	0.61
M	E-Iones metalicos	-21.93	1443.21	18.11
M	F-Tamaño Inoculo	-19.52	1143.48	14.35
M	G-pH inicial	-22.73	1549.50	19.44
e	H-Dummy1	-7.00	147.14	1.85
M	J-Temperatura	-25.21	1906.13	23.92
e	K-Dummy2	-6.64	132.27	1.66
M	L-Velocidad de Agitacion	-9.52	272.08	3.41

Del analisis anterior, se procedio a eliminar aquellas variables cuyo p-Valores estan mas alejadas de 0,05 y cuya contribucion es menor a la variable respuesta. Descartándose las variables: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, extracto de levadura, fuente categórico y velocidad de agitación. El análisis de varianza con las otras cinco variables resultaron todas significativas (Tabla 12).

Tabla 12: Analisis de varianza de cinco variables preseleccionadas según el diseño experimental de Plackett-Burman

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	G.L.	Media de Cuadrados	Valor F	p-valores Prob (> F) ^a
Model	7070,557767	5	1414,11155	9,43353167	0.0083
A-Fuente de Carbono	1028,230533	1	1028,23053	6,85932116	0.0396
E-Iones metalicos	1443,213333	1	1443,21333	9,62766951	0.0210
F-Tamaño Inoculo	1143,481633	1	1143,48163	7,62816072	0.0328
G-pH inicial	1549,504133	1	1549,50413	10,3367349	0.0182
J-Temperatura	1906,128133	1	1906,12813	12,715772	0.0118
Residual	899,416	6	149,902667		
Cor Total	7969,973767	11			

G.L.: Grados de Libertad

p-Valores = Probabilidad p (>F)

R²=0,8871 y R²_{Adjustado}=0,7931

^a Significativo para p-Valores <= 0,05

A partir de los datos de la tabla 12 se obtuvo el polinomio de primer grado con las variables significativas en la forma:

Ecuación final en términos de los factores codificados:

$$\text{Actividad Volumetrica} = +13,55 - 9,26 * A - 10,97 * E - 9,76 * F - 11,36 * G - 12,60 * J$$

Ecuación final en términos de los factores actuales o reales:

$$\text{Actividad Volumétrica} = +204,84333 - 0,61711 * \text{Fuente de Carbono} - 109,66667 * \text{Iones metalicos} - 1,95233 * \text{Tamaño Inoculo} - 5,68167 * \text{pH inicial} - 1,26033 * \text{Temperatura}$$

También por el manejo de la herramienta de factores del *software Design Expert* se hicieron los recalculos por la técnica del ensayo y el error, apreciándose numérica y gráficamente las variaciones de los valores de actividad enzimática en función de la variación de los factores, determinándose los mejores niveles de los factores significativos. Según la ecuación polinómica lineal el valor más alto de

actividad enzimática se obtendría utilizando los niveles inferiores de los factores, resultando un valor teórico de actividad enzimática de 67,5 U/mL.

Sin embargo, considerando que para una fermentación industrial es mejor mantener la temperatura de 30°C que de 25°C por razones de menor costo de agua de enfriamiento y manteniendo el pH igual a 4,0 que por simulación resulta mayores valores de actividad así como por trabajos previos y la referencia bibliográfica (Cazetta et al. 2005), se seleccionaron los tres factores con sus correspondientes niveles para el tratamiento y análisis óptimo según el diseño compuesto central rotatorio (DCCR) y fueron los siguientes:

Extracto de yacón 20 – 30% (v/v); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,3 – 0,5 g/L y tamaño de inóculo 3 – 7% (v/v).

Consecuentemente, se fijó la velocidad de agitación en 150 rpm y se descartó trabajar con el extracto de espárrago por problemas que aún faltan resolver de caramelización que ocurre durante su preparación, que resulta en un medio color café intenso y por la necesidad de mayor caracterización química.

4.5 MAYOR OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES SIGNIFICATIVAS UTILIZANDO EL DCCR Y LA RSM

Seleccionadas y definidas las tres variables significativas mediante la aplicación del diseño de Plackett-Burman, los experimentos para la optimización se continuaron también por cultivo por lotes en matraces de *K. marxianus*, según el diseño factorial completo (Diseño Central Compuesto Rotacional – DCCR) y el análisis o metodología de superficie de respuesta (RSM). Las tres variables independientes fueron estudiadas en cinco niveles y codificadas como se muestra en la tabla 13.

Tabla 13: Valores de variables independientes a diferentes niveles del diseño experimental DCCR.

Variable independiente	Símbolo	Niveles codificados				
		-1.68	-1	0	1	1.68
Extracto de yacon (% v/v)	X_1	20	22,02	25	27,97	30
MgSO ₄ .7H ₂ O (g/l)	X_2	0.3	0,3405	0,4	0,4595	0,5
Tamaño de inóculo (% v/v)	X_3	3	3,8108	5	6,189	7

La tabla 14 presenta la manera en que los experimentos fueron conducidos según el planeamiento DCCR de 17 corridas (8 ensayos factoriales, 8 axiales y 3 puntos centrales).

Tabla 14: Matriz del Diseño Compuesto Central Rotacional para las variables independientes en su forma codificada y natural.

Corrida experimental	X_1 (% v/v)	X_2 (g/L)	X_3 (% v/v)
1	0 (25)	+ α (0,3)	0 (5)
2	1 (22,03)	+1 (0,46)	+1 (6,19)
3	0 (25)	0 (0,4)	0 (5)
4	+ α (20)	0 (0,4)	0 (5)
5	0 (25)	0 (0,4)	0 (5)
6	0 (25)	0 (0,4)	0 (5)
7	+1 (27,97)	-1 (0,34)	+1 (6,19)
8	0 (25)	0 (0,4)	- α (7)
9	- α (30)	0 (0,4)	0 (5)
10	-1 (22,03)	-1 (0,34)	-1 (3,81)
11	0 (25)	- α (0,5)	0 (5)
12	-1 (27,97)	+1 (0,46)	-1 (3,81)
13	1 (22,03)	+1 (0,46)	-1 (3,81)
14	0 (25)	0 (0,4)	+ α (3)
15	-1 (22,03)	-1 (0,34)	+1 (6,19)
16	+1 (27,97)	-1 (0,34)	-1 (3,81)
17	-1 (27,97)	+1 (0,46)	+1 (6,19)

X_1 : Fuente de Carbono ; X_2 : Sulfato de magnesio; X_3 : Tamaño de Inóculo

Los resultados del diseño experimental se muestran en la tabla 15 tanto para las respuestas actividad volumétrica inulinasa como de invertasa del extracto crudo enzimático de la fermentación de *K. marxianus*. Como se puede apreciar el valor más alto para la actividad volumétrica inulinasa o fructosidasa fue de 2,48 U/mL para las corridas experimentales 7 y 14, mientras que el valor más alto de la actividad de invertasa fue de 94,04 U/mL para la experiencia 9, bajo las correspondientes condiciones experimentales del diseño.

Tabla 15: Diseño experimental de las tres variables y las respuestas observadas

Corrida experimental	Actividad Volumétrica inulinasa (U/mL)	Actividad Volumétrica invertasa (U/mL)
1	1,94	72,42
2	1,06	73,72
3	1,96	78,83
4	1,27	56,08
5	2,2	81,14
6	2,19	81,92
7	2,48	91,61
8	2,24	86,84
9	1,83	94,04
10	1,42	61,22
11	1,31	79,52
12	1,71	66,34
13	1,39	64,78
14	2,48	74,51
15	1,95	61,89
16	1,87	88,10
17	1,42	83,03

Efectos de los factores en la respuesta actividad volumétrica inulinasa actuando sobre inulina o capacidad catalítica fructosidasa.

La carta de Pareto para cada respuesta con todos los efectos posibles estandarizados se ilustra en la figura 22 a un nivel de confianza de 0,05. En el diagrama se puede observar que el sulfato de magnesio (efecto lineal) tuvo la influencia más alta, seguidos por el extracto de yacón (efecto cuadrático), sulfato de magnesio (efecto cuadrático), extracto de yacón y finalmente la interacción entre el sulfato de magnesio y el tamaño de inóculo respectivamente, tuvieron un efecto significativo.

También se pudo notar en la figura 22, que el tamaño de inóculo no tuvo ningún efecto significativo sobre la actividad volumétrica en los niveles estudiados. Así mismo la interacción entre el sulfato de magnesio y el extracto de yacón no ejerció un efecto significativo.

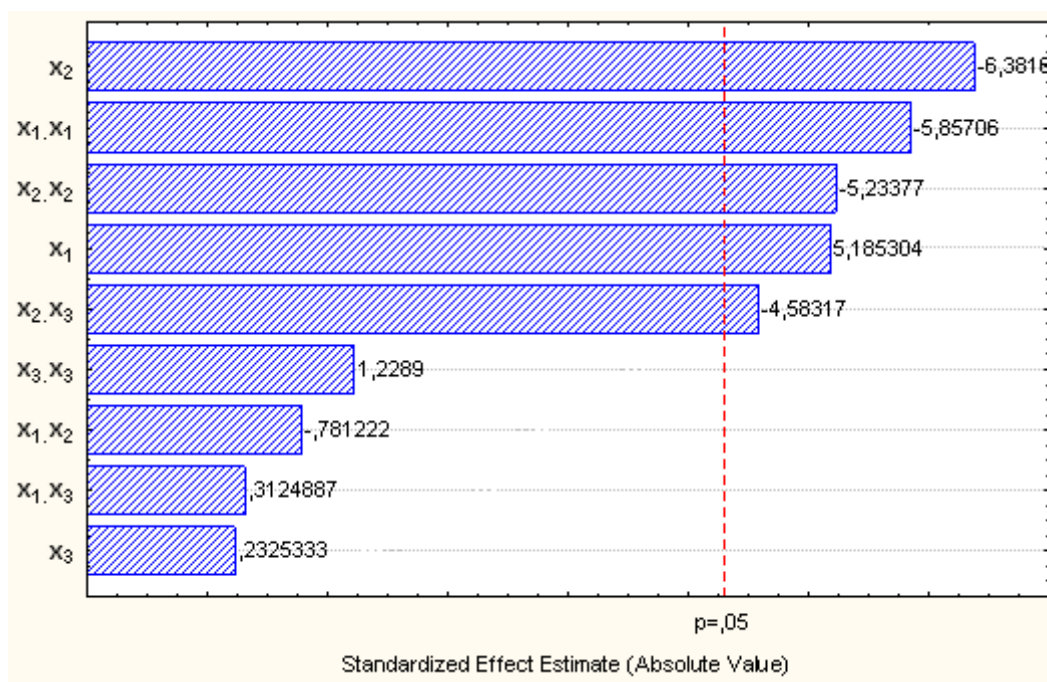


Figura 22: Grafico de Pareto de los valores de los efectos estandarizados para la actividad volumétrica de inulinasa (U/mL) respecto a inulina, a las 30 horas de fermentación de *K. marxianus*. Las variables independientes (codificadas) fueron Extracto de yacón (x_1), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (x_2) y tamaño de inóculo (x_3).

Los resultados del análisis de la carta de Pareto se confirmaron mediante el análisis de varianza (ANOVA), la cual se presenta en la tabla 16. El modelo de regresión de segundo orden que se ajustó a los datos experimentales fue el siguiente:

Ecuación en términos de los factores codificados:

$$Y = 2,13 + 0,19x_1 - 0,23x_2 + 8,540 \cdot 10^{-3}x_3 - 0,037x_1x_2 + 0,015x_1x_3 - 0,22x_2x_3 - 0,24x_1^2 - 0,21x_2^2 + 0,050x_3^2$$

Ecuación en términos de los factores actuales o reales:

$$Y = -31,0730 + 1,4657 X_1 - 0,0268 X_1^2 + 64,4395 X_2 - 59,6182 X_2^2 + 0,7827 X_3 + 0,0351 X_3^2 - 0,2104 X_1 X_2 + 0,0042 X_1 X_3 - 3,0812 X_2 X_3$$

Eliminando solo las interacciones $x_1 \cdot x_2$ y $x_1 \cdot x_3$ pero, manteniendo las variables x_3 y x_3^2 , por ser esta una variable o factor principal y por que descartarlo hace que en la solución de la ecuación diferencial parcial se obtenga un valor de x_2 igual cero.

Tabla 16: Analisis de Varianza (ANOVA) para el modelo de segundo orden de la respuesta actividad volumetrica de inulinasa respectoa a inulina.

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	G.L.	Media de Cuadrados	Valor F	p-valores Prob (> F) ^a
x_1	0,495624	1	0,495624	26,88738	0,035238
$x_1 \cdot x_1$	0,632359	1	0,632359	34,30517	0,027934
x_2	0,750696	1	0,750696	40,72491	0,023686
$x_2 \cdot x_2$	0,504932	1	0,504932	27,39231	0,034622
x_3	0,000997	1	0,000997	0,05407	0,837753
$x_3 \cdot x_3$	0,027838	1	0,027838	1,51020	0,344080
$x_1 \cdot x_2$	0,011250	1	0,011250	0,61031	0,516464
$x_1 \cdot x_3$	0,001800	1	0,001800	0,09765	0,784242
$x_2 \cdot x_3$	0,387200	1	0,387200	21,00542	0,044456
Error total	0,208909	7	0,029844		
Falta de ajuste	0,172043	5	0,034409	1,86665	0,384546
Error puro	0,036867	2	0,018433		
Suma total de cuadrados	3,036753	16			

G.L.: Grados de Libertad

p-Valores = Probabilidad p (>F)

$R^2 = 0,93121$ y $R^2_{\text{Ajustado}} = 0,84276$

$F_{\text{valor}} > F_{0,05(5,7)\text{tabular}} = 3,972$

^a Significativo para p-Valores $\leq 0,05$

Nuevamente, los resultados del análisis de la carta de Pareto (Figura 23) son confirmados por los del análisis de varianza (ANOVA) para el modelo reducido de segundo orden, presentados en la tabla 17, indicándose que el efecto lineal y cuadrático tanto del extracto de yacón y del sulfato de magnesio y el efecto interactivo del sulfato de magnesio con el tamaño de inóculo hicieron significativo la respuesta actividad volumétrica de inulinasa.

La falta de ajuste del modelo cuadrático no fue significativo ($p = 0,470452$). La no significancia de la falta de ajuste es una buena indicación que el modelo se ajusta

a la relación real de los parámetros ambientales de fermentación en estudio dentro de los niveles seleccionados.

