



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

FACULTAD DE INGENIERÍA

E.A. P. INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



UNS

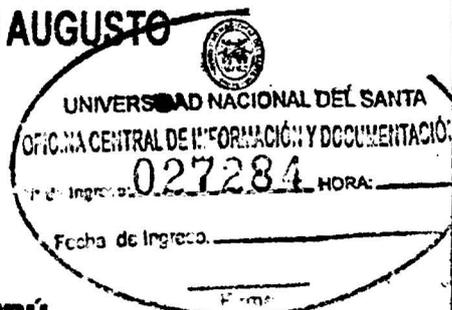
UNIVERSIDAD
NACIONAL DEL SANTA

**"MODELAMIENTO MATEMÁTICO DE LA ESTABILIDAD TÉRMICA DE
LA INULINASA DE *Kluyveromyces marxianus* FERMENTADO EN
EXTRACTO DE YACÓN (*Polymnia sanchifolia*). .**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO
AGROINDUSTRIAL**

**TESISTAS: BACH. DIESTRA BALTA JESÚS GRABIEL
BACH. MARGARITO AGUILAR LUCAS ELI**

ASESOR : DR. CASTILLO CALDERÓN AUGUSTO



NUEVO CHIMBOTE - PERÚ

2015



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL



HOJA DE CONFORMIDAD DE ASESOR

El presente trabajo de tesis titulado: “**MODELAMIENTO MATEMÁTICO DE LA ESTABILIDAD TÉRMICA DE LA INULINASA DE *Kluyeromices marxianus* FERMENTADO EN EXTRACTO DE YACÓN (*Polymnia sanchifolia*)**”. Ha contado con el asesoramiento de quien deja constancia de su aprobación. Por tal motivo, firmo el presente trabajo en calidad de Asesor. Designado por RESOLUCION DECANATURAL N° 12 – 2014 – UNS – FI.

Dr. AUGUSTO CASTILLO CALDERÓN
ASESOR



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



**“MODELAMIENTO MATEMÁTICO DE LA ESTABILIDAD
TÉRMICA DE LA INULINASA DE *Kluyveromyces marxianus*
FERMENTADO EN EXTRACTO DE YACÓN (*Polymnia
sanchifolia*)”**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERO AGROINDUSTRIAL**

TESISTAS

Bach. Jesús Grabiél Diestra Balta
Bach. Lucas Eli Margarito Aguilar

Sustentada y Aprobada el día 14 de Enero de 2015 por el siguiente
Jurado Evaluador, designado mediante Resolución Decanatural
N° 009 – 2015 – UNS – CFI:

Dr. Gilbert Rodríguez Páucar
Presidente

Dr. Augusto Castillo Calderón
Secretario

Ms. Daniel Sánchez Vaca
Integrante

DEDICATORIA

A Dios, quien siempre está presente para ayudarme a lograr mis objetivos y dirigirme por el camino justo.

A mis padres, Teodoro Margarito y Julia Aguilar, quienes fueron y son mi sustento y gracias a su apoyo incondicional hacen que alcance mis metas.

A Natalia Elena, quien es uno de mis ánimos de superación y quien hace de mis días los más maravillosos que pude imaginar, quien, gracias a su compañía y apoyo me motiva a esforzarme cada vez más en mi vida profesional.

A mis grandes amigos: Jhonatan, Jason, Jamir y Lizardo, quienes con su apoyo y momentos vividos fueron unos hermanos en los maravillosos momentos de mi vida universitaria.

Lucas

DEDICATORIA

Al Dios de la Vida, que nos impulsa
a luchar por la vida...

A mis amados padres, José Luis Diestra
Montero y Sara Luz Balta Naveda, por
su amor constante y el
acompañamiento. El logro es,
sobre todo suyo...

A las maravillosas personas,
amigos, compañeros y camaradas,
que el paso por la universidad me
trajo: Edward, Eudes, Darwin,
Eduardo y Julissa Noemí. Gracias
por todo lo compartido.

A los profesionales, héroes anónimos,
que comparten sus conocimientos con
aquellos que más lo necesitan, porque
"con ellos sufren y con ellos luchan",
gracias por acercarme a la idea de que
un mundo mejor es posible...

Jesús

AGRADECIMIENTO

A todos los docentes de la E.A.P. Ingeniería Agroindustrial por todos los conocimientos y experiencias compartidas, y de manera especial a nuestro asesor, Dr. Augusto Castillo Calderón, por su apoyo y confianza incondicional, desde las primeras ideas hasta el informe final, lo que nos ha permitido culminar con éxito esta tesis.

A la Ing. Any Berenice Córdova, quien además de su amistad, nos brindó muchos consejos, conocimientos y apoyo técnico, en aquellos interminables días de ejecución de nuestro trabajo, aceptando nuestros errores y ayudándonos a superarlos.

A la Srta. Silvia H.M., encargada de la Biblioteca Especializada de Agroindustria, quien durante los 10 ciclos académicos de nuestra formación profesional, nos ha facilitado el de uso de material bibliográfico, para el desarrollo de nuestras labores académicas y la presente investigación.

Gracias a todos nuestros compañeros y amigos de las promociones 2008 y 2009 por su ayuda incondicional y motivación para culminar satisfactoriamente este trabajo.

Los Autores

RESUMEN

Actualmente los jarabes de fructosa son producidos a partir de almidón de maíz mediante procesos enzimáticos, obteniéndose una mezcla de oligosacáridos, fructosa y glucosa. Una alternativa económica es la hidrólisis enzimática de inulina en un proceso de una etapa utilizando inulinasa, con rendimientos de hasta el 95% en producción de fructosa. La inulinasa es una enzima caracterizada por hidrolizar inulina en fructosa prácticamente pura, por ello el creciente interés por su producción, purificación y caracterización a partir de cultivos microbianos, siendo las levaduras *Kluyveromyces marxianus* las más estudiadas. El uso de inulina como materia prima para la producción de inulinasa por fermentación, se vislumbra como promisorio, por lo que la presencia de inulina en los tubérculos de yacón despierta el interés por utilizar esta raíz andina como sustrato para la producción de la enzima, como alternativa a las materias primas comerciales actuales y en el horizonte de revalorar la producción regional de este producto. El objetivo de la presente investigación fue el modelamiento matemático de la estabilidad térmica de la inulinasa, en el rango de trabajo de 48-60°C. La enzima fue obtenida de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571, en un cultivo por lotes en extracto de yacón (*Polymnia sanchifolia*) como medio complejo, y purificada por precipitación con etanol. Las actividades enzimáticas, se determinaron por mediciones de velocidad inicial sobre 20 g/L de sacarosa y 10 g/L de inulina a 55°C y pH 5.0.

Se determinó que la temperatura óptima que conduce a actividades enzimáticas superiores de 47,096 y 3,090 UI/mL es 55°C, para la enzima actuando sobre sacarosa e inulina respectivamente. Los valores de energía de activación y desactivación enzimática fueron de 10,4559 y 61,917 Kcal/mol para la reacción sobre sacarosa respectivamente y de 7,103 y 27,710 Kcal/mol para la reacción sobre inulina. Los modelos matemáticos permiten predecir la actividad enzimática con respecto a los cambios de la temperatura y el tiempo del proceso enzimático, en un amplio rango de temperatura (35-65°C). Se observó que en ambos casos la enzima fue más estable a temperaturas menores a la óptima de 55°C. Se concluyó, a partir del modelo matemático, que la temperatura de proceso debería ser 49°C para ambos casos, pues se obtienen altos valores de actividad enzimática y mayores niveles de estabilidad, en tanto que para Santos et al., (2007) el valor de la temperatura de proceso fue de 52°C.

ABSTRACT

Actually, fructose syrups are produced from corn starch by enzymatic processes to yield a mixture of oligosaccharides, fructose and glucose. An economical alternative is the enzymatic hydrolysis of inulin in a process step using a inulinase, with yields of up to 95% fructose production. Inulinase hydrolyzes inulin in almost pure fructose, so the growing interest in the production, purification and characterization from microbial cultures, yeast *Kluyveromyces marxianus* are the most studied. The use of inulin as a feedstock for the fermentative production of inulinase, is emerging as promising, so that the presence of inulin yacon tuber is attractive in order to use this Andean root as substrate for the production of the enzyme, it is an alternative to current commercial raw materials and on the horizon to reassess the regional production of this product. The objective of this research was the mathematical modeling of the thermal stability of inulinase in the working range of 48-60 ° C. The enzyme was obtained from *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571, a batch culture in yacon extract (*Smallanthus sonchifolius*) as complex medium, and purified by ethanol precipitation. Enzyme activities were determined by initial velocity measurements on 20 g / L sucrose and 10 g / L of inulin at 55 ° C and pH 5.0.

It was determined that the optimum temperature leading to higher enzyme activities of 47.096 and 3.090 IU / mL, is 55 ° C, for the enzyme acting on sucrose and inulin respectively. The activation energy values and enzyme deactivation of 10.4559 and 61.917 were Kcal / mole for the reaction of sucrose and 7,103 respectively and 27.710 kcal / mole for the reaction of inulin. Mathematical models predict the enzymatic activity with respect to changes in the temperature and time of the enzymatic process, over a wide temperature range (35-65°C) It was observed that in both cases the enzyme was more stable at temperatures below the optimum of 55 ° C. It was concluded, from the mathematical model, the process temperature should be 49 ° C for both cases, as high values of enzyme activity and higher levels of stability is obtained, while for Santos et al., (2007) the value of the process temperature was 52 ° C.

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN	11
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	
2.1. Estudio de la materia prima	14
2.1.1. Yacón	14
2.1.1.1. Descripción botánica	15
2.1.1.1.1. La Planta	16
2.1.1.1.2. El Tallo	16
2.1.1.1.3. Las Hojas	17
2.1.1.1.4. La flor	17
2.1.1.1.5. La raíz	18
2.1.1.1.6. El fruto	20
2.1.1.2. Composición química	21
2.1.1.3. Zonas de Producción	22
2.2. Inulina y Fructooligosacáridos	23
2.2.1. La Inulina	23
2.2.1.1. Características físicas y químicas de la Inulina y derivados	24
2.2.1.2. Sustratos fuente de inulina	26
2.2.2. Fructooligosacáridos	27
2.2.3. Valor nutricional de los FOS	29
2.3. Fermentación	31
2.3.1. Fermentación	
2.3.2. Cultivo por lotes	
2.4. Enzimas	32
2.4.1. Definición	32
2.4.2. Propiedades de las Enzimas	33
2.4.3. Actividad Enzimática	34
2.4.4. Tiempo de vida media	34

2.4.5.	Mecanismo de acción enzimática	34
2.4.6.	Energía de Activación	35
2.4.7.	Cinética Enzimática	36
2.4.8.	Factores influyentes en la velocidad de reacción enzimática	38
2.4.8.1.	Efecto de la temperatura	38
2.4.8.2.	Efecto del pH	39
2.4.9.	Precipitación de enzimas	40
2.5.	Estudio de la enzima Inulinasa	41
2.5.1.	Inulinasas	41
2.5.2.	Producción de Inulinasas	42
2.5.3.	Microorganismos productores de Inulinasas	44
2.5.4.	Caracterización de la Inulinasa	46
2.5.5.	Producción de inulinasas por cepas de <i>Kluyveromices marxianus</i>	49
2.5.5.1.	<i>Kluyveromices marxianus</i>	49
2.5.5.2.	Características de la cepa	49
2.5.5.3.	Producción de Inulinasa por <i>Kluyveromices marxianus</i>	49
2.5.6.	Aplicaciones de la Inulinasa	52
2.5.6.1.	Producción de jarabe de ultra alto contenido de fructosa	52
2.5.6.2.	Producción de Fructooligosacáridos a partir de inulina	53
2.5.6.3.	Producción de bioetanol	54
2.5.6.4.	Otras aplicaciones	54
2.6.	Estudio de la estabilidad enzimática	55
2.6.1.	Estructura enzimática y desnaturalización proteica	55
2.6.2.	Cinética de desactivación enzimática	58
2.6.3.	Estabilidad térmica de inulinasas	60
2.7.	Modelamiento matemático	62
2.7.1.	Modelos matemáticos para la estabilidad térmica de Inulinasas	64

III. MATERIALES Y MÉTODOS	66
3.1 Lugar de la ejecución	66
3.2. Materiales y equipos	66
3.2.1. Materia prima	66
3.2.2. Materiales	66
3.2.3. Reactivos	67
3.2.4. Equipos e instrumentos	68
3.3. Métodos de Análisis	69
3.3.1. Determinación de la Acidez	
3.3.2. Determinación del pH	
3.3.3. Determinación de cenizas	
3.3.4. Determinación de °Brix	
3.3.5. Determinación de Humedad	
3.3.6. Determinación de Azúcares Reductores	
3.3.7. Determinación de la Actividad Enzimática	
3.4. Metodología	70
3.4.1. Acondicionamiento de la materia prima	70
3.4.2. Obtención y precipitación de Inulinasa	72
3.4.2.1. Fermentación	73
3.4.2.2. Obtención del Extracto Enzimático	74
3.4.2.3. Cinética De Activación Y Desactivación Térmica	75
3.4.2.3.1. Medición de la Actividad Enzimática	76
3.4.2.3.2. Efecto de la temperatura en la actividad enzimática	76
3.4.2.3.3. Modelamiento matemático de la estabilidad térmica de la Inulinasa	77
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	80
4.1. Determinación de las características fisicoquímicas de la Materia prima	
4.2. Estudio de la actividad enzimática en el extracto crudo, enzima purificada y sobrenadante.	82