La bondad del ajuste del modelo reducido fue verificada por el coeficiente de determinación R^2 , el que fue de 0,9261 para la actividad volumétrica inulinasa. Aproximadamente el 92,61% de la variabilidad de la respuesta observada puede ser explicado por el modelo ajustado en la forma codificada. Adicionalmente el coeficiente de determinación ajustado ($\text{adj}R^2$) fue 0,870, valor cercano a 0,926 que asegura el ajuste satisfactorio del modelo polinomial a los datos experimentales:

Ecuación final en términos de los factores codificados:

$$Y = +2,13 + 0,19x_1 - 0,23x_2 + 8,540 \cdot 10^{-3}x_3 - 0,22x_2x_3 - 0,24x_1^2 - 0,21x_2^2 + 0,050x_3^2$$

Ecuación final en términos de los factores actuales o reales:

$$Y = -29,4991 + 1,4028X_1 - 0,0268X_1^2 + 59,1786X_2 - 59,6182X_2^2 + 0,888X_3 + 0,0351X_3^2 - 3,0812X_2 \cdot X_3$$

Finalmente por el análisis de la desviación media absoluta (AAD) entre las respuestas experimentales y las respuestas predichas por el modelo (Bas y Boyaci 2007), resultó un valor aceptable de 10,54% y que junto con el R^2 definen mejor el comportamiento del sistema, al comprobarse la seguridad del modelo.

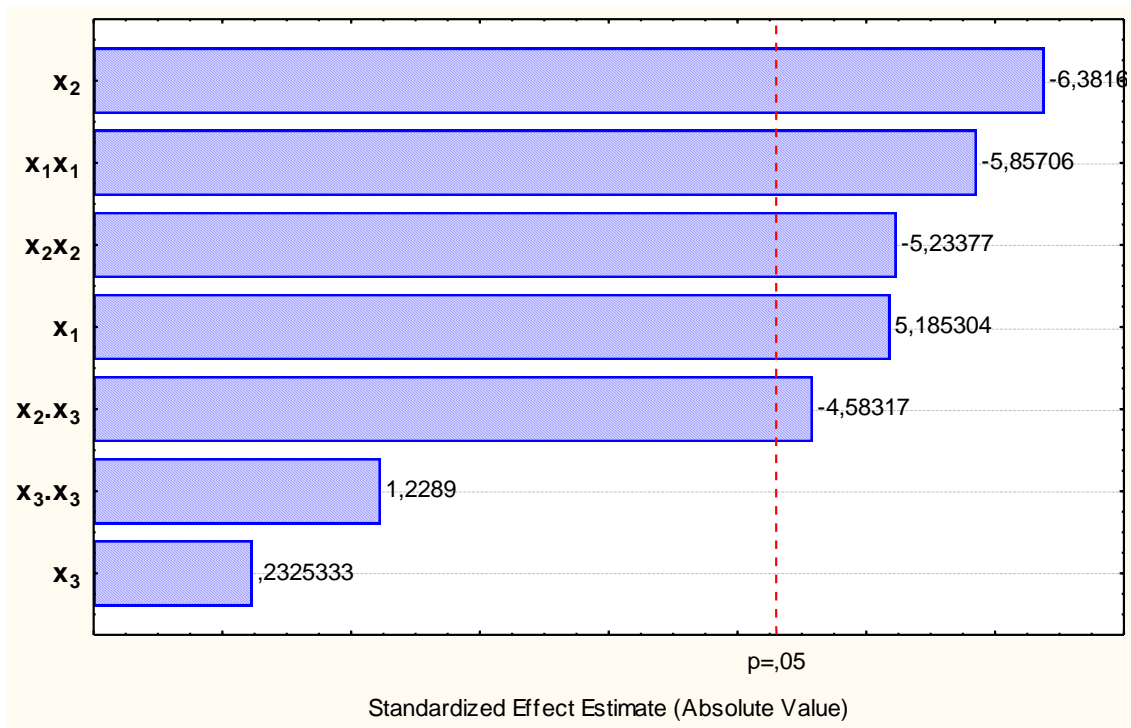


Figura 23: Grafico de Pareto de los valores de los efectos estandarizados del modelo reducido para la actividad volumétrica de Inulinasa (U/mL) respecto a inulina, a las 30 horas de fermentación de *K. marxianus*. Las variables independientes (codificadas) fueron Extracto de yacon (x_1), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (x_2) y tamaño de inóculo (x_3).

Tabla 17: Analisis de Varianza (ANVOA) para el modelo reducido de segundo orden de la respuesta actividad volumetrica de inulinasa respecto a inulina.

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	G.L.	Media de Cuadrados	Valor F	p-valores Prob (> F) ^a
x_1	0,495624	1	0,495624	26,88738	0,035238
$x_1 \cdot x_1$	0,632359	1	0,632359	34,30517	0,027934
x_2	0,750696	1	0,750696	40,72491	0,023686
$x_2 \cdot x_2$	0,504932	1	0,504932	27,39231	0,034622
x_3	0,000997	1	0,000997	0,05407	0,837753
$x_3 \cdot x_3$	0,027838	1	0,027838	1,51020	0,344080
$x_2 \cdot x_3$	0,387200	1	0,387200	21,00542	0,044456
Error total	0,221959	9	0,024662		
Falta de ajuste	0,185093	7	0,026442	1,43446	0,470452
Error puro	0,036867	2	0,018433		
Suma total de cuadrados	3,036753	16			

G.L.: Grados de Libertad

p-Valores = Probabilidad p (>F)

$R^2=0,92691$ y $R^2_{\text{Ajustado}}=0,87006$

Fvalor > $F_{0,05(7,9)\text{tabular}} = 3,293$

^a **Significativo para p-Valores $\leq 0,05$**

La tabla 18 muestra la significancia de cada coeficiente codificado (factor real), los que fueron determinados por la prueba t de Student y los valores-p. Valores-p de pequeña magnitud se asocian con valores t altos, los que implican que los coeficientes de regresión sean muchos más altos que el error estándar (Vega y Zúñiga 2011).

Tabla 18: Coeficientes de regresión y significancia del modelo de regresión de segundo orden, de la actividad volumétrica de inulinasa respecto a inulina.

Factor	Efecto	Coeficientes de regresión	Error estándar	t(2)	p-Valor	95,% I.C. inferior	95,% I.C. superior
Media / Intercepto	2,128182	-29,4991	4,29299	-6,87147	0,020529	-47,970	-11,0279
X_1	0,380845	1,4028	0,22889	6,12862	0,025606	0,418	2,3876
$X_1.X_1$	-0,472328	-0,0268	0,00457	-5,85706	0,027934	-0,046	-0,0071
X_2	-0,470656	59,1786	9,73249	6,08052	0,025997	17,303	101,0541
$X_2.X_2$	-0,429251	-59,6182	11,39107	-5,23377	0,034622	-108,630	-10,6064
X_3	0,017091	0,8888	0,39345	2,25890	0,152407	-0,804	2,5817
$X_3.X_3$	0,099383	0,0351	0,02855	1,22890	0,344080	-0,088	0,1579
$X_2.X_3$	-0,440000	-3,0812	0,67229	-4,58317	0,044456	-5,974	-0,1886

Significancia para p -valor $\leq 0,05$

I.C.: Intervalo de confiabilidad

La tabla 19 presenta los valores reales de los factores o variables independientes que dan el valor más alto de la respuesta actividad volumétrica de inulinasa. Puesto que estos valores están en el rango de los niveles estudiados, el punto estacionario del modelo cuadrático ajustado, constituye un máximo de la respuesta el cual corresponde a un valor de actividad de 2,19 U/mL.

Tabla 19: Valores óptimos determinados a partir del modelo matemático experimental, actividad inulinasa, ajustado para las experiencias de validación

Factor	Valor Mínimo Observado	Valor Optimo	Valor Máximo Observado
x_1 (% v/v)	20,00000	26,19738	30,00000
x_2 (g/l)	0,30000	0,38583	0,50000
x_3 (% v/v)	3,00000	4,27549	7,00000
Valor Optimo pronosticado para Actividad Volumétrica Inulinasa (U/ml)			2,1917

X_1 : Extracto de yacon ; X_2 : Sulfato de magnesio; X_3 : Tamaño de inoculo

La visualización de la ecuación del modelo predictivo puede obtenerse por el plano de superficie de respuesta y por el plano de contorno. El plano de superficie de respuesta es un plano teórico tridimensional que muestra la relación entre la respuesta y las variables independientes. La proyección o pantalla de dos

dimensiones del plano de superficie se llama plano de contorno, las líneas de respuesta constante son trazadas en el plano de las variables independientes. Los planos de contorno ayudan a visualizar la forma de una superficie de respuesta.

Estos planos dan información útil acerca del ajuste o arreglo del modelo pero éstos no pueden representar el verdadero comportamiento del sistema (Bas y Bayaci 2007).

Las respuestas para el modelo de regresión ajustado se presentaron gráficamente en las figuras 24, 25 y 26. Los planos de superficie de respuesta y de contorno se generaron por la combinación de pares de los tres factores en estudio, mientras se mantenía el otro en sus niveles óptimos para la producción de inulina expresada como actividad volumétrica.

La figura 24 ilustra el efecto tanto del extracto de yacón como del sulfato de magnesio sobre la producción de inulina por fermentación de *K. marxianus* expresada en actividad volumétrica, con un tamaño de inóculo de 4,28%v/v, mostrando una superficie con un punto estacionario máximo y plano de contorno que representa la interacción entre los dos factores, con líneas de contorno circulares, que confirma el punto de máxima respuesta de 2 U/mL.

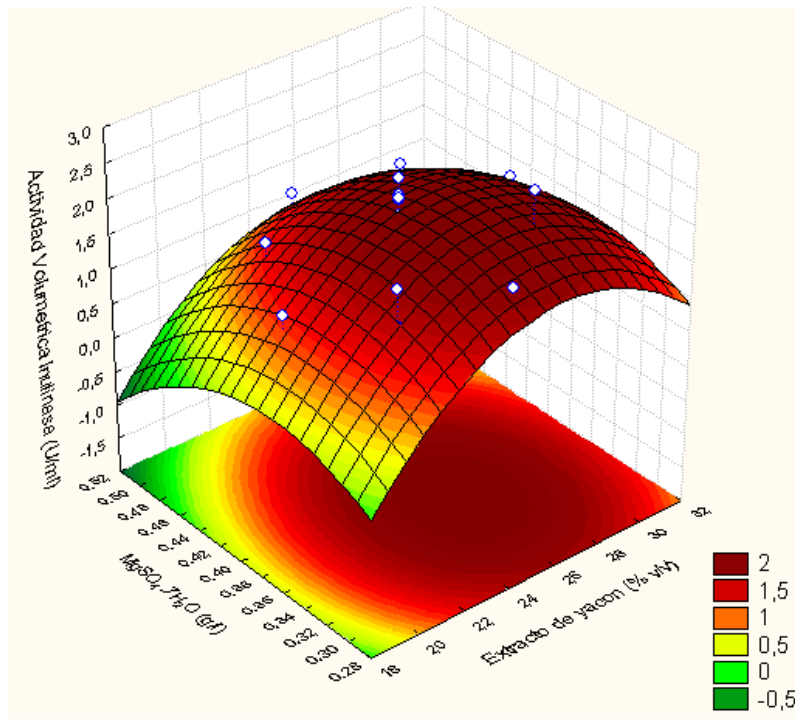


Figura 24: Planos de superficie de respuesta y de contorno a 30 h de fermentación de *K.marxianus* para la actividad volumétrica de inulinasa como función del extracto de yacón y del $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, tamaño de inóculo 4,28 %v/v.

La figura 25 ilustra el efecto tanto del extracto de yacón como del tamaño de inóculo sobre la producción de inulinasa por fermentación de *K. marxianus* expresada en actividad volumétrica, con una concentración de sulfato de magnesio de 0,386 g/L, mostrando una superficie de silla de montar sin punto máximo ni mínimo y un plano de contorno que representa la interacción entre los dos factores, con líneas de contorno hiperbólicas, que confirma el punto estacionario tipo silla de montar. La figura muestra que manteniendo constante la concentración del extracto en 26 %v/v y aumentado o disminuyendo el tamaño del inóculo dentro de su rango de niveles máximo y mínimo, la producción de inulinasa por fermentación de *K. marxianus* se mantendrá en un nivel de actividad de 2,4 U/mL, confirmándose que según el modelo de regresión ajustado el efecto del tamaño del inóculo no es significativo.

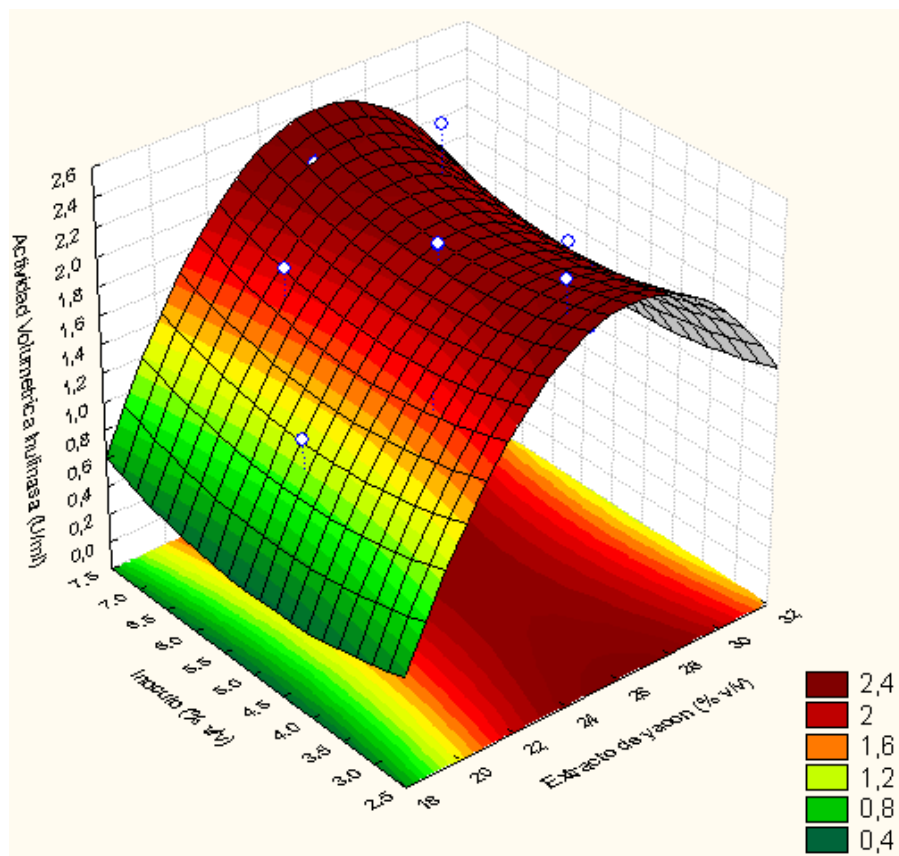


Figura 25: Planos de superficie de respuesta y de contorno a 30 h de fermentación de *K.marxianus* para la actividad volumétrica de inulinasa como función del extracto de yacón y del tamaño de inoculo, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,386 g/L.