4.3. Efecto de la temperatura en la actividad enzimática	84
4.4. Cálculo de la Energía de activación enzimática	88
4.5. Cálculo de la Energía de desactivación enzimática	92
4.6. Modelamiento matemático de la estabilidad térmica de la Inulinasa	109
V. CONCLUSIONES	117
VI. RECOMENDACIONES	118
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119
ANEXOS	
ANEXO 1. Obtención del Extracto de Yacón	125
ANEXO 2. Inóculo y Fermentación por Lotes (Obtención del Caldo Crudo Enzimático)	127
ANEXO 3. Medición de la Actividad enzimática	129
ANEXO 4. Curva de Calibrado para azúcares reductores (Método DNS)	131
ANEXO 5. Concentración de la Enzima mediante la técnica de precipitación con Etanol	135
ANEXO 6. Determinación del Rango de Linealidad	136
ANEXO 7. Medición de Actividad Enzimática para determinar la Temperatura óptima sobre Sacarosa 20g/L	137
ANEXO 8. Estabilidad térmica en el tiempo y Temperatura de la enzima inulinasa actuando sobre Sacarosa (20 g/L)	138
ANEXO 9. Estabilidad térmica en el tiempo y Temperatura de la enzima inulinasa actuando sobre Inulina (10 g/L)	140
ANEXO 10. Valor de Actividad enzimática según datos experimentales, datos obtenidos del modelamiento matemático y el tiempo de vida media en el rango de temperaturas de 35-60°C	142

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Sustratos fuente de inulina_____	27
Cuadro 2: Sustratos usados para la producción de Inulinasas_____	43
Cuadro 3: Microorganismos productores de Inulinasas_____	45
Cuadro 4. Temperatura óptima y termoestabilidad de Inulinasas de diferentes fuentes_____	61
Cuadro 5. Composición de medios de cultivo para <i>K. marxianus</i> para la producción de inulinasa_____	73
Cuadro 6. Actividad enzimática del extracto crudo, enzima purificada y sobrenadante_____	82
Cuadro A1. Medición de absorbancia en curva de calibrado DNS_____	132
Cuadro A2. Determinación del Rango de Linealidad_____	136
Cuadro A3. Medición de Actividad Enzimática para determinar la Temperatura óptima_____	137

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición química de los principales constituyentes de las raíces del yacón y datos de rendimiento en tres cultivares de yacón de Cajamarca_22	
Tabla 2. Cepas de <i>Kluyeromices marxianus</i> productoras de Inulinasas y su actividad enzimática_____	50
Tabla 3. Propiedades de Inulinasas de origen microbiano_____	57
Tabla 4. Medición de la actividad enzimática_____	76
Tabla 5. Características fisicoquímicas del Yacón_____	80
Tabla 6. Ratio para la determinación de naturaleza invertasa/inulinasas_____	84
Tabla 7. Efecto de la temperatura sobre la actividad invertasa de la enzima_	85
Tabla 8. Efecto de la temperatura en la actividad inulinasas de la enzima_____	86
Tabla 9. Valores de Energía de Activación de Inulinasas actuando sobre Sacarosa (20 g/L) e Inulina (10 g/L)_____	89
Tabla 10. Valores de Av y Temperatura para cálculo de la Energía de activación de Inulinasas actuando sobre Sacarosa (20 g/L)_____	90
Tabla 11. Valores de Av y Temperatura para cálculo de la Energía de activación de Inulinasas actuando sobre inulina (10 g/L)_____	90
Tabla 12. Coeficientes de regresión para la relación entre Ln Av y (1/T) de la Inulinasas actuando sobre inulina (10 g/L)_____	91
Tabla 13. Análisis de Varianza (ANOVA) para el modelo matemático que evalúa entre Ln Av y (1/T) de la Inulinasas actuando sobre inulina (10 g/L)_____	91
Tabla 14. Valores de Energía de desactivación enzimática de Inulinasas actuando sobre sacarosa (20 g/L) e inulina (10 g/L)_____	92
Tabla 15. Medida de la Actividad enzimática residual de la Inulinasas actuando sobre sacarosa (20 g/L) en el intervalo de temperaturas de 48-60°C_____	93
Tabla 16. Valores de la constante de desnaturalización enzimática a Kd en el rango de temperaturas de 48-60°C para sacarosa_____	97
Tabla 17. Valores para el cálculo de la Constante Kd0 para la Inulinasas actuando sobre sacarosa 20 g/L_____	97
Tabla 18. Coeficientes de regresión para la relación entre Ln (Kd) y (1/T) de la Inulinasas actuando sobre sacarosa (20 g/L)_____	98

Tabla 19. Análisis de Varianza (ANOVA) para el modelo matemático que evalúa entre $\ln(K_d)$ y $(1/T)$ de la Inulinasa actuando sobre sacarosa (20 g/L)	98
Tabla 20. Medida de la Actividad enzimática residual de la Inulinasa actuando sobre inulina (10 g/L) en el intervalo de temperaturas de 48-60°C	100
Tabla 21. Valores de la constante de desnaturalización enzimática a K_d en el rango de temperaturas de 48-60°C para inulina	104
Tabla 22. Valores para el cálculo de la Constante de K_d0 para la Inulinasa actuando sobre inulina 10 g/L	104
Tabla 23. Coeficientes de regresión para la relación entre $\ln(K_d)$ y $(1/T)$ de la Inulinasa actuando sobre inulina (10 g/L)	105
Tabla 24. Análisis de Varianza (ANOVA) para el modelo matemático que evalúa entre $\ln(K_d)$ y $(1/T)$ de la Inulinasa actuando sobre inulina (10 g/L)	105
Tabla 25. Constantes obtenidas para el modelamiento matemático actuando sobre Sacarosa 20g/L	112
Tabla 26. Constantes obtenidas para el modelamiento matemático actuando sobre Inulina 10g/L	112
Tabla 27. Test de Bard para la validación del modelo matemático para la estabilidad térmica de la enzima actuando sobre sacarosa 20 g/L	115
Tabla 28. Test de Bard para la validación del modelo matemático para la estabilidad térmica de la enzima actuando sobre inulina 10 g/L	116
Tabla A1. Estabilidad térmica de Inulinasa a 48°C, actuando sobre sacarosa (20 g/L)	138
Tabla A2. Estabilidad térmica de Inulinasa a 50°C, actuando sobre sacarosa (20 g/L)	138
Tabla A3. Estabilidad térmica de Inulinasa a 53°C, actuando sobre sacarosa (20 g/L)	139
Tabla A4. Estabilidad térmica de Inulinasa a 55°C, actuando sobre sacarosa (20 g/L)	139
Tabla A5. Estabilidad térmica de Inulinasa a 60°C, actuando sobre sacarosa (20 g/L)	139

Tabla A6. Estabilidad térmica de Inulinasa a 48°C, actuando sobre inulina (10 g/L)	140
Tabla A7 Estabilidad térmica de Inulinasa a 50°C, actuando sobre inulina (10 g/L)	140
Tabla A8. Estabilidad térmica de Inulinasa a 53°C, actuando sobre inulina (10 g/L)	141
Tabla A9. Estabilidad térmica de Inulinasa a 55°C, actuando sobre inulina (10 g/L)	141
Tabla A10. Estabilidad térmica de Inulinasa a 60°C, actuando sobre inulina (10 g/L)	141
Tabla A11. Actividad determinada por el experimento, por el modelo matemático y tiempo de vida media en Sacarosa 20g/L	142
Tabla A12. Actividad determinada por el experimento, por el modelo matemático y tiempo de vida media en Inulina 10g/L	142

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Plantas de yacón en campo experimental del Cip, Lima, Perú_____	15
Figura 2: Plantas de yacón en invernaderos_____	16
Figura 3: Cortes longitudinal y transversal de la raíces de una entrada de yacón originaria de Ancash_____	19
Figura 4: Estructura química de los fructanos_____	29
Figura 5: Efectos sobre la salud asociados al consumo de FOS_____	30
Figura 6. Mecanismo de acción enzimática_____	34
Figura 7. Velocidad de reacción enzimática en función de la concentración de sustrato_____	37
Figura 8. Proceso de desnaturalización de las proteínas_____	56
Figura 9. Acondicionamiento de la materia prima_____	70
Figura 10. Extracto de yacón_____	71
Figura 11. Obtención y precipitación de inulinasa_____	72
Figura 12. Diseño Experimental para el modelamiento matemático de la estabilidad térmica de la Inulinasa_____	75
Figura 13. Análisis Físicoquímico del extracto de Yacón._____	81
Figura 14. Efecto de la temperatura en la actividad invertasa de la enzima__	85
Figura 15. Efecto de la temperatura en la actividad inulinasa de la enzima__	86
Figura 16. Cálculo de la Energía de Activación de Inulinasa actuando sobre sacarosa (20 g/L)_____	89
Figura 17. Cálculo de la Energía de Activación de Inulinasa actuando sobre inulina (10 g/L)_____	89
Figura 18. Estabilidad térmica de Inulinasa actuando sobre sacarosa (20 g/L)_____	93
Figura 19. Estabilidad térmica de Inulinasa a 48°C, actuando sobre sacarosa (20 g/L)_____	94
Figura 20. Estabilidad térmica de Inulinasa a 50°C, actuando sobre sacarosa (20 g/L)_____	94

Figura 21. Estabilidad térmica de Inulinasa a 53°C, actuando sobre sacarosa (20 g/L)	95
Figura 22. Estabilidad térmica de Inulinasa a 55°C, actuando sobre sacarosa (20 g/L)	95
Figura 23. Estabilidad térmica de Inulinasa a 60°C, actuando sobre sacarosa (20 g/L)	96
Figura 24. Cálculo de la Constante.Kd0 para la Inulinasa actuando sobre sacarosa (20g/L)	98
Figura 25. Estabilidad térmica de Inulinasa actuando sobre inulina (10 g/L)	100
Figura 26. Estabilidad térmica de Inulinasa a 48°C, actuando sobre inulina (10 g/L)	101
Figura 27. Estabilidad térmica de Inulinasa a 50°C, actuando sobre inulina (10 g/L)	101
Figura 28. Estabilidad térmica de Inulinasa a 53°C, actuando sobre inulina (10 g/L)	102
Figura 29. Estabilidad térmica de Inulinasa a 55°C, actuando sobre inulina (10 g/L)	103
Figura 30. Estabilidad térmica de Inulinasa a 53°C, actuando sobre inulina (10 g/L)	103
Figura 31. Cálculo de la Constante Kd0	105
Figura 32. Estimación de la temperatura de proceso para la actividad enzimática actuando sobre Sacarosa 20g/L, usando la actividad relativa y el tiempo de vida media relativo	113
Figura 33. Estimación de la temperatura de proceso para la actividad enzimática actuando sobre Inulina 10g/L, usando la actividad relativa y el tiempo de vida media relativo	113

I. INTRODUCCIÓN

Las inulinasas son 2,1-B-D-fructano furohidrolasas (E.C. 3.2.1.7) que catalizan la hidrólisis de inulina produciendo inulooligosacáridos, fructosa y glucosa como productos principales (Neagu y Bahrim, 2011).

Las inulinasas encuentran aplicación en la producción de jarabes con una alta concentración de fructosa, adquiriendo gran importancia como agentes responsables de la dulzura en alimentos y bebidas (Poorna y Kulkarni, 1995).

Los jarabes de fructosa pueden ser producidos a partir de almidón de maíz por métodos enzimáticos, con la participación de alfa amilasa, amiloglucosidasa y glucosa isomerasa, con lo cual se obtiene un producto consistente de oligosacáridos (8%), fructosa (45%) y glucosa (50%). La separación de glucosa del jarabe de maíz con alta concentración de glucosa es costoso y convierte en poco rentable este método. La fructosa también puede ser obtenida por hidrólisis ácida de inulina, pero la fructosa es fácilmente degradada a bajo pH y el proceso subproductos como anhídridos de difructosa. Una alternativa rápida, directa, económica podría ser la hidrólisis enzimática de inulina. El método incluye fuentes microbianas que secretan altas cantidades de inulinasa y pueden producir fructosa a partir de inulina por un simple paso de una reacción catalizada por la enzima y con rendimientos de hasta el 95% (Chi *et al.*, 2011).

De ahí el interés por producir Inulinasa, purificarla y caracterizarla a partir de cultivos microbianos en medios sintéticos y complejos de extractos de vegetales, siendo las levaduras *Kluyveromices* las más estudiadas (Castillo y Chamy, 2010; Gazetta *et al.*, 2005;). La presencia de inulina en tubérculos de yacón (*Polymnia sonchifolia*) aumenta el interés de estudiar este vegetal como sustrato para el

crecimiento de microorganismos que usen este polisacárido para producir Inulinasa (Cazetta *et al.*, 2005).

Por lo expuesto es necesario aportar avances sobre la cinética de la fermentación de *Kluyveromices marxianus*, siendo de interés el modo de cultivo por lotes sobre extracto de yacón como fuente vegetal nacional (Castillo, 2009).

Sin embargo, los mayores problemas asociados con la aplicación industrial de Inulinasas para la producción de fructosa son: la limitada solubilidad de la inulina a temperatura ambiente y las probabilidades de contaminación microbiana a esta temperatura. Por ello, los procesos industriales para la producción de fructosa y Fructooligosacáridos se realizan a una temperatura promedio de 60°C. Los reportes de investigación refieren que las Inulinasas reducen su actividad enzimática después de pocas horas a esta temperatura y requieren reposición del biocatalizador para continuar con el proceso, encareciendo los costos del mismo (Dhiman, 2013).