La figura 26 ilustra el efecto tanto del sulfato de magnesio como del tamaño de inoculo sobre la producción de inulinasa por fermentación de *K. marxianus* expresada en actividad volumétrica, con una concentración de extracto de yacón de 26,197 %v/v, mostrando una superficie con un punto máximo y un plano de contorno que representa la interacción entre los dos factores, con líneas de contorno elípticas, que confirma el punto estacionario máximo. La figura muestra que manteniendo constante la concentración de sulfato de magnesio de 0,34 g/L y aumentado el tamaño del inóculo a 7% v/v, la producción de inulinasa por fermentación de *K. marxianus* alcanzaría un nivel de actividad aproximado de 2,8 U/mL, confirmándose que según el modelo de regresión ajustado existe el efecto interactivo significativo entre los dos factores.

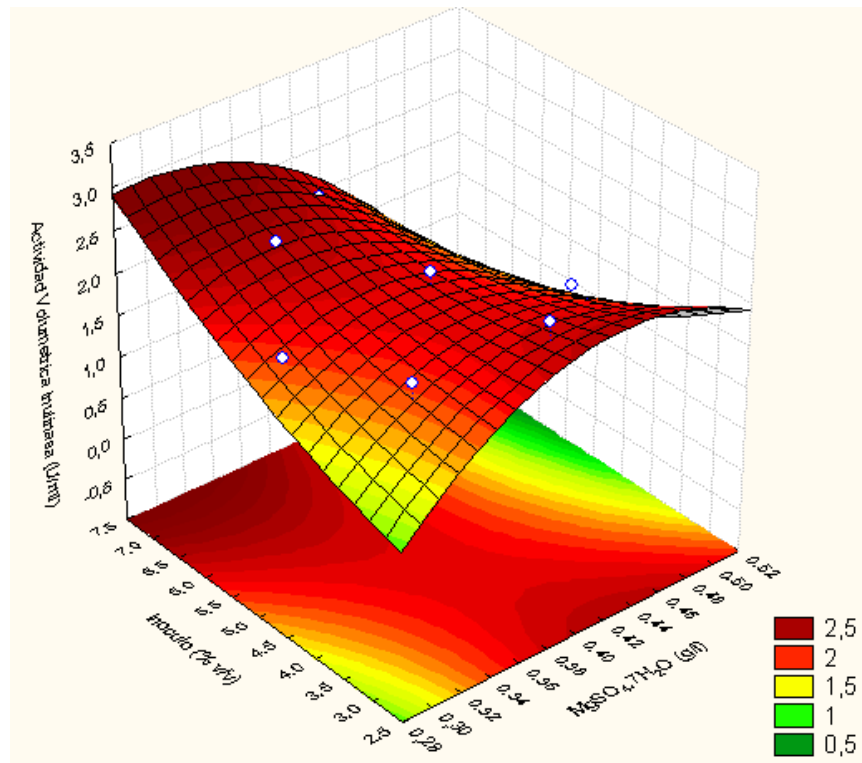


Figura 26: Planos de superficie de respuesta y de contorno a 30 h de fermentación de *K.marxianus* para la actividad volumétrica de inulinasa como función del $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y del tamaño de inóculo, extracto de yacón 26,197 %v/v.

Efectos de los factores en la respuesta actividad volumétrica inulinasa actuando sobre sacarosa o capacidad catalítica invertasa.

La gráfica de Pareto para cada respuesta con todos los efectos posibles estandarizados se ilustra en la figura 27 a un nivel de confianza de 0,05. Se observó que el extracto de yacón (efecto lineal) tuvo la más alta influencia, seguidos por la interacción entre el sulfato de magnesio y el extracto de yacón, tamaño de inóculo (efecto lineal), extracto de yacón (efecto cuadrático), sulfato de magnesio (efecto cuadrático), y finalmente la interacción entre el sulfato de magnesio y tamaño de inóculo.

También se puede notar en la figura 27, que el efecto lineal del sulfato de magnesio, el efecto cuadrático del tamaño de inóculo sobre la actividad

volumétrica no fue significativo en los niveles de estudiados, así como la interacción entre el extracto de yacon y el tamaño de inóculo.

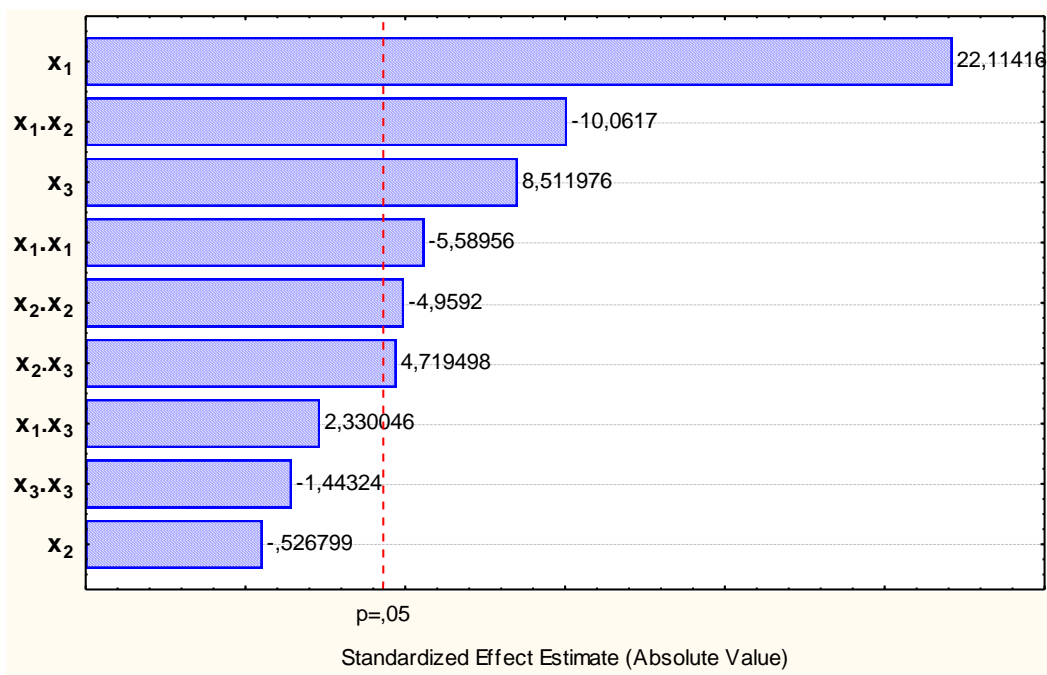


Figura 27: Grafico de Pareto de los valores de los efectos estandarizados para la actividad volumétrica de inulinasa (U/mL) respecto a **sacarosa**, a las 30 horas de fermentación de *K. marxianus*. Las variables independientes (codificadas) fueron Extracto de yacon (x_1), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (x_2) y tamaño de inóculo (x_3).

Los resultados del análisis de la gráfica de Pareto son confirmados por los del análisis de varianza (ANOVA) el cual se presenta en la tabla 20, obteniéndose el modelo de regresión de segundo orden:

Ecuación en términos de los factores codificados:

$$Y = +80,85 + 9,62X_1 - 0,23X_2 + 3,70X_3 - 5,67X_1X_2 + 1,32X_1X_3 + 2,66X_2X_3 - 2,67X_1^2 - 2,36X_2^2 - 0,69X_3^2$$

Ecuación en términos de los factores actuales o reales:

$$Y = -521,099 + 29,315 X_1 - 0,302 X_1^2 + 1145,221 X_2 - 668,591 X_2^2 - 16,396 X_3 - 0,488 X_3^2 - 32,078 X_1 X_2 + 0,375 X_1 X_3 + 37,553 X_2 X_3$$

Eliminando solo la interacción $x_1 \cdot x_3$ pero, manteniendo las variables x_3^2 y x_2 , por ser esta una variable o factor principal y por que descartarlo hace que en la solución de la ecuación diferencial parcial se obtenga un valor de x_2 igual cero.

Tabla 20: Analisis de Varianza (ANOVA) para el modelo de segundo orden de la respuesta actividad volumetrica de inulinasa respectoa a **sacarosa**.

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	G.L.	Media de Cuadrados	Valor F	p-valores Prob (> F) ^a
x_1	1262,740	1	1262,740	489,0361	0,002039
$x_1 \cdot x_1$	80,673	1	80,673	31,2432	0,030548
x_2	0,717	1	0,717	0,2775	0,650929
$x_2 \cdot x_2$	63,503	1	63,503	24,5936	0,038338
x_3	187,083	1	187,083	72,4537	0,013523
$x_3 \cdot x_3$	5,378	1	5,378	2,0829	0,285747
$x_1 \cdot x_2$	261,404	1	261,404	101,2370	0,009734
$x_1 \cdot x_3$	14,019	1	14,019	5,4291	0,145138
$x_2 \cdot x_3$	57,513	1	57,513	22,2737	0,042082
Error total	119,096	7	17,014		
Falta de ajuste	113,932	5	22,786	8,8248	0,104904
Error puro	5,164	2	2,582		
Suma total de cuadrados	2017,165	16			

G.L.: Grados de Libertad

p-Valores = Probabilidad p (>F)

$R^2=0,94096$ y $R^2_{\text{Ajustado}}=0,86505$

$F_{\text{valor}} > F_{0,05(5,7)\text{tabular}} = 3,972$

^a Significativo para p-Valores $\leq 0,05$

Para el modelo reducido de segundo orden, los resultados del análisis de la carta de Pareto (Figura 28) son confirmados por los del análisis de varianza (ANOVA) , presentados en la tabla 21, precisándose que el efecto lineal y cuadrático del extracto de yacón, el efecto cuadrático del sulfato de magnesio, los efectos interactivos del extracto de yacón con el sulfato de magnesio y del sulfato de magnesio con el tamaño de inoculo y el efecto lineal del tamaño de inoculo,

hicieron significativo la respuesta actividad volumétrica de inulinasa sobre sacarosa.

La falta de ajuste del modelo cuadrático no fue significativo ($p= 0,1119$). La no significancia de la falta de ajuste es una buena indicación que el modelo se ajusta a la relación real de los parámetros ambientales de fermentación en estudio dentro de los niveles seleccionados.

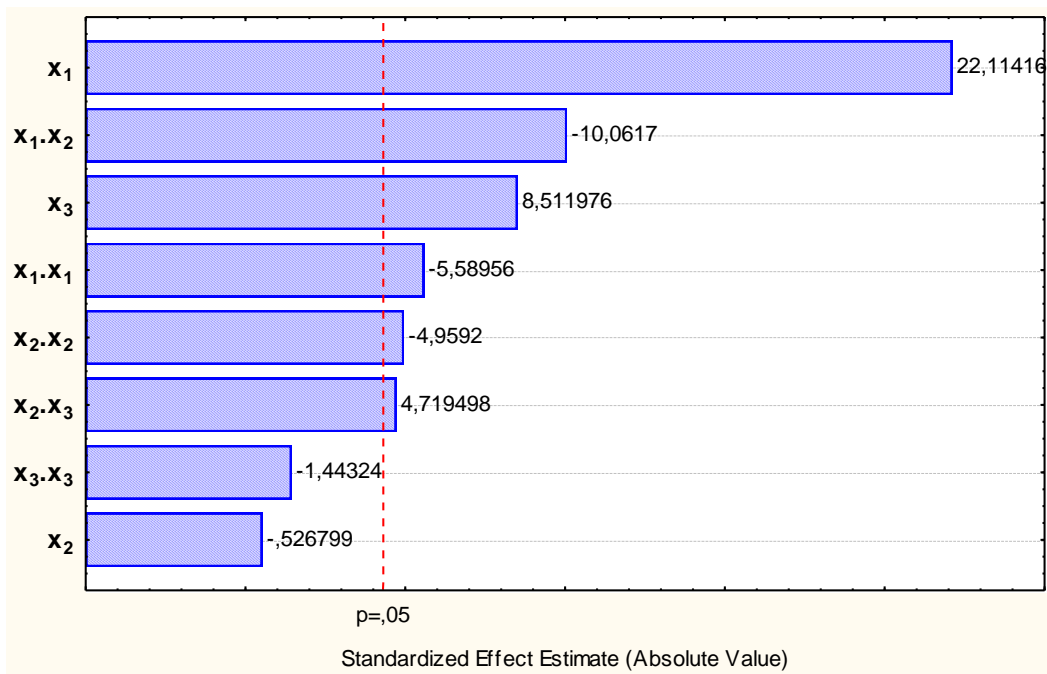


Figura 28: Grafico de Pareto de los valores de los efectos estandarizados del modelo reducido para la actividad volumétrica de Inulinasa (U/mL) respecto a **sacarosa**, a las 30 horas de fermentación de *K. marxianus*. Las variables independientes (codificadas) fueron Extracto de yacon (x_1), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (x_2) y tamaño de inóculo (x_3).

La bondad del ajuste del modelo reducido fue verificada por el coeficiente de determinación R^2 , el que fue de 0,9340 para la actividad volumétrica inulinasa. Aproximadamente el 93,40% de la variabilidad de la respuesta observada puede ser explicado por el modelo ajustado en la forma codificada. Adicionalmente el coeficiente de determinación ajustado ($adjR^2$) fue 0,8680, valor cercano a 0,9340

que asegura el ajuste satisfactorio del modelo polinomial a los datos experimentales:

Ecuación final en términos de los factores codificados:

$$Y = +80,85 +9,62x_1 -0,23x_2 +3,70x_3 -5,67x_1x_2 +2,66x_2x_3 -2,67x_1^2 -2,36x_2^2 -0,69x_3^2$$

Ecuación final en términos de los factores actuales o reales:

$$Y = -567,917 +31,187X_1 -0,302X_1^2 +1145,221X_2 -668,591X_2^2 -7,032X_3 -0,488X_2X_3 -32,078X_1X_2 + 37.553X_2X_3.$$

El análisis de la AAD arrojo un valor aceptable del 15,93% que en conjunto con el R^2 confirman que el modelo es adecuado para describir el diseño experimental.

Tabla 21: Analisis de Varianza (ANOVA) para el modelo reducido de segundo orden de la respuesta actividad volumetrica de inulinasa respecto a **sacarosa**.

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	G.L.	Media de Cuadrados	Valor F	p-valores Prob (> F) ^a
x_1	1262,740	1	1262,740	489,0361	0,002039
$x_1 \cdot x_1$	80,673	1	80,673	31,2432	0,030548
x_2	0,717	1	0,717	0,2775	0,650929
$x_2 \cdot x_2$	63,503	1	63,503	24,5936	0,038338
x_3	187,083	1	187,083	72,4537	0,013523
$x_3 \cdot x_3$	5,378	1	5,378	2,0829	0,285747
$x_1 \cdot x_2$	261,404	1	261,404	101,2370	0,009734
$x_2 \cdot x_3$	57,513	1	57,513	22,2737	0,042082
Error total	133,115	8	16,639		
Falta de ajuste	127,951	6	21,325	8,2588	0,111928
Error puro	5,164	2	2,582		
Suma total de cuadrados	2017,165	16			

G.L.: Grados de Libertad

p-Valores = Probabilidad p (>F)

$R^2=0,93401$ y $R^2_{\text{Ajustado}}=0,86802$

Fvalor > $F_{0,05(6,8)}_{\text{tabular}} = 3,581$

^a **Significativo para p-Valores <= 0,05**

La tabla 22 muestra la significancia de cada coeficiente codificado los que fueron determinados por la prueba t de Student y los valores-p. Pequeños valores-p fueron asociados con grandes valores t, los que implicaron que los coeficientes de regresión sean muchos más altos que el error estándar (Vega y Zúñiga 2011).

Tabla 22: Coeficientes de regresión y significancia del modelo reducido de regresión reducido de segundo orden, de la actividad volumétrica de inulinasa respecto a **sacarosa**.

Factor	Efecto	Coeficientes de regresión	Error estándar	t(2)	p	95,% I.C. Inferior	+95,% I.C. superior
Media / Intercepto	80,8532	-567,917	59,9834	-9,4679	0,010972	-826,00	-309,829
x₁	19,2233	31,187	2,9942	10,4161	0,009092	18,30	44,070
x₁.x₁	-5,3349	-0,302	0,0541	-5,5896	0,030548	-0,54	-0,070
x₂	-0,4598	1145,221	140,0746	8,1758	0,014633	542,53	1747,913
x₂.x₂	-4,8139	-668,591	134,8184	-4,9592	0,038338	-1248,67	-88,514
x₃	7,4044	-7,032	4,6567	-1,5102	0,270082	-27,07	13,004
x₃.x₃	-1,3814	-0,488	0,3380	-1,4432	0,285747	-1,94	0,966
x₁.x₂	-11,4325	-32,078	3,1881	-10,0617	0,009734	-45,80	-18,360
x₂.x₃	5,3625	37,553	7,9569	4,7195	0,042082	3,32	71,788

Significancia para p-valor $\leq 0,05$

C.I.: Intervalo de confiabilidad

La tabla 23 presenta los valores reales de los factores o variables independientes que dan un valor alto de la respuesta actividad volumétrica de inulinasa, en verdad este punto debería corresponder a la solución del modelo reducido desplazado a un nuevo centro, que es el punto estacionario, cuyos ejes asociados se denominan ejes principales del sistema de respuesta (Vega y Zúñiga 2011). Esta explicación se plantea por que el valor calculado para el tamaño de inóculo fue de **9,37 %v/v** el mismo que está fuera del rango de niveles estudiados, entonces el

punto estacionario calculado del modelo cuadrático ajustado es un punto de silla de montar, para cualquier valor que se le asigne al tamaño de inóculo celular, porque afecta linealmente cada respuesta de actividad.

Tabla 23: Valores óptimos determinados a partir del modelo matemático experimental ajustado, respuesta actividad **invertasa**, para las experiencias de validación

Factor	Valor Mínimo Observado	Valor Optimo	Valor Máximo Observado
x₁ (% v/v)	20,00	28,71818	30,00
x₂ (g/L)	0,30000	0,43078	0,50
x₃ (% v/v)	3,00000	9,37432	7,00
Valor pronosticado para Actividad Volumétrica Inulinasa (U/mL)			93,62

X₁:Extracto de yacon ; X₂:Sulfato de magnesio; X₃: Tamaño de inóculo

Las respuestas para el modelo de regresión ajustado se presentaron gráficamente en las figuras 29, 30 y 31. Los planos de superficie de respuesta y de contorno se generaron por la combinación de pares de los tres factores en estudio, mientras se mantenía el otro en sus niveles óptimos, para la producción de inulinasa expresada como actividad volumétrica.

La figura 29 ilustra el efecto tanto del extracto de yacon como del sulfato de magnesio sobre la producción de inulinasa por fermentación de *K. marxianus* expresada en actividad volumétrica sobre sacarosa, con un tamaño de inóculo de 9,37%v/v, mostrando una superficie con un punto estacionario máximo y plano de contorno que representa la interacción entre los dos factores, con líneas de contorno elípticas, que confirma el punto de máxima respuesta en aproximadamente 100 U/mL para una concentración de extracto de yacon 30% v/v y 0,32 g/L de sulfato de magnesio.

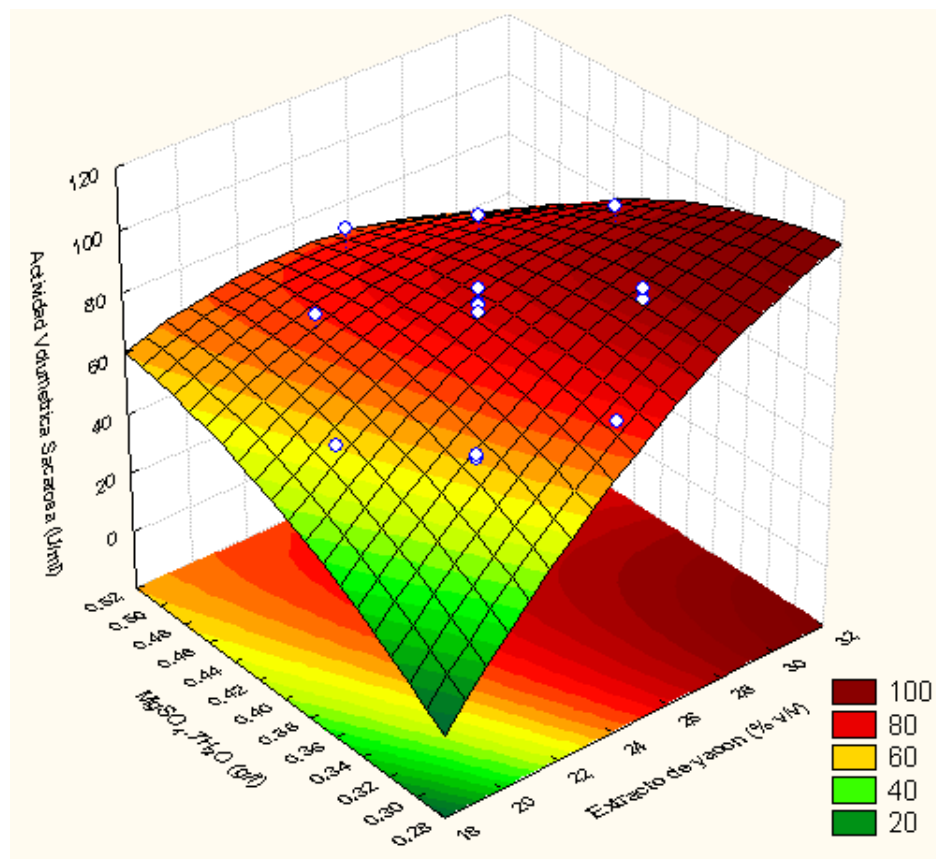


Figura 29: Planos de superficie de respuesta y de contorno a 30 h de fermentación de *K.marxianus* para la actividad volumétrica como invertasa, como función del extracto de yacón y del $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, tamaño de inóculo 9,37 %v/v.

La figura 30 ilustra el efecto tanto del extracto de yacón como del tamaño de inóculo sobre la producción de inulina por fermentación de *K. marxianus* expresada en actividad volumétrica, con una concentración de sulfato de magnesio de 0,43 g/L, mostrando una superficie con un punto máximo y un plano de contorno que representa la interacción entre los dos factores, con líneas de contorno elípticas, que confirma el punto estacionario máximo. La figura muestra también que manteniendo constante la concentración del extracto en 30 %v/v y aumentando o disminuyendo el tamaño del inóculo dentro de los niveles máximo y

mínimo, la producción de inulinasa por fermentación de *K. marxianus* en términos de actividad variaría muy levemente de 90 a 80 U/mL.

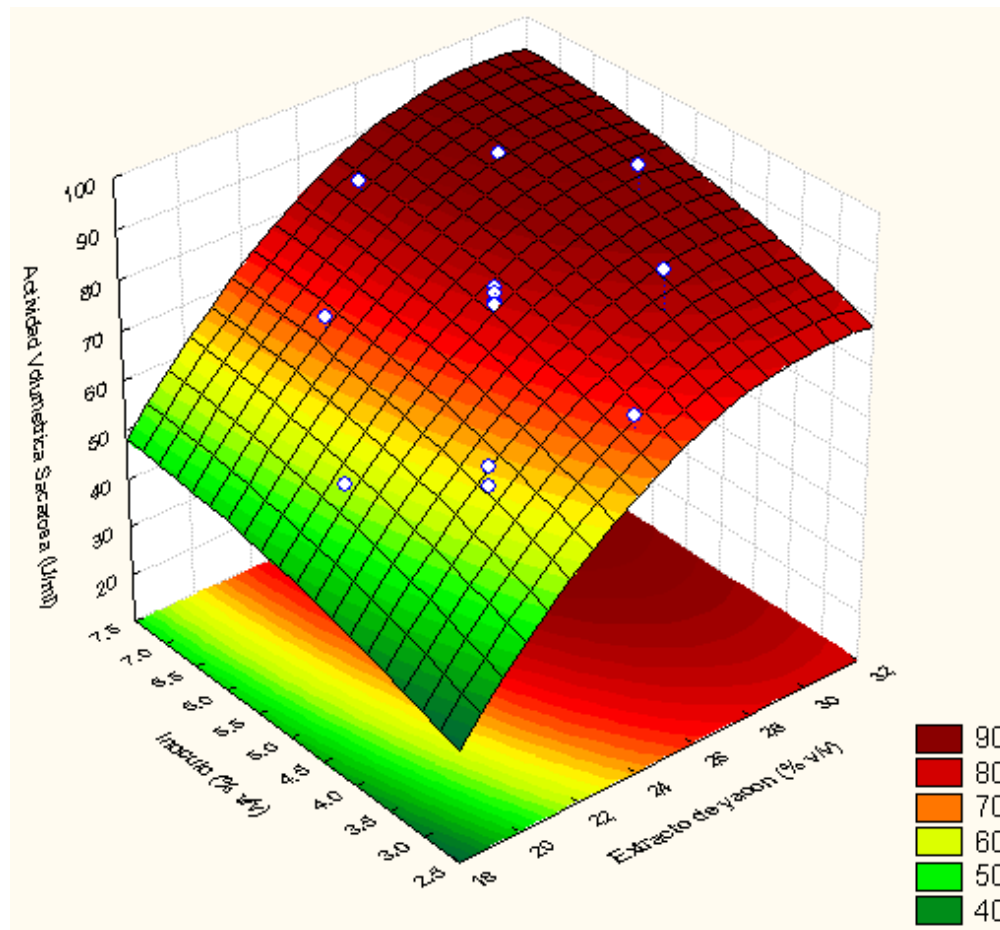


Figura 30: Planos de superficie de respuesta y de contorno a 30 h de fermentación de *K.marxianus* para la actividad volumétrica como invertasa, como función del extracto de yacón y del tamaño de inóculo, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,43 g/L.

La figura 31 ilustra el efecto tanto del sulfato de magnesio como del tamaño de inóculo sobre la producción de inulinasa por fermentación de *K. marxianus* expresada en actividad volumétrica, con una concentración de extracto de yacón de 28,72 %v/v, mostrando una superficie con un punto máximo y un plano de contorno que representa la interacción entre los dos factores, con líneas de contorno elípticas, que confirma el punto estacionario máximo. La figura muestra que manteniendo constante la concentración de sulfato de magnesio de 0,44 g/L y aumentado el tamaño del inóculo a 6,5% v/v, la producción de inulinasa por fermentación de *K. marxianus* alcanzaría un nivel de actividad aproximado de 85

U/mL, confirmándose que según el modelo de regresión ajustado existe el efecto interactivo significativo entre los dos factores.

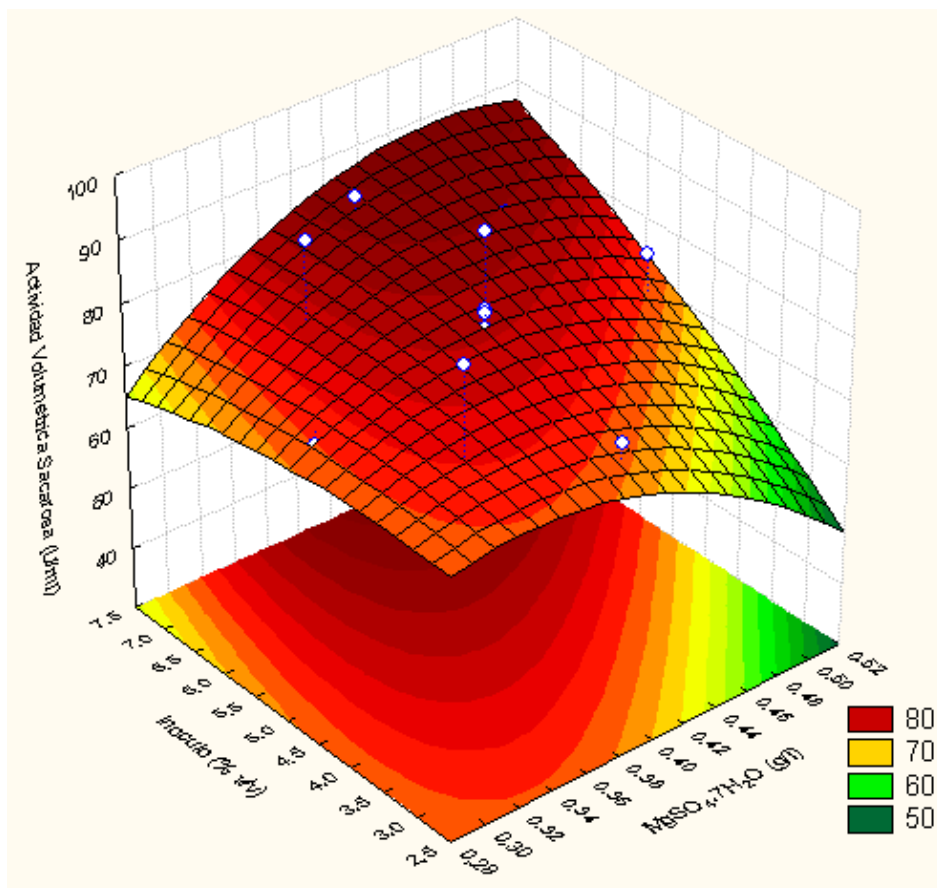


Figura 31: Planos de superficie de respuesta y de contorno a 30 h de fermentación de *K.marxianus* para la actividad volumétrica como invertasa, como función del $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y del tamaño de inóculo, extracto de yacón 28,72 %v/v.