En los últimos años se ha incrementado el interés por la búsqueda de las mejores condiciones de operación para la producción de fructosa mediante la hidrólisis de inulina y utilizando inulinasas. Sin embargo, no se han realizado trabajos integrales que abarquen un amplio rango de valores para los parámetros de proceso. El conocimiento de la cinética de reacción y velocidad de desactivación enzimática y su efecto global sobre el progreso de la reacción, podría ser muy útil para el desarrollo de las potencialidades de producción de fructosa a partir de la hidrólisis enzimática de inulina (Ricca *et al.*, 2009).

En este trabajo se planteó como problema ¿Será posible describir la estabilidad térmica de la Inulinasa producida por la levadura *Kluyveromices marxianus* NRRL- Y7571 fermentado en extracto de Yacón (*Polymnia sanchifolia*) mediante un modelo matemático obtenido a partir de constantes y parámetros cinéticos Y la hipótesis de que es si es posible describir la estabilidad térmica de la Inulinasa producida por la levadura *Kluyveromices marxianus* NRRL- Y7571 fermentado en extracto de Yacón (*Polymnia sanchifolia*) mediante un modelo matemático obtenido a partir de constantes y parámetros cinéticos

El presente trabajo de investigación se propuso describir la estabilidad térmica de la Inulinasa de *Kluyveromices marxianus* fermentado en extracto de yacón (*Polymnia sanchifolia*) utilizando un modelo matemático, basado en parámetros y constantes cinéticas, teniendo como objetivos específicos los siguientes:

- Obtener la Inulinasa soluble a partir de la fermentación de *Kluyveromices marxianus* NRRL- Y7571 sobre extracto de yacón en un cultivo por lotes.
- Concentrar con etanol la enzima soluble obtenida de la fermentación.
- Determinar las energías de activación (E_a) de las actividades de Inulinasa sobre sacarosa 20g/L e inulina 10g//L.
- Determinar la estabilidad térmica de la Inulinasa en el rango de 48-60°C.
- Determinar las energías de desactivación (E_d) de la actividad de Inulinasa sobre sacarosa e inulina.
- Evaluar el tiempo de vida media de la enzima soluble en el rango de temperaturas de 48-60°C.
- Determinar experimentalmente el valor de los parámetros y constantes cinéticas para la enzima estudiada.
- Obtener el valor de temperatura de proceso de un reactor enzimático en base al modelamiento matemático.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Estudio de la materia prima

2.1.1. Yacón

El yacón (*Polymnia sanchifolia*) es una especie originaria de la región andina de Suramérica, pertenece a la familia de las Asteraceae (compuestas), Orden Asterales, Subclase Asteridae y representa un cultivo tradicional de la población originaria del Perú. En los Andes se cultiva a una altitud de 880 a 3500 msnm.

El yacón es una planta domesticada hace varios siglos por los pobladores de las culturas preincaicas. Hasta hace poco tiempo se cultivaba sólo en los jardines y huertos caseros de la serranía para el autoconsumo y para el consumo ocasional en festividades religiosas especiales.

Sin embargo, debido a que recientemente se han empezado a descubrir y difundir algunas de sus propiedades promisorias, se ha generado en la población un creciente interés por este producto. Es así cómo, desde hace un par de años, el yacón ha empezado a llegar a los mercados urbanos, incluyendo las principales cadenas de supermercados (Seminario *et al.*, 2003).

Las plantas de este cultivo producen un tipo especial de raíz (conocida con el nombre de yacón) la cual tiene una característica particular: se come en forma fresca (o sea cruda) a pesar de ser una raíz como el camote o la yuca. El yacón tiene un agradable sabor dulce y deja una sensación refrescante después de consumirlo, razón por la cual el habitante andino lo considera una fruta. Esta cualidad se debe a que el yacón, a diferencia de la mayoría de tubérculos y raíces que almacenan sus carbohidratos en forma de almidón, almacena principalmente fructooligosacáridos (FOS), un tipo especial de azúcares con atributos enormemente beneficiosos para la salud humana. Los FOS no pueden ser digeridos directamente por el

organismo humano debido a que carecemos de las enzimas necesarias para su metabolismo. Esto significa que los FOS son azúcares que tienen pocas calorías y no elevan el nivel de glucosa en la sangre. Estas propiedades han convertido al yacón en un recurso potencialmente importante para el mercado de productos dietéticos y de personas que padecen diabetes (Seminario *et al.*, 2003).



Figura 1. Plantas de yacón en campo experimental del Cip, Lima, Perú
(Manrique *et al.*, 2005)

2.1.1.1. Descripción botánica

El hábitat natural del yacón es la zona de los Andes comprendida entre los 800 y 2800 m.s.n.m., en latitudes tropicales (0-24° S) y regímenes de temperatura característicos de climas templados y subtropicales. Sin embargo, debido a su gran capacidad adaptativa y aparente insensibilidad al fotoperiodo, se cultiva también en muchas otras partes del mundo: Brasil, China, Corea, Estados Unidos, Italia, Japón, Nueva Zelanda, República Checa, Rusia y Taiwán. La prolongada duración del cultivo, superior a 180 días, y su susceptibilidad a heladas, que destruyen las partes aéreas de la planta, limitan su distribución latitudinal y altitudinal (Manrique *et al.*, 2005)



Figura 2. Plantas de yacón en invernaderos

(Seminario *et al.*, 2003)

2.1.1.1.1. La Planta

La planta de yacón es herbácea perenne, mide de 1.5 a 3 m de alto. Si proviene de semilla, consta de un solo tallo principal, a veces ramificado desde la base, otras veces, solo con ramas pequeñas en la parte superior. Si la planta proviene de propagilo o semilla vegetativa, consta de varios tallos (Seminario *et al.*, 2003).

2.1.1.1.2. El Tallo

El tallo presenta las siguientes características:

- Es cilíndrico y vigoroso, con nudos, huecos y abundante pubescencia. Al término de la etapa de crecimiento se ramifica en 6-8 tallos.

Presenta marcas de coloración morada.

- Alcanza de 0.9-1.5 m de longitud.
- Los tallos aéreos son anuales y se secan una vez terminada la floración, mientras que la parte subterránea es perenne. Estos consisten en un tronco que puede ser voluminoso y del cual se ramifican numerosas raíces, algunos engrosan y pueden pesar de 100-500 gr.

- Cuando el tallo crece deja visibles las yemas a partir de las cuales se forman las hojas de forma opuesta, las prolongaciones foliares son delgadas y presentan formaciones lobuladas en la orilla, además forman una línea recta delante y al lado del peciolo (Soto R., 1998)

2.1.1.1.3. Las Hojas

Las hojas son opuestas, con láminas decurrentes hacia el peciolo. La lámina foliar es anchamente obovada con la base hastada, auriculada o connada.

Las hojas superiores son obovado lanceoladas, el haz de la hoja es piloso y el envés pubescente.

Hasta la floración en cada tallo se producen de 13 a 16 pares de hojas, que después de la floración solo son hojas pequeñas.

Los tricomas glandulares son cortos y pluricelulares, con dos series de células. El mesófilo es dorsiventral y una nervadura central posee varios paquetes colaterales en posición céntrica (Seminario *et al.*, 2003).

2.1.1.1.4. La flor

La rama floral es terminal de ramificación dicásica, compuesta de inflorescencias denominadas capítulos o cabezuelas. Cada rama floral puede producir hasta 80 capítulos. Cada capítulo está formado por flores femeninas (14-16) y flores masculinas (80-90). Los capítulos son amarillos o anaranjados, con cerca de 15 flores liguladas. Las flores liguladas son femeninas, 2-3 dentadas, de hasta 12 mm de largo y 7 mm de ancho. Las flores tubulares son masculinas, con cerca de 7 mm de largo. El desarrollo floral del yacón es reducido en comparación con las formas silvestres.

Es fuertemente dependiente de las condiciones ambientales y es diferente en las distintas áreas en las que se cultiva. En condiciones favorables de cultivo, la floración comienza después de 6-7 semanas y

alcanza su punto máximo después de 8-9 meses. Se asume que el yacón presenta polinización cruzada.

La polinización mostró que la producción de semillas en flores con polinización abierta es el doble que en flores encapsuladas. La producción de semillas es bastante baja probablemente por la esterilidad del polen o el desequilibrio en el metabolismo, debido a que la planta debe suministrar recursos energéticos para el desarrollo de un elevado número de flores y, al mismo tiempo, para el de las raíces de almacenaje.

Evidencia de ello es el mayor número de semillas formadas en las flores que se desarrollan primero. Una de las posibles razones es la latencia física de las semillas debido a la dureza de la testa.

El crecimiento de las plantas producidas por semillas es más lento que el que muestran las plantas vegetativamente reproducidas. Las flores del yacón pueden ser producidas artificialmente a través de injertos en girasol (Soto R., 1998).

2.1.1.1.5. La raíz

El sistema radicular es muy ramificado y presenta raíces de absorción así como raíces carnosas y tuberosas de almacenaje. Las raíces de almacenaje se forman a partir de un sistema ramificado de ejes subterráneos; son mayoritariamente napiformes.

Está constituida por un sistema subterráneo engrosado de naturaleza mixta representado por rizóforos y raíces.

Todo el sistema radicular está formado por raíces adventicias, algunas permanecen delgadas y otras sufren tuberización. El sistema subterráneo está constituido por tres partes:

- Los rizomas o rizoforos, formados por el engrosamiento de la parte alta del tallo que está debajo del suelo. Almacenan azúcares simples y fructooligosacáridos, y son ricos en fibras duras no digeribles. Contienen yemas que dan origen a nuevas plantas.
- Las raíces fibrosas o delgadas cuya función es la fijación de la planta al suelo y la absorción de agua y nutrientes.

- Las raíces reservantes o tuberosas que son la parte comestible.

Estudios sobre la morfología y anatomía del sistema subterráneo del yacón, concluyeron que las raíces del sistema son de naturaleza heterogénea. Los rizoforos y raíces presentaron conductos secretores de lípidos en las capas internas de la corteza, que se deriva del endodermo.

Por otro lado, el engrosamiento de la raíz se debe a un incremento en la actividad del cambium vascular que se ubica entre el floema y xilema (Soto R., 1998).

Las raíces reservantes tienen una apariencia bastante semejante a las raíces reservantes del camote.

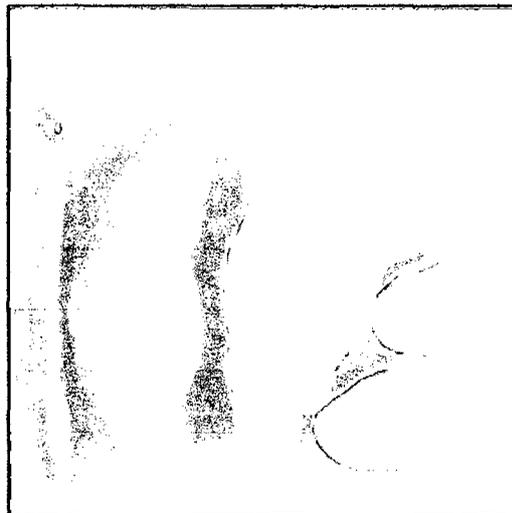


Figura 3. Cortes longitudinal y transversal de la raíces de una entrada de yacón originaria de Ancash. (Seminario *et al.*, 2003)

Diferentes factores –como la variedad, el tipo de suelo, la localidad, entre otros– pueden influenciar en la forma y el tamaño de las raíces. Su peso puede fluctuar fácilmente entre los 50 y 1000 gramos, pero mayormente lo hacen entre los 300 y 600 gramos. Bajo un sistema de producción poco tecnificado, una planta produce entre 2 y 4 Kg de raíces reservantes. Sin embargo, con abonamiento y un adecuado manejo agronómico, el peso por planta puede llegar cerca a los 6 Kg (Amaya, 2002).

El patrón de crecimiento secundario de la raíz, el cual determina su engrosamiento, es muy similar al de las plantas dicotiledóneas. Se produce por un incremento en la actividad del cambium vascular que se ubica entre el xilema y el floema. Este cambium vascular consiste inicialmente de franjas separadas, formadas por la división de células entre el xilema primario y el floema primario. Posteriormente, las franjas se juntan y encierran al xilema primario. Las células producidas por este cambium se dividen y expanden simultáneamente durante todo su desarrollo, a la vez que almacenan reservas. Las células que más se dividen y crecen son las del parénquima del xilema. Por ello, el tejido xilemático ocupa la mayor parte de la raíz. Hacia el exterior, se encuentran el anillo cambial, la corteza y la epidermis (Seminario *et al.*, 2003).

2.1.1.1.6. El fruto

El fruto es un aquenio, que procede de un ovario ínfero con más de un carpelo. El pericarpio es delgado y seco a la madurez, externamente presenta estrías longitudinales que forman surcos paralelos. La semilla se encuentra unida al pericarpio solamente por el funículo (unión del saco embrionario con el ovario). El aquenio es piramidal con ángulos no bien definidos y redondeados, de ápice truncado y base ensanchada, en la cual lleva una pequeña cicatriz (en la unión con el receptáculo floral). En promedio, mide alrededor de 3.7 mm de largo y 2.2 mm de ancho. Cien aquenios pesan entre 0.6 a 1.2 g. La semilla es exalbuminosa, en ella, el albumen o endospermo ha desaparecido y

todas las sustancias de reserva se concentran en los cotiledones. Por ello, éstos son más prominentes y ocupan el mayor espacio en la semilla, en cambio el embrión es una masa de células no diferenciadas. La semilla está cubierta por una testa de capa simple, al interior está recorrida por tejido vascular muy ramificado, de células irregulares, compactas, donde no se notan los espacios intercelulares (Seminario *et al.*, 2003).

2.1.1.2. Composición química

Entre 85 a 90% del peso fresco de las raíces de yacón se encuentra en forma de agua. A diferencia de la mayoría de raíces comestibles, el yacón no almacena almidón, sino que acumula sus carbohidratos en forma de fructooligosacáridos (FOS) y azúcares libres (fructosa, glucosa y sacarosa) (Manrique *et al.*, 2005).

Aunque la proporción de cada azúcar puede variar mucho, se puede considerar la siguiente composición (en base seca): FOS 40 a 70%, sacarosa 5 a 15%, fructosa 5 a 15% y glucosa menos del 5%. Las proteínas y los lípidos se encuentran en pequeñas cantidades, representando de 2.4 a 4.3% y 0.14 a 0.43% del peso de la materia seca, respectivamente (Hermann *et al.*, 1999).

El mineral más abundante es el potasio, en promedio 230 mg/100 g de materia fresca comestible. En mucho menor cantidad se encuentran el calcio, fósforo, magnesio, sodio y hierro (Manrique *et al.*, 2005).

Tabla 1: Composición química de los principales constituyentes de las raíces del yacón y datos de rendimiento en tres cultivares de yacón de Cajamarca.

Variable	SAL136	AKW5075	ARB5073
Materia seca (g)	136	98	115
Carbohidratos totales (g)	127	89	105
FOS (g)	89	31	61
Glucosa libre (g)	2.8	2.3	4.5
Fructosa libre (g)	4.6	21.1	7.5
Sacarosa libre (g)	12	19	14
Proteínas (g)	3.3	3.5	4.9
Lípidos (mg)	191	289	311
Fibra (g)	3.6	3.5	3.7
Potasio (mg)	23	84	10

Hermann *et al.*, 1999

2.1.1.3. Zonas de Producción

Los principales nichos de producción en el Perú se encuentran en: Amazonas (Utcubamba, Bongará, Chachapoyas); Ancash (Huaraz, Caraz, Yungay); Apurímac (Andahuaylas y Abancay); Arequipa (Arequipa); Ayacucho (Huamanga, Huanta); Cajamarca (Cajamarca, Contumazá, San Marcos, San Ignacio y Jaén); Cerro de Pasco (Oxapampa); Cusco (Urubamba, Cusco, Calca, Paucartambo, La Convención); Huánuco (Huánuco); Junín (Huancayo, Concepción, Jauja y Tarma); La Libertad (Otuzco, Santiago de Chuco, Sánchez Carrión); Lambayeque (Incahuasi); Lima (Pachacamac y Yauyos); Piura (Ayabaca y Huancabamba) y, Puno (Sandía y Carabaya). De todos estos nichos de producción, los que más destacan son Cajamarca, Puno, Oxapampa, Huánuco, Ancash y Junín.

Las estadísticas oficiales de áreas de siembra de yacón en el Perú son muy escasas. En las últimas tres décadas el área de siembra anual de yacón fue mucho menor a 100 ha en todo el país, según las estadísticas oficiales del ministerio de agricultura. Es a partir del año 2000 que la siembra comercial de yacón comienza a incrementarse en diferentes regiones del Perú (Seminario *et al.*, 2003).

En el Primer Curso Nacional de Yacón celebrado en Cajamarca en agosto del 2002, se estimó en no menos de 600 ha la superficie sembrada de yacón en las principales zonas de producción. Probablemente dicha cifra se multiplique rápidamente en muy poco tiempo debido a la enorme expectativa que existe entre los productores (Seminario *et al.*, 2003).

2.2. Inulina y Fructooligosacáridos

2.2.1 La Inulina

La inulina es un carbohidrato de reserva energética, presente principalmente en raíces y tubérculos de alcachofa de Jerusalén, achicoria, diente de león, bardanas y dalia. Está constituida por cadenas lineales de fructosa unidas por enlaces B-2,1 y terminadas en un residuo de glucosa a través de un enlace de tipo sacarosa en el extremo reductor (Vandame y Dericke, 1983).

Después del almidón, los fructanos son los polisacáridos no estructurales más abundantes en la naturaleza, presentes en muchas especies de plantas, en hongos del tipo *Aspergillus sp.* y en bacterias, en las cuales prevalece el fructano del tipo levano (enlace β -(6 \rightarrow 2) fructosil-fructosa) (Franck y Leenheer, 2004).

La inulina se encuentra en un gran número de plantas de las familias Liliaceae (ajo, cebolla espárrago, ajoporro) y Compositae (achicoria,

pataca o tupinambo y yacón y Gramíneas. La inulina es usualmente almacenada en órganos tales como bulbos, tubérculos y raíces tuberosas (Chi *et al.*, 2011).

Las dos especies mayormente utilizada por la industria para la producción de inulina son la alcachofa de Jerusalén (*Helianthus tuberosus*) y la achicoria (*Cichorium intybus*) (Leroy *et al.*, 2010).

Recientemente, la inulina ha recibido atención como una materia abundante y barata para la producción de fructosa y Fructooligosacáridos, los cuales son ampliamente utilizados en la industria farmacéutica y la industria alimentaria (Vandamme y Derycke, 1983).

Así mismo 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 (Castillo y Chamy, 2010).

2.2.1.1. Características físicas y químicas de la Inulina y derivados

Los fructanos por su configuración química no pueden ser hidrolizados por las enzimas digestivas del hombre y de animales, por lo que permanecen intactos en su recorrido por la parte superior del tracto gastrointestinal, pero son hidrolizados y fermentados en su totalidad por las bacterias de la parte inferior del tracto gastrointestinal (intestino grueso-colon). De esta manera este tipo de compuestos se comportan como fibra dietética. Los fructanos aportan carbohidratos digeribles (4 kcal/g) (Roberfroid, 1999).

A nivel industrial, la inulina se presenta como un polvo blanco, sin olor, con sabor neutral y sin efecto residual, pero oligofruktosa además de su presentación en polvo se consigue como jarabe viscoso (75% de materia seca), ambos incoloros (Roberfroid, 2005).

El grado de polimerización (DP) de la inulina depende de varios factores, tales como la fuente vegetal, el clima y las condiciones de cultivo, el índice de madurez y el tiempo de almacenamiento postcosecha (Chi *et al.*, 2011).

La inulina nativa, a diferencia de la inulina HP o de alta pureza, contiene azúcares libres (glucosa, fructosa, sacarosa), lo que le confiere cierto dulzor (10% del dulzor de la sacarosa). La inulina HP presenta menor solubilidad que la inulina nativa, debido a la casi total ausencia de azúcares libres (0,5 % de materia seca).

La viscosidad de la oligofruktosa a 10°C en solución acuosa al 5% p/p, es la menor de los fructanos y es una característica clave para la formación de geles y su uso como un sustituto de grasas (Franck y Leenheer., 2004).

La inulina también mejora la estabilidad de emulsiones y espumas, por lo que se usa como estabilizante en diversos productos alimenticios (helados, salsas, untables, postres cremosos, etc.). Se observa una sinergia entre la inulina y otros agentes gelantes como la gelatina, alginatos, carraginos, gomas y maltodextrinas (Roberfroid, 2005).

En general, la inulina HP presenta mejores niveles de desempeño que la inulina nativa, en relación a todas las propiedades mencionadas. Con respecto a la oligofruktosa, tiene mayor solubilidad y dulzor, así como un efecto sinérgico con edulcorantes como el acesulfame K- aspartame, con mejoras en el efecto residual.

La oligofruktosa es estable a altas temperaturas, con propiedades humectantes, reduce la actividad de agua y por tanto propicia la estabilidad microbiológica y afecta los puntos de fusión y ebullición, adicionalmente. La oligofruktosa posee propiedades tecnológicas similares a la sacarosa y al jarabe de glucosa (Roberfroid, 2005).

A pH menores de 4, los enlaces tipo β de las unidades de fructosa, tanto en la inulina como la oligofruktosa, se hidrolizan con la consecuente formación de fructosa. Por esta razón, estos compuestos no pueden ser usados en alimentos muy ácidos (Franck y Leenheer., 2004).

Así mismo, la inulina es fácilmente disuelta en agua caliente, y las soluciones altamente concentradas de inulina, tienen baja viscosidad. Por lo que, se le considera una materia prima más adecuada que el almidón, para la producción de jarabe de fructosa (Chi *et al.*, 2011).

2.2.1.2. Sustratos fuente 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 (Castillo y Chamy., 2010).

La inulina se encuentra en muchas plantas como la cebolla, el ajo y el plátano, pero en mayores cantidades en especies como el topinambur (*Helianthus tuberosus*), la achicoria (*Cichorium intybus*) y la dalia (*Dahlia sp.*), como se muestra en el Cuadro 1. Los FOS se encuentran también en estas plantas, pero en cantidades pequeña. El yacón es quizás la planta con mayor contenido de FOS (Seminario *et al.*, 2003).

Cuadro 1: Sustratos fuente de inulina

Nombre común	Nombre científico	Órgano utilizado	Fructano predominante	% en materia comestible
Achicoria	<i>Cichorium intybus</i>	Raíz	Inulina	16-20
Topinanbur	<i>Helianthus tuberosus</i>	Tubérculo	Inulina	15-20
Dalia	<i>Dahlia sp.</i>	Rizoma	Inulina	6-14
Yacón	<i>Smallanthus sanchifolius</i>	Raíz	Inulina	9-12
Ajo	<i>Allium sativum</i>	Bulbo	Inulina	9-11
Cebolla	<i>Allium cepa</i>	Bulbo	Inulina	2-6
Espárrago	<i>Asparagus officinalis</i>	Turión	Inulina	2-3
Trigo	<i>Triticum durum</i>	Grano	Inulina	1-6
Plátano	<i>Musa sp.</i>	Fruto	Inulina	0.3-0.7

Seminario *et al.*, 2003

2.2.2. Fructooligosacáridos

Los FOS son azúcares de reserva que existen en varias especies de plantas, pero es en el yacón donde se encuentran en mayores cantidades. La característica principal en su estructura química es que están constituidos por una molécula de glucosa ligada a un número variable –entre 2 a 10– de moléculas de fructosa. Los enlaces que mantienen unidas las moléculas de fructosa resisten la hidrólisis de las enzimas digestivas humanas y por ello los FOS alcanzan el colon, última porción del intestino grueso, sin sufrir ninguna modificación química. Esta es la razón por la que los FOS tienen una baja contribución calórica en el organismo humano (25 a 35% de las calorías que poseen la mayoría de carbohidratos) (Manrique *et al.*, 2005).

Los fructooligosacáridos (FOS), también conocidos como oligofructanos u oligofructosa, pertenecen a una clase particular de azúcares conocidos con el nombre de fructanos. La estructura fundamental de los fructanos es un esqueleto de unidades de fructosa unidas entre sí por enlaces glucosídicos β (2 \rightarrow 1) y/o β (2 \rightarrow 6). Es frecuente encontrar, adicionalmente, una molécula de glucosa al inicio de la cadena de cada fructano (Niness, 1999).

Existen diversos tipos de fructanos en la naturaleza, pero desde un punto de vista nutricional y de uso en la industria alimentaria se reconocen a los FOS y a la inulina como los más importantes (Seminario *et al.*, 2003).

La inulina y los FOS no tienen una composición química definida ya que ambos son, en realidad, una mezcla de fructanos de diferente tamaño. Debido a que las moléculas de fructosa se unen exclusivamente por enlaces β (2 \rightarrow 1), estos fructanos adquieren una conformación espacial semejante a cadenas lineales. La diferencia entre los FOS y la inulina radica en el número de moléculas de fructosa que tienen estas cadenas. En la inulina, este número varía entre 2 y 60, mientras que en los FOS, que tienen cadenas más pequeñas, el número varía entre 2 y 10 (Niness, 1999).

A los FOS se les puede considerar como un subgrupo de la inulina. Por este motivo algunos autores prefieren emplear el término Fructooligosacáridos del tipo inulina para referirse con mayor precisión a la naturaleza de los azúcares presentes en el yacón (Goto *et al.* 1995).

La estructura química de los fructanos puede observarse en la Fig. 4.

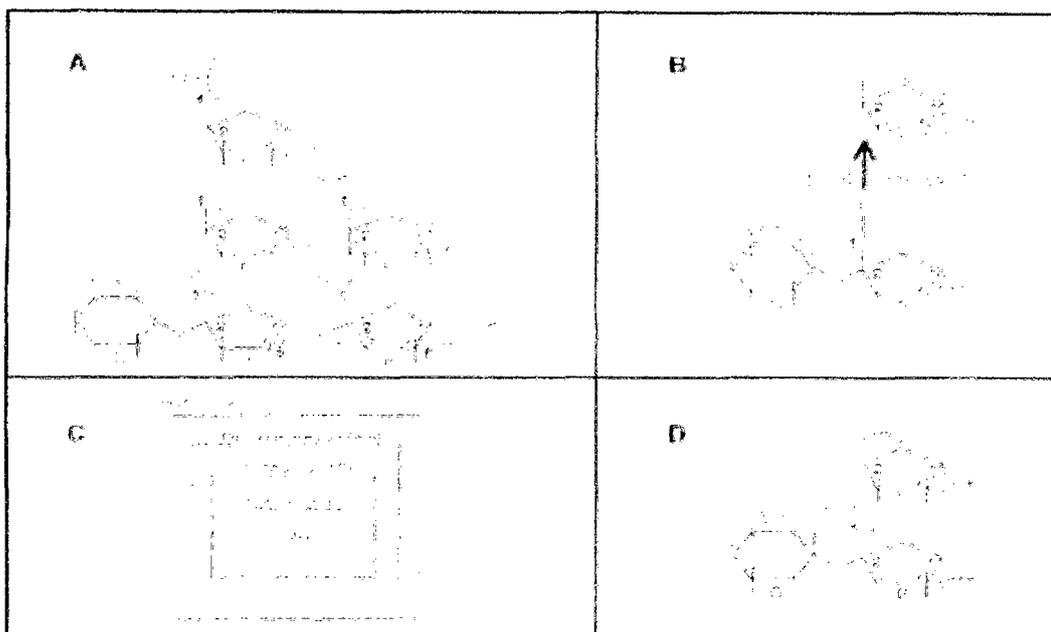


Figura 4: Estructura química de los fructanos. (Seminario *et al.*, 2003)

2.2.3. Valor nutricional de los FOS

En el colon, los FOS del yacón son completamente fermentados por los probióticos (Pedreschi *et al.* 2003), un grupo de bacterias benéficas que forman parte de la microflora intestinal. Estas bacterias (en particular algunas especies de los géneros *Bifidus* y *Lactobacillus*) contribuyen a mejorar la función gastrointestinal y aliviar diferentes desórdenes digestivos.