Se concluye que tanto el extracto de yacón como el sulfato de magnesio tienen efecto lineal, cuadrático e interactivo sobre la producción de inulinas por fermentación de *K. marxianus* expresado como actividad enzimática con capacidad fructosidasa e invertasa, mientras que el tamaño de inóculo celular no tiene efecto cuadrático, solo efecto interactivo con el sulfato de magnesio sobre la actividad volumétrica inulinas y efecto lineal e interactivo también con el sulfato de magnesio sobre la actividad volumétrica inulinas con capacidad invertasa.

Utilizando la optimización por DCCR y RSM fue posible determinar los valores óptimos de concentración de extracto de yacón, sulfato de magnesio y tamaño de inóculo que optimicen la producción de inulinasa por fermentación de *K. marxianus*.

El extracto de yacón es una fuente compleja de nutrientes, que es una fuente de carbono (glucosa, fructosa, sacarosa, FOS e inulina) y energía para el crecimiento celular (Seminario, Valderrama y Manrique 2003 y Ojansivu, Ferreira y Salminen 2011). La fuente de carbono constituida por la inulina y los fructooligosacáridos de cadena corta son inductores importantes para la producción de inulinasa por *K. marxianus*, pero la glucosa y fructosa presentes en un medio de cultivo, reprimen la biosíntesis de inulinasa (Wei et al 1998; Cazetta et al 2005 y Yu et al 2009). Esto explica por qué a concentración media del rango estudiado del extracto de yacón, favorecería la producción de inulinasa, mientras que a valores altos tendría un efecto significativo negativo por la mayor concentración de glucosa y fructosa presentes en el medio de cultivo.

Los minerales a nivel de trazas suministran los elementos necesarios a las células microbianas durante su cultivo para su crecimiento y metabolismo (Kampen 1997). El Mg^{2+} puede complejarse con alguna enzima de la biosíntesis de la inulinasa y con la ATP-asa en la membrana plasmática. Singh y Bhermi 2008, encontraron que los iones de Mg^{2+} incrementaron la actividad de la inulinasa en la fermentación de *K. marxianus*. En el rango estudiado de concentración de sulfato de magnesio, la producción de inulinasa se vio favorecida a concentraciones bajas, experimentándose un efecto sinérgico con el extracto de yacón, conforme se muestra en la figura 24 en donde se puede obtener un valor máximo de actividad volumétrica de 2 U/mL.

Si bien es cierto que según la figura 25 no se aprecia un valor óptimo de actividad para la interacción del extracto del yacón con el tamaño de inóculo, si se puede

determinar un valor mayor de actividad de 2,4 U/mL para un tamaño de inóculo de 7% y de 2,23 U/ml para un tamaño de inóculo de 3%. Este resultado es una excepción a la explicación de un bioproceso fermentativo, ya que dado un tamaño óptimo de inóculo un valor sobre o bajo de este, la actividad enzimática debe ser comparativamente menor. Por tanto este resultado solo permitió evaluar estas variables sin lograr obtener un óptimo de actividad.

Sin embargo, Singh y Bhermi 2008, indicaron que es importante proporcionar un tamaño óptimo de inóculo en un proceso de fermentación, dado que un inóculo de baja densidad puede originar insuficiente biomasa durante el cultivo, mientras que un inóculo de alta densidad puede producir demasiado biomasa, en desmedro de los nutrientes necesarios para la formación de productos que en este caso es la enzima inulinasa.

4.6 VALIDACIÓN DEL MODELO EXPERIMENTAL

Durante 48 horas se siguió la cinética de crecimiento de biomasa celular y la producción de inulinasa por *K. marxianus* NRRL – Y 7571, en las condiciones optimizadas para la actividad inulinasa. Los resultados en la figura 32 muestran que la más alta actividad de inulinasa (2,32 U/mL) se alcanzó a las 30 h de la fermentación cuando el crecimiento celular inició la fase estacionaria.

Estos resultados también sugieren que la actual actividad de inulinasa (2,32 U/mL) fue un valor muy cercano al valor predicho (2,19 U/mL) correspondiendo a una desviación pequeña de 5,6%, constatándose que el modelo es adecuado.

Como se puede ver en la figura 32, la inulinasa producida por *K. marxianus* NRRL-Y 7571 es un ejemplo de un producto asociado al crecimiento celular, lo cual está en acuerdo con los resultados preliminares y con los datos de la literatura (Xiong et al 2007). La actividad invertasa a las 30 horas de cultivo correspondió un valor de 78,33 U/mL (dato no mostrado) que significó 19 veces mayor que el reportado por Cazetta, et al. (2005) pero un valor menor al predicho de 91,00 U/mL.

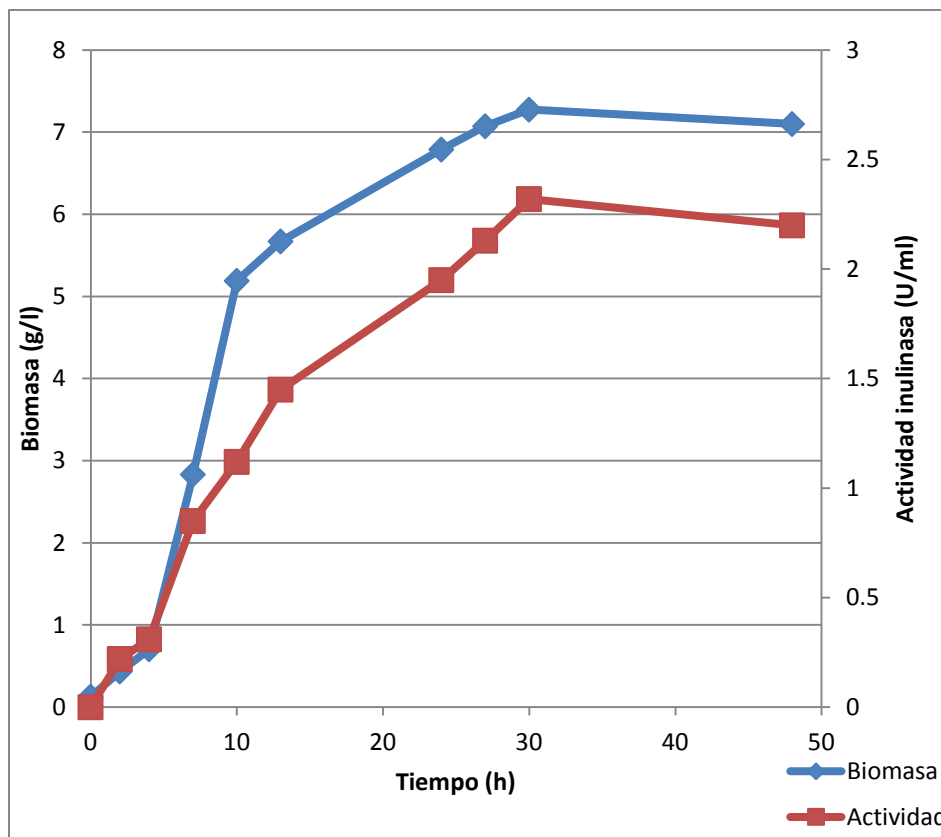


Figura 32. Cinética de crecimiento celular y producción de inulinasa por fermentación de *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y7571 durante 48 horas en las condiciones optimizadas para la actividad inulinasa. Experiencia realizada a pH₀ 4,0 a 30 °C y por lote en matraces Erlenmeyer de 500 mL con 100 mL de medio de cultivo y agitado en shaker a 150 rpm.

4.7 EXPERIMENTO CONFIRMATIVO EN EL FERMENTADOR BIOSTAT-M

La figura 33 muestra los resultados de la experiencia confirmativa de la cinética de producción de inulinasa por cultivo *K. marxianus* en un medio líquido y en las condiciones optimizadas durante 48 horas, en un fermentador de laboratorio Biostat-M. El mayor valor de actividad (1,8 U/mL) se alcanzó también a las 30 horas, menor en 17,8% que el valor predicho.

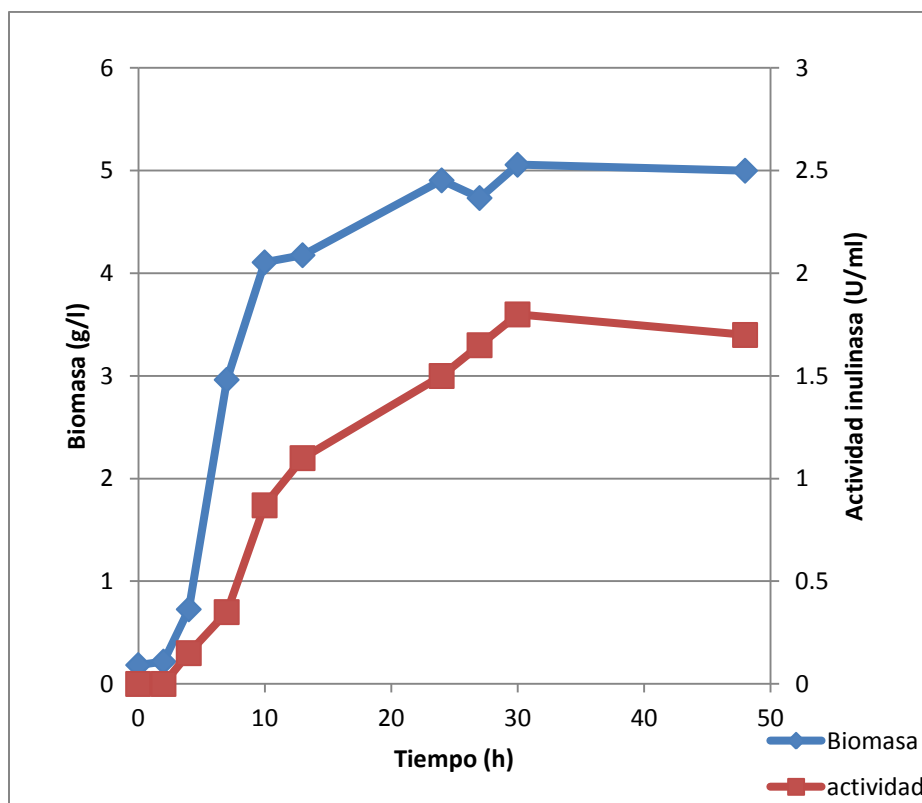


Figura 33. Cinética de crecimiento celular y producción de inulina por fermentación de *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y7571 durante 48 horas en las condiciones optimizadas para la actividad inulina. Experiencia realizada a pH₀ 4,0 a 30 °C y por lote en un fermentador de laboratorio Biostat-M con 1600 mL de medio de cultivo, a 150 rpm y aireación 1,06 vvm.

De los perfiles de las cinéticas de crecimiento celular y producción de inulina de *K. marxianus* cultivados tanto en matraces como en el Biostat-M, figuras 32 y 33 se pudo observar un típico producto asociado al crecimiento, aunque en matraces se alcanzó a las 30 h, 7,3 g de células /L el cual es un valor mayor que lo esperado respecto a la fermentación en el reactor Biostat-M (5 g de células/l).

También se determinó un ligero incremento en el valor del pH del cultivo en matraces a partir de las 10 horas, que con el transcurso de la fermentación se hizo constante a un valor promedio de pH igual a 6, mientras que en el cultivo en el reactor Biostat- M el valor del pH permaneció constante. Es preciso señalar que el crecimiento celular no sufrió ninguna variación durante la variación del pH del cultivo desde 4,0 hasta 6,0 como reportaron Cazetta, et al.(2005).

La baja concentración de biomasa celular y la producción de inulinasa obtenidas en el Biostat-M se puede explicar por el hecho que el nivel de aireación (1,06 vvm), no estuvo acorde a la demanda de oxígeno del cultivo (dato calculado 1,23 vvm). Este fenómeno fue notorio a partir de las 7 h del cultivo. Estos resultados coincidieron con aquellos los reportados por Sing, et al (2007), quienes afirmaron que tanto la aireación y agitación son factores críticos para *K. marxianus*, los que son responsables de la viabilidad y producción enzimática.

Además *K. marxianus* comenzó a producir etanol después de las 7 horas de cultivo, alcanzándose a las 30 horas una concentración de 1% v/v (dato no mostrado) lo cual fue también consecuencia de la limitación de oxígeno en el caldo de cultivo que favoreció la vía glicolítica del microbio.

También, como se ilustra en las figuras 32 y 33, las actividades de inulinasa se convirtieron evidentes y en ascenso después de las 10 horas de cultivo, lo cual se debió a la alta concentración inicial de azúcares reductores (7,0 g/L de fructosa y glucosa) en el caldo de cultivo que estarían reprimiendo la expresión o actividad catalítica de la inulinasa (Cazetta, et al. 2005 y Singh et al. 2007).

4.8 CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE LA INULINASA EN EL EXTRACTO CRUDO.

También en este experimento, como lo presentado en la sección 4.3, la determinación del rango de linealidad, actividad y los parámetros cinéticos de la inulinasa en el extracto crudo se realizó según lo detallado en la sección correspondiente 3.4.

En el extracto enzimático del caldo de fermentación en matraces de *K. marxianus* se determinó una concentración en proteínas de 113 mg/L, valor diferente al obtenido en la sección 4.3, esto debido a las condiciones de fermentación optimizadas utilizadas en la experiencia de validación.

La tabla 24 muestra los valores de actividad calculados a partir de los tres perfiles de rango de linealidad, en las zonas de linealidad, para el extracto enzimático convenientemente diluido: 1:1; 1:2 y 1:4, 1:1, 1:4 y 1:6, 1:1; 1:4 y 1:6, actuando sobre sacarosa, rafinosa e inulina respectivamente.