Además, los FOS son reconocidos como un tipo de fibras solubles que generan varios efectos favorables en la digestión: aumentan el peristaltismo, reducen el tiempo del tránsito intestinal, contribuyen a que el bolo alimenticio retenga más agua y tienen un efecto osmótico asociado a una respuesta laxante. Estos efectos pueden contribuir a prevenir y controlar el estreñimiento (Chen *et al.* 2000).

La fermentación de los FOS en el colon ha sido asociada a otros efectos favorables en la salud: fortalecimiento de la respuesta inmune,

mejora en la asimilación de calcio, reducción en el nivel de colesterol y triglicéridos e inhibición de la producción de toxinas y sustancias pro cancerígenas en el colon. Sin embargo, estos efectos han sido observados mayoritariamente en animales de laboratorio, por lo que es necesario conducir estudios clínicos en humanos para determinar su verdadero efecto en la salud (Manrique *et al.*, 2005).

Los beneficios del consumo de FOS, en la salud, pueden observarse en la Figura 5.

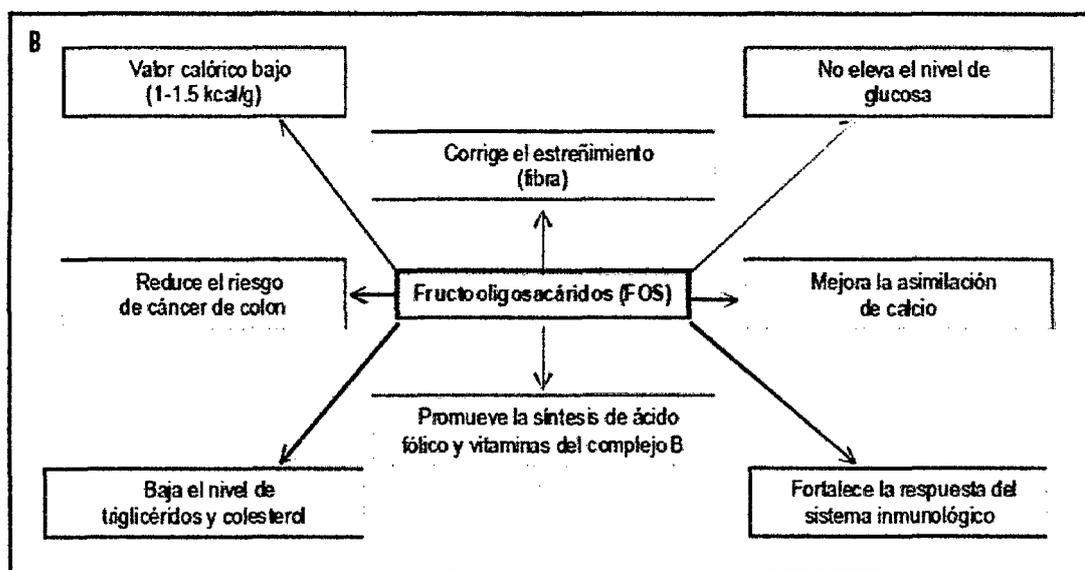


Figura 5. Efectos sobre la salud asociados al consumo de FOS

(Manrique *et al.*, 2005)

2.3. Fermentación

2.3.1. Fermentación

La fermentación es un proceso de biotransformación de materia orgánica por la acción de células (de microorganismos o de animales) en sustancias químicas llamadas metabolitos, llevadas 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.

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 (McBee y Temple, 1994).

2.3.2. Cultivo por lotes

El cultivo por lote es una modalidad de fermentación microbiana, donde todos los compuestos nutrientes y microorganismos se cargan al bioreactor desde el inicio y luego ya no hay más entrada de nutrientes ni salida de productos, con excepción del aire estéril que ingresa y gases de salida de la fermentación. El bioreactor puede ser desde un simple matraz Erlenmeyer hasta un tanque agitado con todos sus dispositivos de control automático de variables (Castillo, 2009).

027284

2.4. Enzimas

2.4.1. Definición

Las enzimas son catalizadores biológicos que permiten que las reacciones metabólicas ocurran a gran velocidad en condiciones compatibles con la vida. (Harper, 2003).

En las células, la actividad secuencial de muchas enzimas permite que las moléculas se degraden, o bien se formen moléculas de mayor tamaño a partir de moléculas sencillas. Desde el punto de vista químico, las enzimas son proteínas globulares, algunas de ellas con estructura cuaternaria. Para cumplir su función requieren conservar su estructura nativa en la que se destaca una región formada por un número reducido de residuos aminoacídicos que poseen afinidad por los compuestos que intervienen en la reacción. (Cunningham y López, 1994).

Ese lugar se llama sitio activo, y en él se desarrolla la reacción. El estudio de las enzimas y su actividad ha sido importante para conocer los distintos pasos de las vías metabólicas y su regulación, para detectar enfermedades, pero también desde un punto de vista práctico para elaborar productos útiles a nivel alimenticio, medicinal, industrial o farmacéutico. Son ejemplos de utilización del conocimiento de la actividad de las enzimas el empleo de renina en la producción de queso así como las proteasas y lipasas en detergentes. (Cacesa y Hubble, 1990).

Debido a que las enzimas son extremadamente selectivas con sus sustratos y su velocidad crece sólo con algunas reacciones, el conjunto de enzimas sintetizadas en una célula determina el tipo de metabolismo que tendrá cada célula. A su vez, esta síntesis depende de la regulación de la expresión genética. (Valero, 1998).

Como todos los catalizadores, las enzimas funcionan disminuyendo la energía de activación (E_a) de una reacción. Las enzimas no alteran el balance energético de las reacciones en que intervienen, ni modifican, por lo tanto, el equilibrio de la reacción, pero consiguen acelerar el proceso incluso millones de veces. Una reacción que se produce bajo el control de una enzima, o de un catalizador en general, alcanza el equilibrio mucho más deprisa que la correspondiente reacción no catalizada (Cacesa y Hubble, 1990).

2.4.2. Propiedades de las Enzimas

Las propiedades de las enzimas derivan del hecho de ser proteínas y de actuar como catalizadores. Como proteínas, poseen una conformación natural más estable que las demás conformaciones posibles. Así, cambios en la conformación suelen ir asociados en cambios en la actividad catalítica.

- ✓ Son altamente específicas para sus sustratos y para una reacción. Pueden estar sujetas a regulación en su actividad. Por ejemplo, la regulación alostérica.
- ✓ Son eficientes en pequeñas cantidades: la enzima no sufre cambios al catalizar las reacciones químicas, de manera que una pequeña cantidad de enzima puede catalizar repetidas veces una reacción.
- ✓ Aceleran las reacciones químicas sin sufrir modificación.
- ✓ No alteran las concentraciones de equilibrio de la reacción. Sólo hacen que este equilibrio se alcance más rápidamente, cambiando el mecanismo de reacción.
- ✓ No modifican el carácter exotérmico o endotérmico de la reacción (Cacesa y Hubble, 1990).

2.4.3. Actividad Enzimática

La unidad de actividad enzimática más ampliamente usada se define como la cantidad que causa la transformación de 1.0 μmol de sustrato por minuto, en condiciones óptimas. La actividad específica es el número de unidades de enzima por miligramo de proteína.

2.4.4. Tiempo de vida media

La estabilidad de las enzimas se expresa generalmente en términos de la vida media o periodo de semidesactivación. La vida media es el tiempo necesario para que se pierda la mitad de la actividad enzimática como resultado de la desactivación (Doran, 1998).

2.4.5. Mecanismo de acción enzimática

Una enzima, por si misma, no puede llevar a cabo una reacción, su función es modificar la velocidad de la reacción, entendiéndose como tal a la cantidad de producto formado por unidad de tiempo. Tal variación se debe a la disminución de la energía de activación E_a ; en una reacción química, la E_a es la energía necesaria para convertir los reactivos en formas moleculares inestables denominadas especies en estado de transición, que poseen mayor energía libre que los reactivos y los productos (Cacesa y Hubble, 1990).

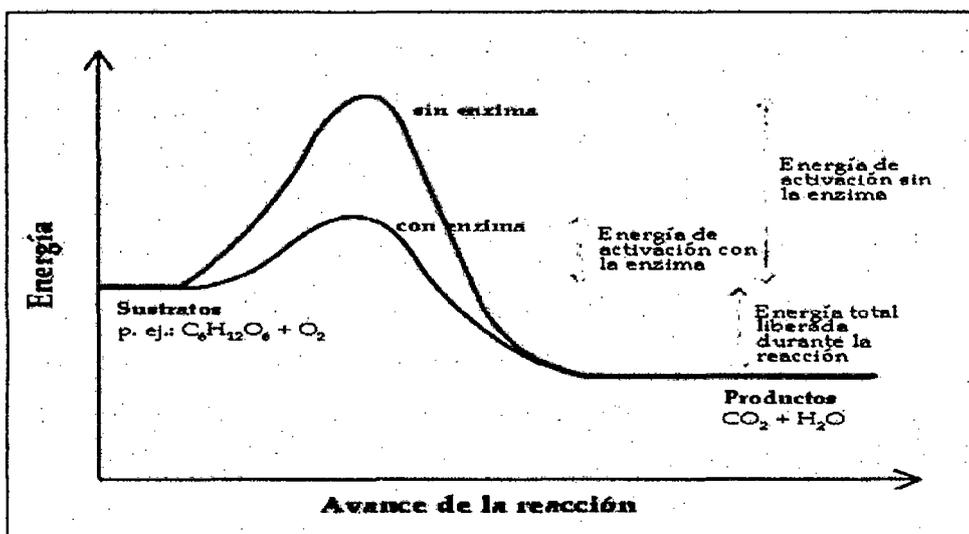


Figura 6. Mecanismo de acción enzimática. (Cacesa y Hubble, 1990)

En la Figura 6, están representados los niveles de energía, durante el curso de la reacción, de moléculas intervinientes en una reacción tipo: $A+B \rightarrow C$. La curva roja muestra el curso de la reacción en ausencia de una enzima que facilite la reacción, mientras que la curva azul la muestra en presencia de la enzima específica de la reacción. La diferencia en el nivel de energía entre el estado inicial y la necesaria para iniciar la reacción (picos de las curvas) es la energía de activación. Tal como se observa, la presencia de enzima baja la energía de activación. El complejo Enzima-sustrato posee menor energía de activación que las especies en estado de transición que la correspondiente reacción no catalizada. (Cacesa y Hubble, 1990).

Así mismo, parte de la energía de activación se utiliza para que los sustratos roten y se enfrenten con los átomos correctos para formar los enlaces. Agregan cargas a los sustratos: las cadenas laterales (R) de los aminoácidos de las enzimas pueden participar directamente haciendo a los sustratos químicamente más reactivos (Cacesa y Hubble, 1990).

2.4.6. Energía de Activación

Es la energía que necesita un sistema antes de poder iniciar un determinado proceso. La energía de activación suele utilizarse para denominar la energía mínima necesaria para que se produzca una reacción química dada.

Existe una barrera para la reacción denominada *Energía de Activación*. Solo aquellas moléculas con una energía suficientemente alta tienen posibilidad de reaccionar para formar el producto. Para hacer que la reacción proceda con mayor rapidez debe elevarse el contenido de energía de toda la población. Esto se podría lograr al calentar la mezcla o mediante la adición de un catalizador. En efecto, los catalizadores disminuyen la energía de activación de la reacción al permitir que una población mucho mayor reaccione a cualquier

tiempo. El catalizador puede lograr lo anterior al formar un complejo o compuesto intermediario inestable con el sustrato, el cual se descompone rápidamente para formar el producto, con lo que se obtiene una ruta para la reacción a través de la barrera, es decir, la energía de activación. (Doran, 1998)

2.4.7. Cinética Enzimática

La cinética enzimática estudia la velocidad de las reacciones químicas que son catalizadas por las enzimas. El estudio de la cinética de una enzima nos mostrará los detalles del mecanismo catalítico de esa enzima, su papel en el metabolismo, cómo es controlada su actividad en la célula y cómo puede ser inhibida su actividad por drogas o venenos o potenciada por otro tipo de moléculas (Valero, 1998).

El conocimiento adquirido acerca de la estructura de las enzimas ha sido de gran ayuda en la visualización e interpretación de los datos cinéticos. La estructura puede sugerir cómo permanecen unidos sustrato y producto durante la catálisis, cambios conformacionales ocurren durante la reacción, o incluso el papel en particular de determinados aminoácidos en el mecanismo catalítico. Algunas enzimas modifican su conformación significativamente durante la reacción, en cuyo caso, puede ser crucial saber la estructura molecular de la enzima con y sin sustrato unido (se suelen usar análogos que se unen pero no permiten llevar a cabo la reacción y mantienen a la enzima permanentemente en la conformación de sustrato unido). (Valero, 1998).