Tabla 24. Valores de actividad volumétrica a_v , específica a_e y actividad por volumen de reacción a_{reac} , del extracto enzimático del caldo de fermentación de *K. marxianus* actuando sobre sacarosa, rafinosa e inulina.

sustrato	a_v (U/mL)	a_e (U/mg)	a_{reac} (U/L)
Sacarosa	77,06	681,96	1404,11
Rafinosa	15,25	134,99	231,11
Inulina	2,35	20,80	213,94

Según la tabla 24 comparada con la tabla 6, se observa también que el extracto crudo enzimático experimentó tener actividad catalítica para hidrolizar sacarosa, rafinosa e inulina, pero con valores menores, esto se explica por la composición del extracto de yacón usado como fuente de carbono y energía que es un medio complejo que contiene además de inulina, azúcares reductores y otros componentes tales como derivados del ácido cafeico (Seminario, Valderrama y Manrique 2003; Valentová et al. 2006 y Ojansivu, Ferreira, y Salminen 2011) que podrían estar inhibiendo tanto la síntesis como la actividad catalítica de la enzima. Se aprecia también que la actividad relativa de sacarosa respecto a inulina fue 33 veces mayor, aunque la actividad específica alcanzada sobre inulina fue de 20 800 U/g valor mayor que el obtenido en el experimento 4.3. que fue 11 350 U/g y sin embargo mucho menor que lo publicado (Kushi, Monti y Contiero 2000) de 170 000 U/g aunque la experiencia correspondió, a una inulinasa purificada de un caldo de fermentación de 72 horas de cultivo.

En vista de los resultados del experimento de la sección 4.3., en esta determinación de los parámetros cinéticos de la inulinasa, se utilizaron valores recalculados de las concentraciones iniciales de sustrato, para asegurar así un mejor trabajo de linealidad (Bas y Boyaci 2007).

La tabla 25 muestra los valores de los parámetros cinéticos aparentes V_{ap} y K_{ap} , estimados a partir de los datos de las tres figuras resultantes de las líneas de tendencia de mediciones de velocidad inicial de reacción, a diferentes concentraciones de sustrato en g/L: 3,64 a 17,58; 6,82 a 13,64 y 3,03 a 8,79 de sacarosa, rafinosa e inulina respectivamente, catalizada por el extracto crudo enzimático diluido igual como en el experimento 4.3 y por linearización de Lineweaver-Burk.

Tabla 25. Valores de los parámetros cinéticos aparentes del extracto enzimático del caldo de fermentación de *K. marxianus* actuando sobre sacarosa, rafinosa e inulina.

sustrato	$V_{ap}(g/L \cdot min)$	$K_{ap}(g/L)$
Sacarosa	1,4578	14,3745
Rafinosa	0,1651	12,5277
Inulina	0,0463	8,3113

Al comparar los valores de V_{ap} de las tablas 25 y 7, se confirma que el extracto enzimático ejerce más reactividad catalítica sobre las moléculas de sacarosa que de los otros sustratos, mientras que comparando los valores de K_{ap} se observa que la enzima experimenta más afinidad por la inulina, seguida de la rafinosa.

El valor de la K_{ap} sobre la inulina de 8,31 g/L fue muy cercano al 8,59 g/L obtenido en el experimento de la sección 4.3. Con los valores de K_{ap} obtenidos y la buena linealidad observada se confirmó el buen rango de concentración de sustrato saturantes escogidos para la investigación, valores que cayeron en el rango de $0,25 - 5K_{ap}$ (Bas y Boyaci 2007).

Se confirmó también que la magnitud de K_{ap} varió ampliamente con la identidad de la enzima y la naturaleza del sustrato (Voet y Voet, 1990).

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS.

5.1. CONCLUSIONES

- De la caracterización de sacáridos en los extractos de yacón y espárragos se ha determinado que ambos contienen azúcares reductores, encontrándose en el primero un 65% más de fructosa y glucosa que en el segundo e identificándose solo en el extracto de yacón, sacarosa y FOS.
- De los cultivos por lotes preliminares de *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y-7571 en sacarosa, en inulina de achicoria, en extracto de espárragos y en extracto de yacón como fuentes de carbono y energía, se determinaron respectivamente los perfiles típicos de modelos cinéticos de producción de enzimas asociados al crecimiento celular, lográndose estandarizar el tiempo de incubación en 30 horas para las siguientes experiencias de optimización.
- Por aplicación del diseño experimental de Plackett & Burman, se determinó que el extracto de yacón, el sulfato de magnesio y el tamaño de inóculo fueron los que más influenciaron en el valor de la actividad de inulinasa del extracto crudo de fermentación.
- Con la aplicación del diseño compuesto central rotacional (DCCR) y la metodología de la superficie de respuesta (RSM) se determinaron las concentraciones óptimas del extracto de yacón, el sulfato de magnesio y el tamaño de inóculo que correspondieron a valores predichos máximos de actividad inulinasa e invertasa del extracto crudo de fermentación.
- De los resultados de las experiencias de validación se constató que el modelo predicho de optimización fue el adecuado para describir el diseño experimental.

- Los resultados de las experiencias confirmativas en el bioreactor Biostat-M mostraron una desviación de 17,8 % respecto al valor de actividad predicho por el modelo, debido a limitaciones de aireación y agitación del medio de cultivo, factores claves para la producción de inulinasa por fermentación.
- Los perfiles de las cinéticas de cultivo por lote de *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y-7571 estudiados, tanto en matraces en las experiencias de validación como en el reactor Biostat-M, constituyen un ejemplo típico de un producto enzimático asociado al crecimiento celular.
- Se ha determinado que el extracto crudo enzimático conteniendo inulinasa experimentó tener actividad catalítica para hidrolizar sacarosa, rafinosa e inulina, con alta actividad relativa de sacarosa respecto a inulina.
- Los valores de actividad de la inulinasa sobre sacarosa fueron alrededor de 33 veces mayor que sobre inulina, probándose que la enzima producida es una exo-inulinasa.
- Por mediciones de velocidad inicial de reacción a diferentes concentraciones saturantes de sacarosa, rafinosa e inulina, fue posible determinar los parámetros cinéticos que caracterizan a la inulinasa del extracto crudo, la misma que expresó más reactividad de hidrólisis catalítica de invertasa que inulinasa y más afinidad por la inulina que por la sacarosa.
- Los parámetros cinéticos de la inulinasa están en función al tipo de microorganismo, las condiciones ambientales de la fermentación y del modo de acción de la enzima.

5.2. SUGERENCIAS

- Se plantea la necesidad de investigar la actividad y estabilidad de la inulinasa frente a la temperatura, modelando y simulando la cinética de desactivación.
- Concentrar y purificar la inulinasa del extracto crudo de fermentación para su caracterización cinética química y molecular.
- Profundizar el estudio de obtención y caracterización del extracto de espárrago para superar los problemas de caramelización y poder utilizarlo como fuente de carbono y energía en el medio de cultivo.
- Realizar estudios de escalamiento en un pequeño bioreactor de laboratorio con miras a posteriores estudios de mayor escalamiento para la producción de inulinasa usando extracto de yacon.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anastasios S. Siomos, Dimitrios Gerasopoulos, Pavlos Tsouvaltzis y Athanasios Koukounaras. 2010. Effects of heat treatment on atmospheric composition and color of peeled white asparagus in modified atmosphere packaging. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*.11:118-122 .

Azanza, M.; Gontier, E.; Bienaime, C.; Nava, J. y Barbotin, J. 1997. Response surface analysis of chlortetracycline and tetracycline production with K-carrageenan immobilized *Streptomyces aureofaciens*. *Enzyme and Microbial Technology*, 21, 314-320.

Barraco-Florido, E.; García- Garibay, M.; Gómez-Ruíz, L. y Azaola, A. 2001. Immobilization system of *Kluyveromyces marxianus* cells in barium alginate for inulin hydrolysis. *Process Biochem*, 37: 513-519.

Bas, D. y Boyaci, I. 2007. Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 78: 836-845.

Bender, J.; Mazutti, M. Treichel, H. y Di Luccio, M. 2006. Inulinase production by *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y -7571 using solid state fermentation. *Appl Biochem Biotechnol*, 32:951-958.

Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram of protein utilizing the principle of protein dye-binding- *Anal. Biochem*.72, 248-254.

Bruner R. 1964. Determination of reducing value. En *Methods in Carbohydrate Chemistry*, (Ed. Whistler R); 4 pp 67-71. New York Academic Press.

Calam, CH. 1986. Shake-Flash Fermentations. En *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, (Ed. Demain & Solomon); pp 59-65. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Casas, J.; Rodríguez, E.; Oller, I.; Ballesteros, M.; Sánchez, J.; Fernández, J. y Chisti, Y.2006. Simultaneous determination of oxygen consumption rate and volumetric oxygen transfer coefficient in pneumatically agitated bioreactors. *Ind. Eng. Chem.Res*, 45, 1167-1171.

Cazetta, M.; Martins, P.; Monti, R. y Contiero, J. 2005. Yacon (*Polymnia sanchifolia*) extract as a substrate to produce inulinase by *Kluyveromyces marxianus* var. *Bulgaricus*. *Journal of Food Engineering*, 66, 301-305.

Chen H, Chen X, Chen T, Xu X y Jin Z-Y. 2011. Optimization of solid-state medium for the production of inulinase by *Aspergillus ficum* JNSP-06 using response surface methodology. *Carbohydrate Polymers*, 86: 249-254.

Chen, H-Q. et al.. 2009. Purification and characterisation of exo- and endo-inulinase from *Aspergillus ficuum* JNSP5-06. *Food Chemistry*. Vol 115. 1206-1212.

Chi, Z., Zhang, T., Cao, T-S., Liu, X-Y., Cui, W. y Zhao, Ch-H. 2011. Biotechnological potential of inulin for bioprocess. *Bioresource Technology*, 102: 4295-4303.

Chi, Z.; Chi, Z.; Zhang, T. y Liu, G. 2009. Inulinase-expressing microorganisms and applications of inulinases. *J Appl Glycosci*, 51: 247-254.

Cooney, Ch. 1981. Growth of microorganisms. En *Biotechnology*, (Ed. Rehm and Reed, H-J); 1 pp. 77-112.

Cruz-Guerrero, A. ; García-Peña, I. ; Barzana, E. ; García-Garibay, M. y Gómez-Ruíz, L. 1995. *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-278: A wild inulinase hyperproducing strain. *J. Ferment. Bioeng*, 80 : 159-163.

Cruz-Guerrero, A. ; Olvera, J. ; García-Garibay, M. y Gómez-Ruíz, L. 2006. Inulinase –hyperproducing strains of *Kluyveromyces* sp. Isolated from aguamiel (Agave sap) and pulque. *World J. Microbiol Biotechnol*, 22 :115-117.

de Paula, F.; Cazetta, M.; Monti, R. y Contiero, J. 2008. Sucrose hydrolysis by gelatin-immobilized inulinase from *Kluyveromyces marxianus* var. *Bulgaricus*. *Food Chemistry*, 111: 691-695.

Esparragos, dieta de primavera. Botanical-online. <http://www.botanical-online.com/esparragos.htm>. 06.02.2013.

Ettalibi, M. y Baratti, J. 2001. Sucrose hydrolysis by termoestable immobilized inulinases from *Aspergillus ficuum*. *Enzyme Microb. Technol.*28: 596-601.

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.

Golunski S. et al.. 2011. Ethanol precipitation and ultrafiltration of inulinases from *Kluyveromyces marxianus*. *Separation and Purification Technology*, 78: 261-265.

Graefe, S.; Hermann, M.; Manrique, I.; Golombek, S. y Buerkert, A. 2004. Effects of post-harvest treatments on the carbohydrate composition of yacón roots in the Peruvian Andes. *Field Crops Research*, 86: 157-165.

Greasham, R. y Inamine, E.. 1986. Nutritional Improvement of Processes. En *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, (Ed. Demain & Solomon); pp 59-65. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Han, O. Ch.; Xiao, M. Ch.; Yin, L.; Ping, W.; Zheng, Y. J.; Xue, M. X.; Jian, W. Z.; Tian, X. Ch. y Zheng, J. X. 2009. Purification and characterisation of exo- and endo-inulinase from *Aspergillus ficuum* JNSP5-06. *Food Chemistry*, Vol 115. 1206-1212.

Hensing, M.; Vrouwenvelder, J.; Hellinga, C.; Van Dijken, J. y Pronk, J. 1995. Use of chemostat data for modelling extracellular inulinase production by *Kluyveromyces marxianus* in a high cell density fed batch process. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 79(1): 54 – 58.

Hernan, M; Freire, I. y Pazos, C. 1999. Compositional diversity of the yacon storage root. *International Potato Center (CIP)*. Lima-Perú. p 425-432.

<http://www.lamolina.edu.pe/Investigacion/programa/yacon/Yacon.htm>. 04.05.10
Illanes, A. .2008. *Enzymes biocatalysis – Principles and applications*. (1ra Ed.)-(pp. 1-46).Valparaíso.

Irving, D. y Hurst, P. 1993. Respiration, soluble carbohydrates and enzymes of carbohydrate metabolism in tips of harvested asparagus spears. *Plant Science*, 94: 89-97.

Kalil, S.; Suzan, R.; Maugeri, F. y Rodrigues, M. 2001. Optimization of inulinase production by *Kluyveromyces marxianus* using factorial design. *Appl Biochem Biotechnol*, 94:257-264.

Kalil, S; Maugeri, F y Rodrigues, M. 2000. Response surface analysis and simulation as a tool for bioprocess design and optimization. *Process Biochemistry*, 35, 539-550.

Kampen, W. 1997. Nutritional requirements in fermentation process. En: Vogel H y Todaro C. (Eds.).*Fermentation and biochemical engineering handbook*. (2da. Ed.). (pp. 122-160). New Jersey, U.S.A.: Noyes Publications.

Kango, N. 2008. Production of inulinase using tap roots of dandelion (*Taraxacum officinale*) by *Aspergillus niger*. *Journal of food Engineering*, 85: 473 – 478.

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*, 25, 63-69.

Laloux, O.; Cassart, J.; Delcour, J.; Van Beeumen, J. y Vandenhoute, J. 1991. Cloning and sequencing of the inulinase gene of *Kluyveromyces marxianus* var. *Marxianus* ATCC 12424. *FEBS LETTERS*, 289 (1): 64 – 68.

Lane, M. y Morrissey, J. 2010. *Kluyveromyces marxianus*: A yeast emerging from its sister's shadow. *Fungal Biology Reviews*, doi:10.1016/j.fbr.2010.01.001.

Leite, J.; Murr, F.; Martinelli, P. Dal, I. y Park, K. 2007. "Optimization of a physical concentration process for inulin" . Journal of Food Engineering, 80, 832-838.

Liu, Y.; Liu, Q. y Tay, J. 2005. Initial conditions-dependent growth kinetics in microbial batch culture. Process Biochemistry, 40, 155-160.

Madeira, E. 2004. Kinetic analysis of *Kluyveromyces marxianus* yeast strain. Louisiana State University. Disponible en: http://etd.lsu.edu/docs/available/etd-04152004-161117/unrestricted/Reeves_thesis.pdf.