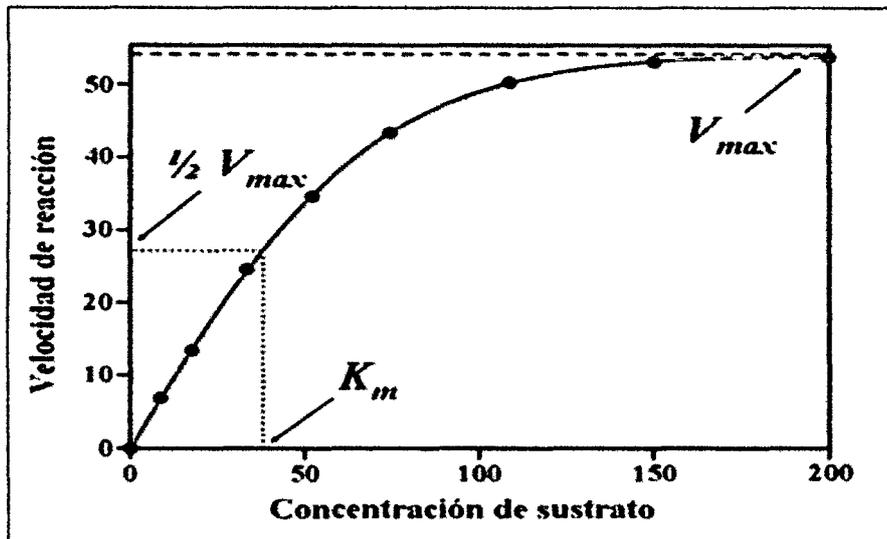


Figura 7. Velocidad de reacción enzimática en función de la concentración de sustrato. (Cacesa y Hubble., 1990)

Los mecanismos enzimáticos pueden ser divididos en mecanismo de único sustrato o mecanismo de múltiples sustratos. Los estudios cinéticos llevados a cabo en enzimas que sólo unen un sustrato, como la triosafosfato isomerasa, pretenden medir la afinidad con la que se une el sustrato y la velocidad con la que lo transforma en producto.

Por otro lado, al estudiar una enzima que une varios sustratos, como la dihidrofolato reductasa, la cinética enzimática puede mostrar también el orden en el que se unen los sustratos y el orden en el que los productos son liberados (Cunningham G., 1994).

Las dos propiedades cinéticas más importantes de una enzima son: el tiempo que tarde en saturarse con un sustrato en particular y su punto máximo de saturación. El conocimiento de estas propiedades permite hacer una hipótesis acerca del comportamiento de una enzima en el ambiente determinado y cómo responderá frente a un cambio de esas condiciones. En principio, las condiciones generales de la cinética química pueden aplicarse a las reacciones catalizadas enzimáticamente, a una concentración constante de enzima.

La Figura 7 muestra la variación de la velocidad de la reacción catalizada enzimáticamente en función de la concentración del sustrato, es evidente que a bajas concentraciones del mismo la velocidad de formación de producto es proporcional a la concentración del sustrato. A medida que se aumenta la concentración de sustrato se aprecia una pérdida de la proporcionalidad, en esta zona la reacción es de orden mixto y finalmente, a altas concentraciones, la velocidad de la reacción es independiente de esta (Cunningham y López, 1994).

2.4.8. Factores influyentes en la velocidad de reacción enzimática

2.4.8.1. Efecto de la temperatura

La temperatura es una variable que influye directamente sobre la enzima, aumenta la actividad enzimática cuando la temperatura se incrementa, de igual manera la enzima pierde actividad por desnaturalización térmica fuera del intervalo de operación, ya que al absorber demasiada energía, los enlaces no covalentes, que mantienen la estructura terciaria se rompen y la enzima se desnaturaliza (Cunningham y López, 1994).

La temperatura óptima es aquella en la cual la enzima muestra alta actividad y estabilidad a través del tiempo. Las enzimas sometidas a desnaturalización por altas temperaturas pierden su capacidad catalítica de manera irreversible debido a que las fuerzas débiles de unión se rompen al aumentar la vibración térmica, lo cual afecta la estructura terciaria (Hicks, 2000).

Un aumento en la temperatura provoca un aumento de la velocidad de reacción hasta cierta temperatura óptima, ya que después de aproximadamente 45°C se comienza a producir la desnaturalización térmica. Las enzimas de muchos mamíferos tienen una temperatura óptima de 37°C, por encima de esa temperatura comienzan a inactivarse y se destruyen. Sin embargo, existen especies de bacterias y algas que habitan en fuentes de aguas termales y en el otro extremo ciertas bacterias árticas tienen temperaturas óptimas cercanas a 0°C (Valero, 1998).

Las enzimas presentan una marcada fragilidad térmica, ya que por el calentamiento a temperaturas cercanas a los 50 °C tienen una pérdida de la estructura terciaria y, como consecuencia de la configuración de la proteína, se alteran los sitios isostérico y alostérico (Hicks, 2000).

2.4.8.2. Efecto del pH

Las enzimas en general requieren un pH característico, donde la actividad es máxima y sus centros activos presentan una adecuada conformación iónica para llevar a cabo la catálisis con eficiencia. En soluciones muy ácidas o alcalinas las enzimas están fuera del intervalo de pH fisiológico u óptimo, y la estabilidad de la enzima puede afectar la conformación secundaria, terciaria y/o cuaternaria sufriendo desnaturalización irreversible en soluciones muy ácidas o alcalinas (Hicks, 2000).

El pH no afecta la actividad enzimática directamente sino que modifica la concentración de protones. Los protones además de alterar la estructura de la enzima y el sustrato, pueden participar también en la reacción como sustrato o producto. En esos casos, la concentración de protones afecta directamente la velocidad de la reacción (Valero, 1998).

Cualquier cambio brusco de pH, sabiendo que las enzimas son proteínas, puede alterar el carácter iónico de los grupos amino y carboxilo en la superficie proteica, afectando así las propiedades catalíticas de una enzima. A pH alto o bajo se puede producir la desnaturalización de la enzima y en consecuencia su inactivación (Valero, 1998).

2.4.9. Precipitación de enzimas

Las técnicas de precipitación son usualmente aplicadas como un primer paso para un proceso posterior. La precipitación puede actuar tanto en la concentración y purificación de la enzima, pero en realidad la concentración se logra más eficazmente que la purificación. Por esta razón, esta técnica se usa regularmente en las primeras etapas de operaciones posteriores, reduciendo el volumen para las etapas posteriores. Sin embargo, en muchos casos, como en la producción de enzimas extracelulares, la precipitación es una manera eficaz de lograr algún grado de purificación (Golunski *et al.*, 2011).

Recuperar, aislar y purificar enzimas del medio en el que fueron generadas busca la obtención de un producto más estable, más activo y de pureza satisfactoria. Las técnicas usadas para la separación de enzimas de concentrados líquidos son: la separación de las enzimas por precipitación; por extracción líquido-líquido siendo el solvente acuoso o no acuoso; o aun, una mezcla de solventes polar-apolar, por adsorción y desorción (Golunski *et al.*, 2011).

La adición de solventes orgánicos a la dispersiones acuosas de proteína-enzimas disminuye la constante dieléctrica del medio, reduciendo la solubilidad de la proteína. Cantidades mayores de solvente hacen que las moléculas de proteína interactúen unas con otras, en lugar que con el agua, por ello que éstas precipitan. Varios son los solventes que pueden ser usados, el etanol es uno de los más usados (Golunski *et al.*, 2011).

2.5. Estudio de la enzima Inulinasa

2.5.1. Inulinasas

Las inulinasas son 2,1-B-D-fructano furohidrolasas (E.C. 3.2.1.7) catalizan la hidrólisis de inulina produciendo inulooligosacáridos , fructosa y glucosa como productos principales (Neagu *et al.*, 2011).

La inulinasa encuentra aplicación en la producción de jarabes con una alta concentración de fructosa, adquiriendo gran importancia como agentes responsables de la dulzura en alimentos y bebidas (Poorna y Kulkarni, 1995).

Por otra parte se ha probado que las 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 más alta en enzimas producidas por levaduras que en aquellas obtenidas a partir de mohos.

Notoriamente una actividad invertasa de Inulinasa es deseable. Estos investigadores postularon a que las inulinasas poseen sitios catalíticos comunes, pero diferentes sitios de enlace para hidrólisis de inulina y sacarosa (Castillo, 2009).

Las inulinasas aplicación en la industria alimentaria en la producción de jarabes de fructosa.

Los jarabes de fructosa pueden ser producida a partir de almidón de maíz por métodos enzimáticos, con la participación de alfa amilasa, amiloglucosidasa y glucosa isomerasa, con lo cual se obtiene un producto consistente de oligosacáridos (8%), fructosa (45%) y glucosa (50%). La separación de glucosa del jarabe de maíz con alta concentración de glucosa es costoso y convierte en poco rentable este método. La fructosa también puede ser obtenida por hidrólisis ácida de inulina, pero la fructosa es fácilmente degradada a bajo pH y el proceso genera hidrosilato inulina y por los subproductos formados

como anhídridos de difructosa. Una alternativa rápida, directa, económica podría ser la hidrólisis enzimática de inulina. El método incluye fuentes microbianas que secretan altas cantidades de inulinasa y pueden producir fructosa a partir de inulina por un simple paso de una reacción catalizada por la enzima y con rendimientos de hasta el 95% (Chi *et al.*, 2011).

2.5.2. Producción de Inulinasas

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 (Castillo y Chamy, 2010).

Las inulinasas han sido producidas utilizando diferentes sustratos como fuente de carbono, desde inulina pura a residuos agroindustriales. Naturalmente, los materiales ricos en inulina son los sustratos preferidos para la producción de inulinasas, sin embargo, recientemente la utilización de residuos agroindustriales ha concitado la atención de los investigadores (Neagu y Bahrim, 2011).

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

La presencia de inulina en los tubérculos de yacón despierta el interés por estudiar esta planta como sustrato para el crecimiento de microorganismos productores de inulinasas (Cazzeta *et al.*, 2005).

Entre los sustratos puros utilizados para la producción de inulinasa, la inulina y sacarosa son las fuentes de carbono preferidas. Adicionalmente, los sustratos puros que suplementan el medio de

producción pueden tener un impacto positivo en la producción de inulinasa. Kumar *et al.* (2005) suplementó el medio para la producción de inulinasa, con sacarosa, glucosa, fructosa, galactosa, maltosa y dextrosa y observó que el medio suplementado con galactosa tiene los mayores rendimientos, seguido del medio suplementando con maltosa. En el cuadro 2 se muestran los sustratos más usados en la producción de inulinasas.

Cuadro 2. Sustratos usados para la producción de Inulinasas

Sustrato	Microorganismo
Inulina	<i>Pichia guilliermondii sp</i> <i>k. lactis k.marxianus spp.</i> <i>Streptomyces spp</i>
Sacarosa	<i>Kluyeromices marxianus</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus orizae</i> <i>Aspergillus ficuum</i>
Fructosa	<i>Kluyeromices marxianus</i> <i>k. lactis k.marxianus spp.</i>
Glucosa	<i>Kluyeromices marxianus</i>
Inulina contenida en materiales vegetales	<i>Streptomyces spp</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Kluyeromices marxianus YS-1</i> <i>Rhizotocnia solanis</i>
Residuos agroindustriales	<i>Aspergillus ochraceus</i> <i>Streptomyces spp</i> <i>Kluyeromices marxianus NRRLY-7571</i> <i>Aspergillus ficuum JNSP5-06</i>

Neagu y Bahrim., 2011

2.5.3. Microorganismos productores de Inulinasas

La evaluación de la producción de una enzima por fermentación microbiana se determina por parámetros de rendimientos (unidad de actividad/ml de caldo de cultivo o unidad de actividad/mg de enzima) de la enzima obtenida y por las propiedades de la enzima que dependen del tipo de microorganismo empleado, del modo de fermentación, del medio de cultivo y las condiciones de incubación (Castillo y Chamy, 2010).

Muchas cepas de mohos, levaduras y bacterias son capaces de producir inulinasas y varias de ellos han sido cultivados con éxito y la enzima extraída, concentrada y purificada (Castillo y Chamy, 2010).

Se ha confirmado que los microorganismos más comúnmente utilizados son las cepas de mohos como el *Aspergillus sp* y las cepas de levaduras como *Kluyeromices marxianus*, aunque las cepas de levadura producen más inulina que las cepas de hongos y bacterias (Castillo y Chamy, 2010).