Madrigol, L. y Sangronis, E. 2007. La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales. Archivos Latinoamericanos de Nutrición – Órgano Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición.57:383 – 396.

Mazutti, M.; Bender, J.; M. Treichel, H. y Di Luccio. 2006. Optimization of inulinase production by solid-state fermentation using sugarcane bagasse as substrate. Enzyme Microb Technol, 39:56-59.

Mazutti, M.; Zobot, G.; Boni, G.; Skovronski, A.; de Oliveira, D.; Di Luccio, M.; Rodrigues, M.; Treichel, H. y Maugeri, F. 2010. Kinetics of inulinase production by solid-state fermentation in a packed-bed bioreactor. Food Chemistry, 120: 163-173.

Mughal, M.; Ali, S.; Ashiq, M. y Talish, A. 2009. Kinetics of an extracellular exo-inulinase production from a 5-fluorocytosine resistant mutant of *Geotrichum candidum* using two-factorial design. Bioresour Technol, 100: 3657-3662.

Ojansivu, I., Ferreira, C. y Salminen, S. 2011. Yacon, a new source of prebiotic oligosaccharides with a history of safe use. Trends in Food Science & Technology, 22:40-46.

Otha, K.; Akimoto, H. y Moriyama S. 2004. Fungal Inulinases: Enzymology, Molecular Biology and Biotechnology, 51: 247-254.

Pandey, A.; Soccol, C.; Selvakumar, P.; Soccol, V.; Krieger, N. y Fontana, J. 1999. Recent Developments in Microbial Inulinases. Appl Biochem Biotechnol, 81: 35-52.

Pedreschi, R.; Campos, D.; Noratto, G.; Chirinos, R. y Cisneros-Zevallos, L. 2003. Andean Yacón Root (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. Endl) Fructooligosaccharides as a Potential Novel Source of Prebiotics. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51: 5278-5284.

Pratima, B. y Argyrios, M. 1985a. Immobilization of *Kluyveromyces marxianus* cells containing inulinase activity in open pore gelatin matrix: 1. Preparation and enzymatic properties. Enzyme Microb Technol, 7 (8): 373-376.

Ricca, E.; Calabró, V.; Curcio, S. y Dorio, G. 2007. The State of the Art in the Productio of Fructose from inulin Enzymatic Hydrolysis. *Crit Rev Biotechnol*, 27: 129-145.

Ricca, E.; Calabró, V.; Curcio, S. y Iorio, G. 2009. Fructose production by chicory inulin enzymatic hydrolysis: A kinetic study and reaction mechanism. *Process Biochemistry*.44, 466-470.

Rocha, J.; Catana, R.; Ferreira, B.; Cabral, J. y Fernandes, P. 2006. Design and characterisation of an enzyme system for inulin hydrolysis. *Food Chemistry*. 95.77-82.

Rodrigues, M. y Iemma, A. 2005. Planejamento de Experimentos e otimização de Processos. (1ra Ed) (pp. 135-264). Campinas Brasil. Casa do Pão Editora.

Rouwenhorst, R. Hensing, M.; Verbakel, J.; Scheffers, W. y Van Dijken, J. 1988. Production, distribution, and kinetic properties of inulinase in continuous cultures of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. *Appl. Environ. Microbiol.*54(5):1131-1137.

Rouwenhorst, R. Visser, L.; Vander A.; Scheffers, W. y Van Dijken, J. 1988. Production, distribution, and kinetic properties of inulinase in continuous cultures of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. *Appl. Environ. Microbiol.*54.5.1131-1137.

Rouwenhorst, R.; Hensing, M.; Verbakel, J.; Scheffers, W. y Van Dijken, J. 1990. Structure and Properties of the Extracellular Inulinase of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 3337-3345.

Sangeetha, P.; Armes, M.; y Prapulla, S. 2005. Recent trends in the microbial production, analysis and application of fructooligosaccharides. *Trends in Food Science & Technology*, 16: 442-457.

Santos, A.; Oliveira, M. y Maugeri, F. 2007. Modelling thermal stability and activity of free and immobilized enzymes as a novel tool for enzyme reactor design. *Bioresour. Technol.* Vol 98.3142-3148.

Seminario, J.; Valderrama, M. y Manrique, I. 2003. El Yacón fundamentos para el aprovechamiento de un recurso promisorio. CIP y COSUDE, Lima Perú, 60p.

Silva-Santisteban, B. Y Filho F. 2005. Agitation, aeration and shear stress as key factors in inulinase production by *Kluyveromyces marxianus*. *Enzyme Microb Technol*, 36:717-724.

Sing, R. S. y Bhermi, H. K. 2008. Production of extracellular exoinulinase from *Kluyveromyces marxianus* YS-1 using root tubers of *Asparagus officinalis*. *Bioresour. Technol.* Vol 98.7418-7424.

Singh, R.; Dhaliwal, R. y Puri, M. 2007a. Partial purification and characterization of exoinulinase from *Kluyveromyces marxianus* YS-1 for preparation of high-fructose syrup. *J Microbiol Biotechnol*, 17(5): 733-738.

Singh, R.; Singh, B. y Puri, M. 2007b. Optimization of medium and process parameters for the production of inulinase from a newly isolated *Kluyveromyces marxianus* YS-I. *Bioresource Technology*, 98: 2518 – 2525.

Siomos, A.; Gerasopoulos, D.; Tsouvaltzis, P. y Koukounaras, A. 2010. Effects of heat treatment on atmospheric composition and color of peeled white asparagus in modified atmosphere packaging. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11 (1): 118-122.

Stanbury P., Whitaker A. y Hall S. 1995. Principles of fermentation technology. (2da Ed.)- (pp. 13-31). U.K.: Elsevier Science Ltd.

Valentová, K.; Lebeda, A.; Dolezalova, I.; Jirovsky, D.; Simonovska, B.; Vovk, I.; Kosina, P.; Gasmanova, N.; Dziechciarkova, M. y Ulrichova, J. 2006. The Biological and Chemical Variability of Yacón. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 1347-1352.

Vega R. y Zúñiga-Hansen M. 2011. Enzymatic synthesis of fructooligosaccharides with high 1-kestose concentrations using response surface methodology. *Bioresour. Technol*, doi:10.1016/j.biortech.2011.09.025.

Villaça, P.; Badino, A.; Facciotti, M. y Schmidell, W. 2000. Determination of power consumption and volumetric oxygen transfer coefficient in bioreactors. *Bioprocess Engineering*, 22, 261-265.

Voet, D. y Voet, J. 1990. *Biochemistry*, pp. 245-260, 335-349, 373, 374, John Wiley & Sons, Inc. USA.

Walter, W.; McBee, R. y Temple Ken. 1994. *Introducción a la microbiología*. Editorial CECSA México.

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*, 86 (4): 395 -399.

Xinjun, Y.; Ning, G.; Zhenming Ch.; Fang, G. y Jun, Z. Ch. 2009. Inulinase overproduction by a mutant of the marine yeast *Pichia guilliermondii* using surface response methodology and inulin hydrolysis. *Biochem.Eng. J.* Vol 43. 266-271.

Xiong, Ch.; Jinhua, W. y Dongsheng, L. 2007. Optimization of solid.state medium for the production of inulinase by *Kluyveromyces* S120 using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*, 34: 179 – 184.

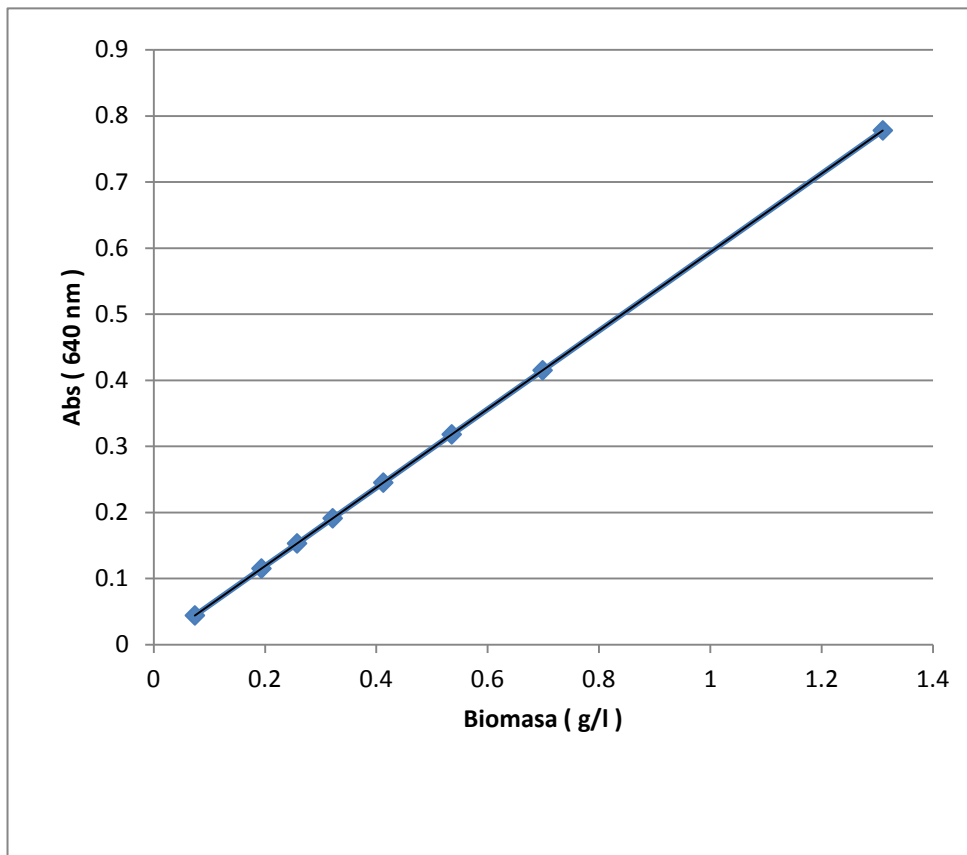
Yu, X.; Guo, N.; Chi, Z. y Gong, F. 2009. Inulinase overproduction by a mutant of the marine yeast *Pichia guilliermondii* using surface response methodology and inulin hydrolysis. *Biochem Eng J*, 43: 266-271.

Zhang, T.; Gong, F.; Peng, Y. y Chi, Z. 2009. Optimization for high-level expression of the *Pichia guilliermondii* recombinant inulinase in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant inulinase. *Process Biochem*, doi:10.1016/j.procbio.2009.07.008.

Zherebtsov, N.; Abramova, I.; Shelamova, S. y Popova, T. 2003. Identification of Catalytically Active Groups in Inulinase from *Bacillus polymyxa* 722. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 39 (6): 544-548.

ANEXO 1

Curva de calibración para la determinación de concentración de celular.

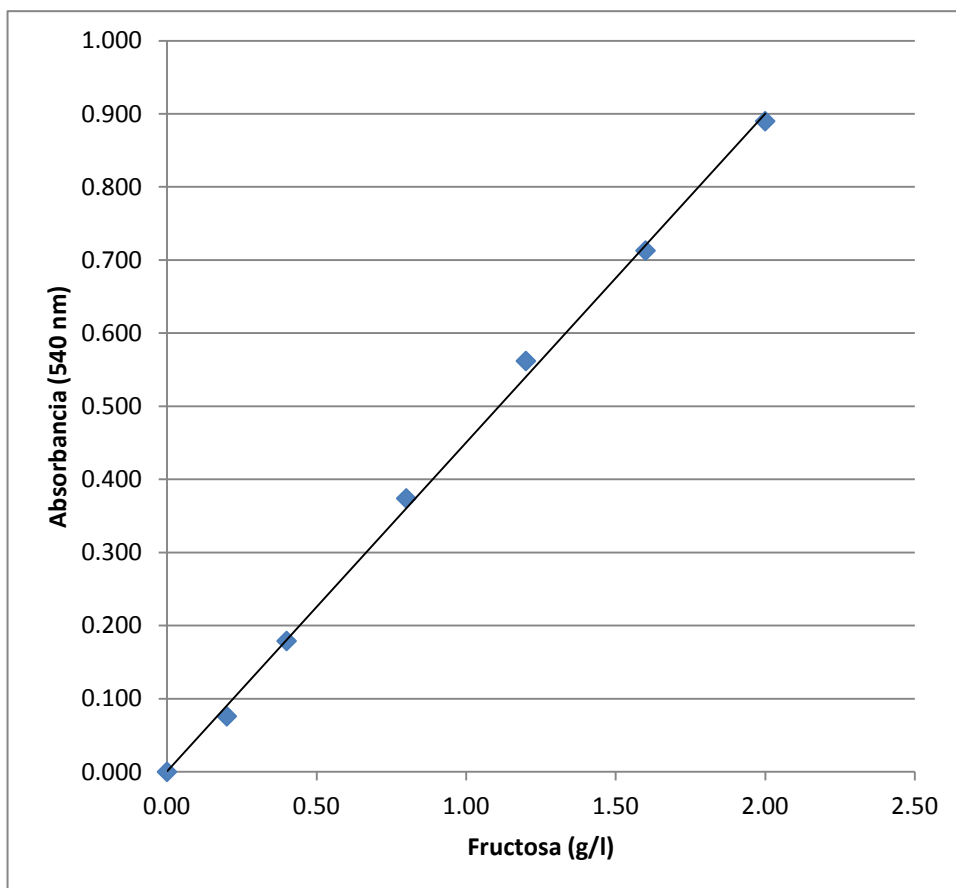


$$\text{Biomasa celular (g/l)} = \frac{\text{ABS}_{640\text{nm}} - 2 \cdot 10^{-6}}{0,5939}$$

$$R^2 = 1$$

ANEXO 2

Curva de calibración para la determinación de concentración de azúcares reductores, en términos de fructosa, por el método del ácido dinitrosalicílico (DNS)