En el Cuadro 3 se muestra cuáles son los microorganismos productores de Inulinasas

Cuadro 3. Microorganismos productores de Inulinasas

Microorganismos productores de Inulinasas	
Fungi	Bacteria
<i>Aspergillus sp.</i>	<i>Acetobacter sp.</i>
<i>A. aureus</i> MTCC 151	<i>Achromobacter sp.</i>
<i>A. awamori</i> 808	<i>Arthrobacter sp.</i>
<i>A. ficuum</i>	<i>Bacillus sp.</i>
<i>A. fischeri</i> MTCC 150	<i>B. subtilis</i> 430 A
<i>A. flavus</i> MTCC 277	<i>Clostridium acetobutylicum</i> IFP912
<i>A. nidulans</i> MTCC 344	<i>C. acetobutylicum</i> ABKn8
<i>A. niger</i> 817	<i>C. pasterianum</i> var. I-53
<i>A. niger</i> A42	<i>C. thermoautotrophicum</i> T1
<i>A. niger</i> MTCC281	<i>C. thermosuccinogenes</i>
<i>A. aureus</i> mutant 817	<i>Escherichia coli</i>
<i>A. niger</i> mutant UV1	<i>Flavobacterium mulivorum</i>
<i>A. niger</i> van Teighem	<i>Pseudomonas sp.</i> 65
<i>A. phoenicis</i> CBS294.80	<i>Staphylococcus sp.</i>
<i>Cladosporium sp.</i>	Levaduras
<i>Chrysosporium pannorum</i>	<i>Candida sp.</i>
<i>Fusarium sp.</i>	<i>C. kefir</i> DSM70106
<i>F. oxysporum</i> NCIM 1072	<i>C. seudotropicalis</i> IP513
<i>Penicillium sp.</i>	<i>Kluyveromices fragilis</i>
<i>Penicillium sp.</i> 91-4	<i>K. fragilis</i> ATCC 12424
<i>P.purpurogenum</i> <i>var.rubisclerotium</i>	<i>K. fragilis</i> CCY 51-1-4
<i>P. rugulosum</i>	<i>K. lactis</i>
<i>P. trzebinskii</i>	<i>K. marxianus</i>
<i>Sterptomyces sp.</i>	<i>K. marxianus</i> ATCC 36907
<i>S. rochei</i> E87	<i>Pichia sp.</i>

Ricca et al., (2007)

2.5.4. Caracterización de la Inulinasa

La purificación de la 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 las Inulinasas intracelulares requieren 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, determinan otras características como su peso molecular, su modo de acción sobre la molécula de inulina, su actividad hidrolítica sobre la molécula de sacarosa, respuesta a los cambios en pH y temperatura del medio y efectos de la concentración de los sustratos (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 reportado que las inulinasas microbianas tienen un peso molecular cercano a 50KDa (Chi *et al.*, 2009). Por ejemplo, Sheng *et al.* (2008) purificó y caracterizó las inulinasas de *Cryptococcus aureus* y su peso molecular fue estimado en 60 KDa.

Se ha determinado que las inulinasas pueden ejercer 2 modos de acción diferentes sobre la molécula de inulina, una acción externa y una interna, correspondiendo 2 clases de inulinasas llamadas exo-inulinasas y endo-inulinasas respectivamente.

Las exo-inulinasas (74KDa, pH 5.1-7.0) empiezan con la separación de la primera molécula de D-fructosa y va hasta el último enlace para liberar glucosa y la endo-inulinasas (64KDa) actúa sobre enlaces internos y rinde un conjunto de inulo-oligosacáridos. Estas propiedades dependen del origen microbiano de la enzima. La mejor cepa será la que tenga ambas propiedades, como es el caso del *A. ficuum* (Pandey *et al.*, 1999).

Una mezcla de endo y exo inulinasas puede resultar en una mejor conversión de inulina a fructosa que solo utilizar enzimas puras aisladas, dado que las endoinulinasas romperían las moléculas de inulina en muchos oligosacáridos, aumentando así los puntos de ataque para las exoinulinasas, con el consecuente incremento de la velocidad de reacción de inulina a fructosa (Castillo y Chamy, 2010).

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 inulinasas 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.

La actividad y estabilidad depende 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 (Castillo y Chamy, 2010).

Así se tienen los rangos 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 (Castillo y Chamy, 2010).

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.

El grado de variabilidad observada con respecto a inulinasas entre las diferentes cepas de *K. marxianus* es bastante notorio. Las inulinasas de esta levadura muestran sólo termoestabilidad modesta, debido a lo cual se limita su potencial para aplicaciones a escala comercial.

2.5.5. Producción de inulinasas por cepas de *Kluyveromices marxianus*

2.5.5.1. *Kluyveromices marxianus*

La cepa de levaduras *Kluyveromices marxianus* NRRL Y-7571 es considerada como una de las levaduras que tiene gran potencial biotecnológico para producir Inulinasa (Castillo y Chamy, 2010).

2.5.5.2. Características de la cepa

Además de ser la inulinasa una enzima nativa de la levadura lechera *Kluyveromices 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. *Kluyveromices marxianus* es una especie que incorpora muchos sinónimos, se describe como una levadura homotálica, hemiascomyceto, es filogenéticamente relacionada a *Saccharomyces cerevisiae* y es una especie hermana de la mejor conocida *Kluyveromices lactis* (Lane y Morrissey, 2010).

2.5.5.3. Producción de Inulinasa por *Kluyveromices marxianus*

Las levaduras tienen la ventaja por tener una mayor velocidad de generación celular y adaptabilidad a diferentes condiciones y modos de cultivo, donde se demostró que la *Kluyveromices marxianus* CDBB-L-278, fue una levadura hiperproductora de Inulinasa (Lane y Morrissey, 2010).

En la tabla 2 se muestran las cepas de *Kluyeromices marxianus* productoras de Inulinasas y su actividad enzimática

Tabla 2. Cepas de *Kluyeromices marxianus* productoras de Inulinasas y su actividad enzimática

Microorganismo	Tipo de cultivo	Rendimiento
<i>Kluyeromices sp. Y-85</i>	Líquido	59.5
<i>k. marxianus</i>	Líquido	43.7
<i>k. marxianus ATCC 36907</i>	Líquido	260
<i>k. marxianus ATCC 52466</i>	Líquido	0.418
<i>k. marxianus CDBB-L-278</i>	Líquido	82
<i>k. marxianus var. marxianus CBS 6556</i>	Líquido	3000
<i>k. marxianus UCD (FST) 55-82</i>	Líquido	212
<i>k. marxianus var. bulgaricus</i>	Líquido	107
<i>k. marxianus ATCC 16045</i>	Líquido	121
<i>k. marxianus var. bulgaricus</i>	Líquido	4.1
<i>K. marxianus (A1 y A2)</i>	Líquido	32
<i>K. marxianus NRRL Y-7571</i>	Sólido	391.9 U/g
<i>K. marxianus NRRL Y-7571</i>	Líquido	8.87 U/g.h
<i>Kluyeromices S120</i>	Sólido	409.8 U/g.h
<i>K. marxianus YS-1</i>	Líquido	24.5
<i>K. marxianus YS-1</i>	Líquido	50.2
<i>K. marxianus NRRL Y-7571</i>	Sólido	463 U/g

Castillo y Chamý., 2010

Los mayores esfuerzos están orientados a producir Inulinasa para aplicarla en la producción de jarabe de fructosa, como un edulcorante de bajo poder calórico, las cepas de *Kluyveromices marxianus* que tienen el status de GRAS (Generally recognized as safe) y QPS (Qualified presumption of safety) en los E.E.U.U y la U.E. son preferidos para la producción de Inulinasa con fines alimentarios y biotecnológicos. (Lane y Morrisey, 2010).

Según Pandey *et al.* (1999), los mejores resultados de producción de inulinasa son dados por los mohos *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 *Kluyveromices marxianus* han sido últimamente más estudiados. Cruz-Guerrero *et al.* (1995) demostraron que la *Kluyveromices 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 *Kluyveromices 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 sustrato limitante, resultando valores de 107 U/ml para una velocidad de dilución de 0.05 h⁻¹ y 0.81 U/ml para

un valor de 0.45 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 °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 K₂HPO₄ y pH 3.5. La actividad enzimática fue de 127 U/ml. El K₂HPO₄ tuvo un efecto positivo débil sobre la actividad enzimática aunque estadísticamente fue significativa.

2.5.6. Aplicaciones de la Inulinasa

Las inulasas pueden ser usadas en un amplio espectro de aplicaciones, desde la industria alimentaria a la producción de bioetanol y farmacología (Neagu y Bahrim, 2011).

2.5.6.1. Producción de jarabe de ultra alto contenido de fructosa

La industria utiliza una gran cantidad de polisacáridos y en los últimos años, los trabajos e investigación han sido direccionados hacia la producción de estos por medio de la fermentación microbiana (Neagu y Bahrim, 2011).

La fructosa es el carbohidrato más dulce de todos los producidos naturalmente y es frecuentemente obtenido por procesos enzimáticos a partir del almidón. La conversión de almidón a fructosa implica el uso de tres enzimas diferentes y el rendimiento solo es del 45% (Pandey *et al.*, 1999).

Un método productivo y simple para obtener jarabes con alta concentración de fructosa es la hidrólisis enzimática de inulina en un proceso de una etapa, utilizando inulinasa con rendimientos de hasta el 95% en producción de fructosa (Chi *et al.*, 2009, Ricca *et al.*, 2009).

Las exoinulinasas de diferentes microorganismos son utilizadas para la producción de jarabes con alta concentración de fructosa a partir de inulina o fuentes vegetales que contienen inulina (Chi *et al.*, 2009).

Los jarabes de fructosa tienen efectos beneficiosos en pacientes diabéticos, incrementa la absorción de hierro en niños, tiene alto poder edulcorante y puede ser utilizado en la dieta de personas con obesidad, estimular la absorción de calcio en mujeres menopáusicas, estimular el crecimiento de *Bifidobacterium* en el intestino grueso y delgado (Rocha *et al.*, 2006).

2.5.6.2. Producción de Fructooligosacáridos a partir de inulina

En los años recientes, la producción de Fructooligosacáridos (FOS) se ha concentrado en los productos comerciales de alto contenido. La inulina es una fuente promisoriosa para la producción de FOS y estos tienen similar estructura química que los producidos a partir de sacarosa. En adición, son recomendadas como fuente de fibra dietaria (Chi *et al.*, 2011).

Las endoinulinasas son responsables de la producción de FOS (Neagu y Bahrim, 2011).

Los FOS tienen variadas aplicaciones en la industria alimentaria: confitería, postres de leche, producción de yogurt y quesos, productos de panificación, chocolates, helados y salsas (Chi et al., 2011 review). Se ha determinado que la hidrólisis de inulina con endoinulinasas genera FOS con grados de polimerización de 3 y 4. Los Inulooligosacáridos son prebióticos y sus efectos positivos en la salud humana han sido ampliamente reconocidos (Neagu y Bahrim, 2011).

2.5.6.3. Producción de bioetanol

Las tecnologías químicas y termoquímicas pueden convertir biomasa en biocombustibles tales como biodiesel y otros líquidos. La principal materia prima para la producción de etanol a nivel mundial son los residuos de la industria azucarera y el almidón de cultivos agrícolas; su principal uso es mezclado con gasolina. La producción de alcohol a partir de residuos ricos en inulina ha sido estudiada desde el siglo XIX (Neagu y Bahrim, 2011).

Las exoinulinasas microbianas pueden remover el residuo de fructosa terminal del sector no reductor de la molécula de inulina, produciendo fructosa y glucosa, las cuales pueden ser fácilmente fermentadas en etanol por cepas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Chi et al, 2011).

2.5.6.4. Otras aplicaciones

Las inulinasas también son utilizadas para la hidrólisis de inulina en la producción de proteína unicelular y la obtención de aceite a partir de organismos unicelulares (Chi et al, 2011).

2.6. Estudio de la estabilidad enzimática

2.6.1. Estructura enzimática y desnaturalización proteica

Las enzimas son moléculas proteínicas de configuración compleja que pueden ser desestabilizadas por fuerzas relativamente débiles (Doran, 1998).

Unas de las principales características de las enzimas es su alta especificidad, la gran mayoría tiene la capacidad de catalizar reacciones más o menos específicas, es decir, su intervalo de acción se limita a un determinado tipo de compuesto que debe reunir ciertas características para que pueda ser utilizado como sustrato (Badui, 1999).

En la catálisis sólo una región relativamente pequeña de la enzima entrará en contacto directo con el sustrato y se conoce como sitio activo, que corresponde a aquella porción de la proteína que participa directamente en la unión y la transformación de sustrato; generalmente existe uno por molécula de enzima (Badui, 1999).

La potencia o actividad de una enzima no puede medirse en términos de su concentración, puesto que puede estar presente, pero en forma desnaturalizada y sin funcionalidad; por esta razón se emplea la Unidad Internacional de Actividad Enzimática, que se define como la cantidad de enzima requerida para transformar en producto un micromol de sustrato por minuto, en las condiciones óptimas de pH y temperatura (Badui, 1999).

En el transcurso de las reacciones catalizadas por enzimas, la desactivación de las mismas se produce a una velocidad que depende de su estructura y de las condiciones de reacción (Doran, 1998).

Entre los factores medioambientales que afectan a la estabilidad enzimática pueden citarse: temperatura, el pH del medio, la fuerza iónica, las fuerzas mecánicas y la presencia de sustancias extrañas como disolventes, detergentes y metales pesados (Doran, 1998).

El proceso de desnaturalización de las enzimas se observa en la Figura 8.

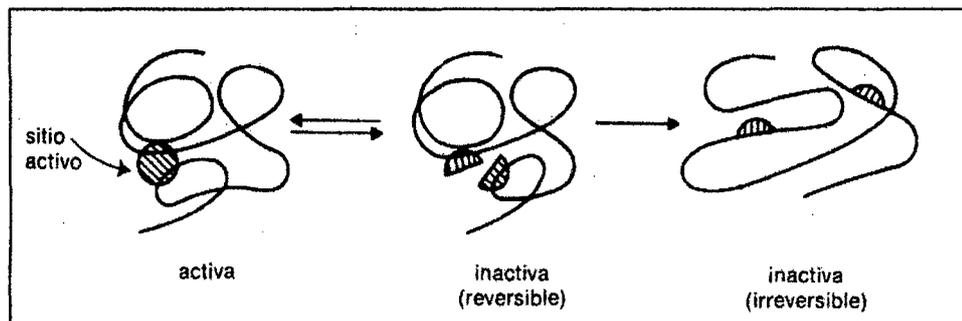


Figura 8. Proceso de desnaturalización de las proteínas (Badui, 1999)

La estabilidad térmica de las enzimas es parámetro muy importante en el diseño de reactores enzimáticos, puesto que determina los límites para el uso y reuso de las enzimas, y por tanto los costos del proceso (Santos *et al.*, 2007).