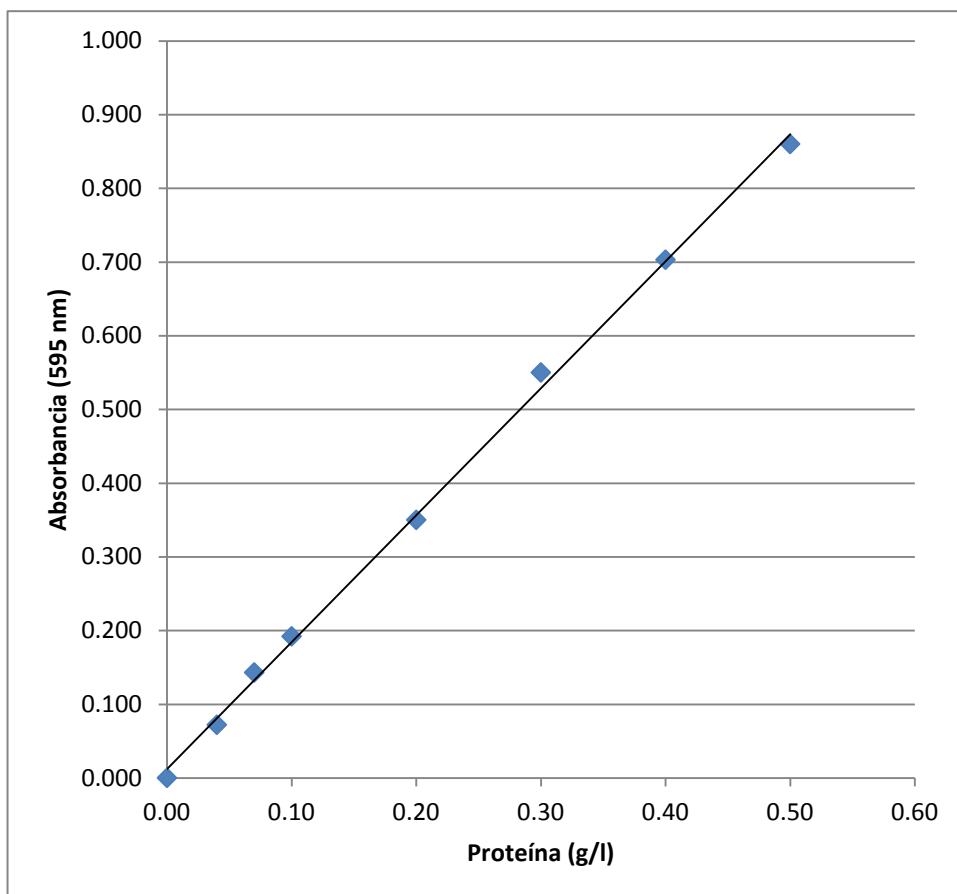


zúcares reductores (fructosa g/l)= $\frac{ABS}{0,449}$

0,449

$R^2 = 0,998$

ANEXO 3

Curva de calibración para la determinación de proteínas por el método de Bradford

$$\text{Proteína (g/l)} = \frac{\text{ABS} - 0,011}{1,723}$$

$$R^2 = 0,998$$

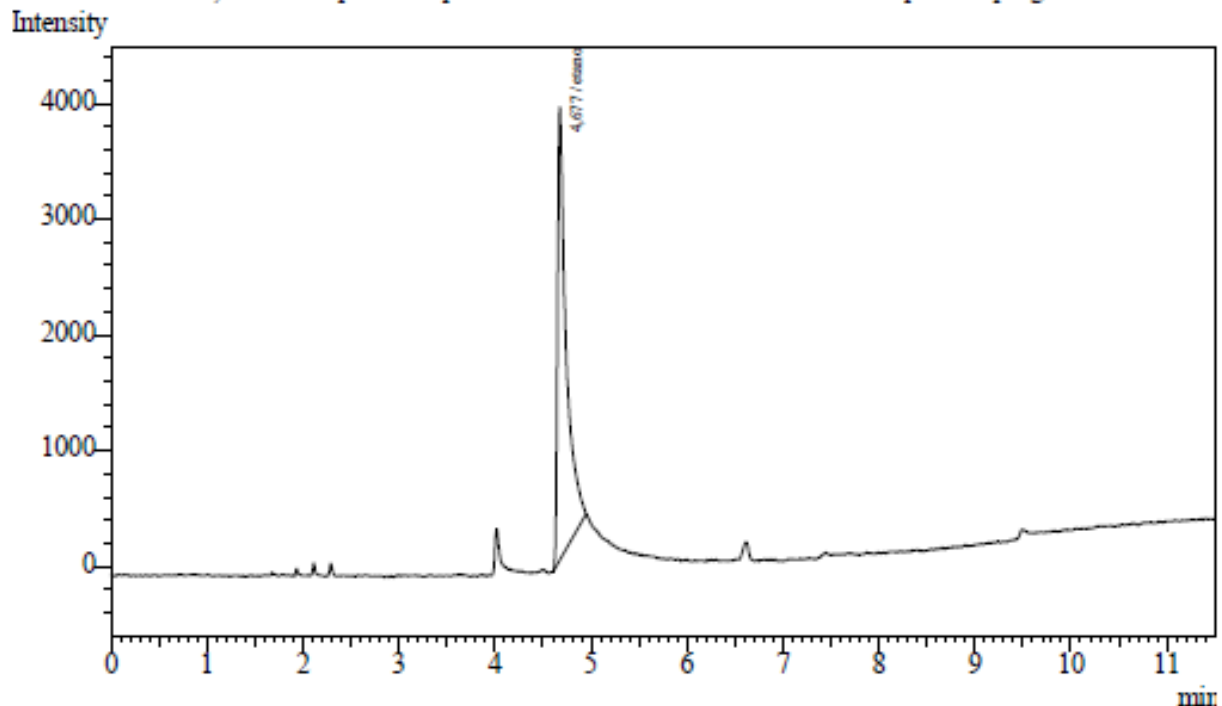
ANEXO 4

Cromatograma para la determinación de etanol

Analysis Date & Time : 12/10/2011 12:37:32
 User Name : Admin
 Vial# : 1
 Sample Name : muestra cinetica II. 12.10.11
 Sample ID : muestra cinetica II
 Sample Type : Unknown
 Injection Volume :
 ISID Amount :

Data Name : C:\Data\HEADSPACE 2011\mix alcoholes1 26.09\muestra cinetica II.gcd
 Method Name : C:\Data\HEADSPACE 2011\mix alcoholes1 26.09\mix alcoholes1 26.09.gcm
 [Description]

muestra cinetica II, analizado por headspace volumen de muestra 2ml con un tiempo total programado 11.5min. dia 12/10/2011



Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	ID#	Compd Name
1	4.677	24715	3896	0.381	%		3	etanol
Total		24715	3896					

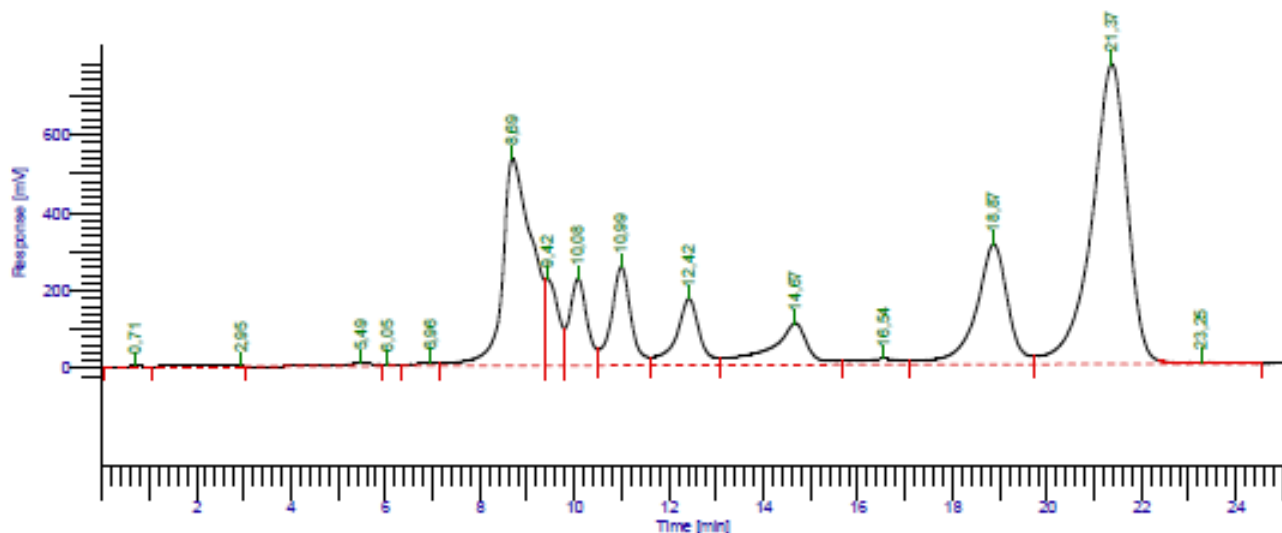
ANEXO 5

Cromatograma para la determinación de sacáridos en extracto de yacón

Page 1 of 1

Software Version : 6.3.1.0504	Date : 19-08-2011 18:04:26
Sample Name : y1	Data Acquisition Time : 19-08-2011 17:35:54
Instrument Name : HPLC RI	Channel : A
Rack/Vial : 0/0	Operator : manager
Sample Amount : 1,000000	Dilution Factor : 1,000000
Cycle : 1	

Result File : d:\roberto\caracterizacion muestras oligosacaridos\231_001-20110819-180103.rst
 Sequence File : C:\PenExe\TcW\SI\Ver6.3.1\Examples\231.seq



AZUCARES

Peak #	Component Name	Time [min]	Area [uV*sec]	Height [uV]	Area [%]	Norm. Area [%]
1		0,711	20313,86	528,84	0,02	0,02
2		2,953	121701,19	1924,44	0,11	0,11
3		5,489	347210,84	8171,35	0,32	0,32
4		6,048	110059,72	5023,77	0,10	0,10
5		6,956	287953,57	7105,77	0,26	0,26
6		8,692	23177772,41	532065,25	21,26	21,26
7		9,424	4101969,50	221454,86	3,76	3,76
8		10,075	5704932,41	223255,11	5,23	5,23
9		10,991	7266703,15	253467,38	6,66	6,66
10		12,421	5950644,04	170110,81	5,46	5,46
11		14,670	5952004,41	106964,97	5,46	5,46
12		16,543	957770,76	14331,61	0,88	0,88
13		18,871	14507946,90	308352,34	13,31	13,31
14		21,371	40289124,52	770694,99	36,95	36,95
15		23,254	245045,38	4448,63	0,22	0,22
			1,09e+08	2,63e+06	100,00	100,00

Missing Component Report
 Component Expected Retention (Calibration File)

All components were found

Tiempos de retención (min):

GF5: 10,08; GF4: 10,99; GF3: 12,42; GF: 14,67; G: 18,87; F: 21,37

ANEXO 6

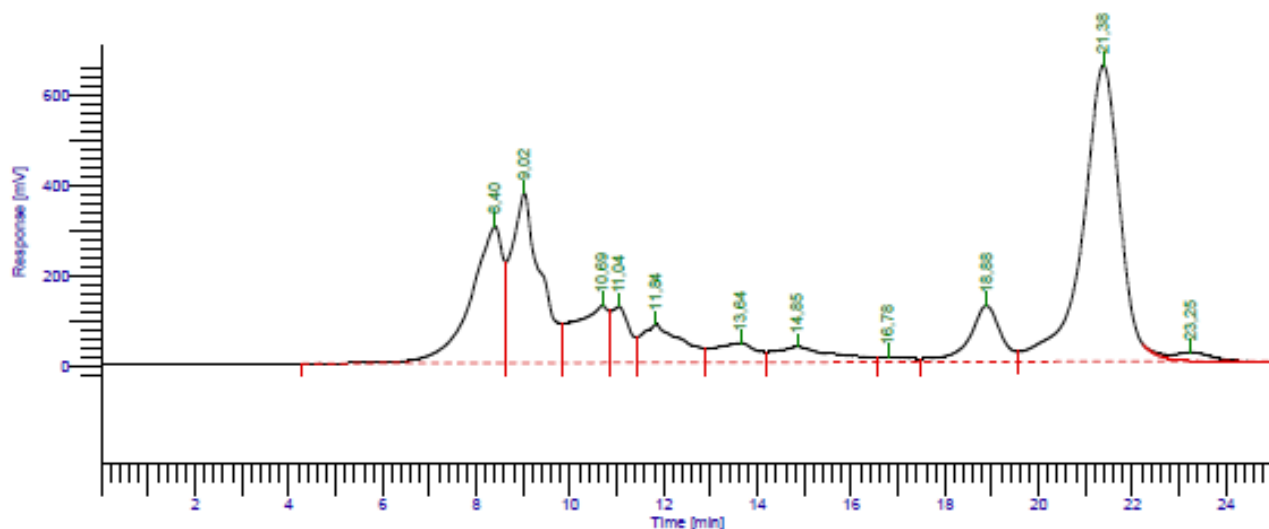
Cromatograma para la determinación de sacáridos en extracto de espárrago

Page 1 of 1

Software Version : 6.3.1.0504
 Sample Name : Esp (D1)
 Instrument Name : HPLC RI
 Rack/Vial : 0/0
 Sample Amount : 1,000000
 Cycle : 1

Date : 19-08-2011 18:33:00
 Data Acquisition Time : 19-08-2011 18:07:39
 Channel : A
 Operator : manager
 Dilution Factor : 1,000000

Result File : d:\roberto\caracterizacion muestras oligosacaridos\231_001-20110819-183248.rst
 Sequence File : C:\PenExe\TcWS\Ver6.3.1\Examples\231.seq



AZUCARES

Peak #	Component Name	Time [min]	Area [uV*sec]	Height [uV]	Area [%]	Norm. Area [%]
1		8,399	14520867,45	303259,48	15,30	15,30
2		9,025	16182974,66	377944,62	17,05	17,05
3		10,688	6353445,42	127599,47	6,69	6,69
4		11,043	3283235,90	124773,27	3,46	3,46
5		11,835	5102632,40	84835,68	5,37	5,37
6		13,638	2630147,27	43024,92	2,77	2,77
7		14,848	3037095,70	34350,62	3,20	3,20
8		16,781	491948,77	10121,71	0,52	0,52
9		18,885	5797939,08	124862,66	6,11	6,11
10		21,380	36401926,58	658392,72	38,34	38,34
11		23,247	1132731,51	18816,14	1,19	1,19
			94934944,75	1,91e+06	100,00	100,00

Missing Component Report
 Component Expected Retention (Calibration File)

All components were found

Tiempos de retención (min):

G5: 18,87; F: 21,37

ANEXO 7

Formato para la determinación de parámetros cinéticos de la inulinasa.

(A): Buffer citrato-fosfato pH 5,0, 0,05M.

(B): Preparado enzimático, extracto crudo inulinasa convenientemente diluido.

(C): Solución sustratos estándares:

Sacarosa, rafinosa e inulina: 20, 15 y 10 g/l respectivamente.

Detalle técnica experimental para determinación parámetros cinéticos

Nº muestra	Soluc (A), mL	Soluc (B), mL	Soluc (C), mL	Conc sustrato g/L
1	24	3	6	
2	18	3	12	
3	13	3	17	
4	7	3	23	
5	1	3	29	

Datos experimentales azúcares DNS

Minutos	Absorbancia DNS				
	1	2	3	4	5
0					
2					
6					
10					
15					