La mayor parte de las enzimas presentan su actividad (actividad óptima) en el rango 30 - 40 °C y, por encima de 45 °C, comienzan a desnaturalizarse. Tienden también a tener una temperatura de resistencia máxima a la desnaturalización, por lo general claramente por debajo de la de máxima actividad (Fennema, 1993).

Dado que la estructura proteica determina la actividad de una enzima, cualquier factor que modifique su configuración afectará su función.

El proceso de desnaturalización proteica debida a un incremento en la temperatura conducirá a una modificación de la actividad (Hicks, 2000). En la tabla 3 se muestran las propiedades de varias inulinasas de origen microbiano.

Tabla 3. Propiedades de Inulinasas de origen microbiano

Fuente	Peso Molecular	pH óptimo	T° óptima	Rango de pH para la estabilidad	T° de estabilidad
<i>K. marxianus</i>	-	3.5	60	-	-
<i>K. marxianus</i>	-	4.4	50	-	-
<i>K. marxianus</i>	-	4.75	55	-	40
<i>K. fragilis</i>	250	-	55	-	-
<i>Yarrowia lipolítica</i>	-	4.5	50	3-7	50
<i>Pichia guilliermondii</i>	50	6	60	6-7	60
<i>Cryptococcus aureus</i>	60	5	50	4-6.5	65
<i>Arthrobacter spp.</i>	75	7.5	50	5-10.5	30...40
<i>Bacillus spp.</i>	-	7	-	6-8	25...40
<i>Streptomyces spp.</i>	-	6	60	-	60...70
<i>A. niger</i>	-	4.4	-	-	-
<i>A. niger</i>	70	5	40	-	-
<i>Penicillium janczewskii</i>	-	4.8-5	35...45	-	-
<i>A. ochraceus</i>	79	4.5	60	-	60
<i>F. oxysporum</i>	300	5.8-6.2	30...37	-	-

Neagu y Bahrim, 2011

2.6.2. Cinética de desactivación enzimática

Las enzimas son moléculas proteínicas de configuración compleja que pueden ser desestabilizadas por fuerzas relativamente débiles. En el transcurso de las reacciones catalizadas por enzimas, la desactivación de las mismas se produce a una velocidad que depende de su estructura y de las condiciones de reacción. Entre los factores medioambientales que afectan a la estabilidad enzimática pueden citarse: temperatura, el pH del medio, la fuerza iónica, las fuerzas mecánicas y la presencia de sustancias extrañas como disolventes, detergentes y metales pesados. Conforme aumenta la temperatura disminuye la velocidad de desactivación enzimática de manera exponencial. Los valores de la Energía de desactivación son altos, generalmente del orden de 170-400 KJ/mol para muchas enzimas. De acuerdo con ello, un aumento de temperatura de 10°C, entre 30°C y 40°C, producirá un aumento de temperatura sobre la velocidad de la reacción enzimática. Se ha demostrado también que un aumento de temperatura produce también una disminución de la cantidad de enzima activa presente. (Doran, 1998)

El efecto de la temperatura sobre actividad enzimática se modela muy bien con la ecuación de Arrhenius, que está dada por la energía de activación y por el nivel de la temperatura. (Seminario *et al.*, 2003).

El primer elemento esencial de información respecto de la cinética de inactivación térmica aplicada a enzimas, es la velocidad a que tiene lugar el proceso de inactivación de una enzima determinada a una temperatura dada (Fennema, 1993).

La desnaturalización proteica suele seguir cinéticas de primer orden, por lo que la inactivación de las enzimas sigue en general una cinética de primer orden (Fennema, 1993).

Según Cheftel y Cheftel (1980), la inactivación enzimática por calor puede representarse por la siguiente ecuación:

$$\frac{-dA}{dt} = k.A$$

Donde A es la actividad enzimática al tiempo t, k es la constante de velocidad de inactivación térmica (s⁻¹) y dt/dA representa la variación de actividad enzimática con el tiempo.

Por integración de la ecuación anterior se obtiene:

$$A = A_0.e^{-kt}$$

Que puede ser expresada como:

$$\log \frac{A}{A_0} = \frac{-kt}{2.303}$$

Donde A₀ es la actividad enzimática inicial

Según Fennema (1993), la expresión matemática para exponer el efecto de la temperatura sobre la velocidad de un proceso químico, incluyendo reacciones enzimáticas, es la ecuación de Arrhenius:

$$k = k_0 e^{-E_a/RT}$$

Los valores de la energía de desactivación son altos, generalmente son del orden de 170-400 KJ/mol para muchas enzimas. De acuerdo con ello, un aumento de temperatura en 10°C, entre 30 y 40°C, producirá un aumento de temperatura sobre la velocidad de la reacción enzimática. Se ha demostrado que también un aumento de temperatura produce una disminución de la cantidad de enzima presente (Doran, 1998).

2.6.3. Estabilidad térmica de inulinasas

Los mayores problemas asociados con la aplicación industrial de Inulinasas para la producción de fructosa son: la limitada solubilidad de la inulina a temperatura ambiente y las probabilidades de contaminación microbiana a esta temperatura. Por ello, los procesos industriales para la producción de fructosa y Fructooligosacáridos se realizan a una temperatura promedio de 60°C. Los reportes de investigación refieren que las Inulinasas reducen su actividad enzimática después de pocas horas a esta temperatura y requieren reposición del biocatalizador para continuar con el proceso, encareciendo los costos del mismo (Dhiman, 2013).

Las experiencias prácticas demuestran que la máxima actividad no siempre corresponde a la temperatura del proceso, puesto que a esta temperatura la velocidad de desnaturalización es alta. Se sugiere entonces que la temperatura del proceso debe ser menor a la temperatura a la cual se tiene la máxima actividad enzimática, y así no afectar la productividad del proceso. También se tiene que el tiempo de vida media decrece rápidamente con el aumento de la temperatura. La selección de una temperatura aún más baja, podría incrementar la estabilidad de la enzima sin afectar su actividad (Santos *et al.*, 2007).

En el cuadro 4 se muestran los valores de Temperatura óptima y termoestabilidad de Inulinasas de diferentes fuentes.

Cuadro 4. Temperatura óptima y termoestabilidad de Inulinasas de diferentes fuentes

Fuente	Temperatura óptima	Termoestabilidad
Levaduras y mohos		
<i>Kluyeromices marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i>	55	Estable por 3.5 h a 40°C. Tiempo de vida media de 40 min a 50°C.
<i>Chrysosporium pannorum</i>	50	Estable por 10 min a 50°C.
<i>Fusarium oxysporum</i>	45	Estable por 10-15 min a 50°C.
<i>Panaeolus papillanoceus</i>	60-65	Estable por 1 h a 50°C.
<i>Scytalidium acidophilum</i>	-	Retiene el 95 y 85% de su actividad después de 6 h de incubación a 60 y 65° C, respectivamente
<i>Aspergillus niger</i>	55	Retiene 60-65% de su actividad después de 2 h a 65°C
<i>Aspergillus ficuum</i>	60	Retiene 74 y 22% de su actividad después de 6 h de incubación a 60 y 70°C
<i>Aspergillus oryzae</i>	55	Retiene 90% de su actividad después de 2 h de incubación a 70°C
<i>Aspergillus versicolor</i>	55-60	Retiene 28 y 39% de su actividad a 60°C
<i>Aspergillus awamori</i>	60	Retiene 90% de su actividades después de 24h a 50°C
<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissler	55	Mantiene el 80% de su actividad después de 1h de incubación a 50°C
Isoforma I	60	Retiene 59% de actividad después de de 3 h a 60°C
Isoforma II	60	Retiene 100% de actividad después de 3 h a 60°C
Inulinasa inmovilizada	60	Retiene 82-96% de su actividad después de 12h a 60°C

Singh y Gill, 2006

2.7. Modelamiento matemático

La modelización matemática ha sido utilizada, por lo que denominamos convencionalmente matemáticos aplicados, como un proceso dinámico que les ayuda a entender cierto problema o alguna situación de interés en física, química, biología, etc. Estos investigadores están frecuentemente a la búsqueda de modelos matemáticos que permitan una comprensión profunda de situaciones reales, teniendo presente sobre todo una posible toma de posición en relación a objetos estudiados.

La formalización de un problema en términos matemáticos es casi siempre el estadio más difícil de la modelización matemática y debe ser aprendido con la propia experiencia.

Así, se define al modelamiento matemático como el proceso que utiliza conceptos y técnicas, esencialmente matemáticas, para el análisis de situaciones reales (Bassanezi y Sallet., 1997).

Un modelo matemático es una relación entre ciertos objetos matemáticos y sus conexiones por un lado, y por el otro, una situación o fenómeno de naturaleza no matemática.

En principio, existe un proceso de modelización detrás de todo modelo matemático.

Esto significa que alguien de manera implícita o explícita ha recorrido un proceso de establecer una relación entre alguna idea matemática y una situación real. En otras palabras, con el fin de crear y usar un modelo matemático es necesario, en principio, recorrer todo el camino de un proceso de modelización.

Blomhoj (2004) señala que el modelamiento matemático se entiende como un proceso intelectual en el cual se dispone de:

1. Una situación-problema dada en un contexto, generalmente de realizaciones prácticas, en la cual se requiere obtener una meta, respuesta o decisión acerca de cómo se deberá proceder o cómo se deberá usar un recurso para obtener el mejor resultado entre una variedad de ellos.
2. La formulación de la situación-problema del mundo real en términos matemáticos, generalmente a través de ecuaciones o relaciones entre variables que describen la situación dada (esto es, la construcción del modelo matemático en sí).
3. La solución y análisis del problema matemático obtenido.
4. La interpretación de los resultados matemáticos vistos en el contexto de la situación real original (por ejemplo, verificar si ella se corresponde con la pregunta originalmente propuesta o implícita en la situación-problema original).

2.7.1. Modelos matemáticos para la estabilidad térmica de Inulinasas

Se ha incrementado el interés por la búsqueda de las mejores condiciones de operación para la producción de fructosa mediante la hidrólisis de inulina y utilizando inulinasas. Sin embargo, no se ha realizado un trabajo integral que abarque un amplio rango de valores para los parámetros de proceso. El conocimiento de la cinética de reacción y velocidad de desactivación enzimática y su efecto global sobre el progreso de la reacción, podría ser muy útil para el desarrollo de las potencialidades de producción de fructosa a partir de la hidrólisis enzimática de inulina (Ricca *et al.*, 2009).

Para la levadura *Kluyveromices marxianus* también se presentan estudios de modelamiento matemático de la estabilidad térmica y enzimática de la Inulinasa obtenida.

Ricca *et al.*, (2009) desarrolló un modelo de desactivación térmica para estudiar la estabilidad térmica de la Inulinasa obtenida a partir de *Aspergillus niger* y donde la constante de desactivación K_d es determinada mediante el Modelo de Arrhenius. El modelo de desactivación fue validado como un modelo cinético para la predecir la hidrólisis de inulina para un rango de concentración de sustrato 10-40 g/L y temperaturas de reacción sobre los 60°C para tiempos prolongados de reacción. El modelo se presenta como una poderosa herramienta para escoger las condiciones de operación óptimas para procesos de larga duración.

Santos *et al.*, (2007) desarrolló un modelo utilizando conceptos termodinámicos y datos experimentales de enzimas libres e inmovilizadas. El modelo fue diseñado para predecir la actividad enzimática con respecto a la temperatura y el tiempo del proceso enzimático, así como su vida media, en un amplio rango de temperaturas.

$$v = v_0 * \exp\left(\frac{-E_a}{RT}\right) * \exp\left[-\left(K_{do} * \exp\left(\frac{-E_d}{RT}\right)\right) * t\right]$$

El modelo presentado es importante porque representa 2 fenómenos en el proceso de reacción de la enzima: el proceso de activación representado por la primera parte del lado derecho de la ecuación, la constante cinética K, la cual es significativa a bajas temperaturas; y el proceso de inactivación, expresado por el segundo término, para ello considera parámetros como la energía de activación (Ea), la Energía de Desactivación (Ed), las constantes v0 y Kdo.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar de la ejecución

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

- Laboratorio de Bioprocesos y Química Orgánica del Departamento de Agroindustria de la Universidad Nacional del Santa.
- Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Productos Agroindustriales del Departamento de Agroindustria de la Universidad Nacional del Santa.

3.2 Materiales y equipos

3.2.1. Materia prima

Para la preparación del medio de cultivo se utilizó Yacón (*Polymnia sanchifolia*) proveniente del distrito de Pariacoto, de la Provincia de Huaraz, región Ancash.

3.2.2. Materiales

- Algodón
- Cajas de fósforos
- Embudo de vidrio
- Papel higiénico
- Papel aluminio
- Espátula
- Gasa
- Gradilla
- Guantes
- Mechero Bunsen
- Rejilla
- Trípode

- Matraces de 150, 250 y 500 ml
- Pipetas de 5 y 10 ml
- Probetas de 50 y 100 ml
- Tubos de centrifugación
- Tubos de ensayo con tapas
- Varilla de vidrio
- Vasos de precipitación de 25, 50 y 100 ml
- Micropipetas

3.2.3. Reactivos

- Ácido cítrico monohidratado ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$). Fabricante: Sigma Chemical. Peso Neto: 500 gr. Alemania.
- Ácido- 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Fabricante: Sigma Chemical. Peso neto: 25 gr. Alemania.
- Agar agar. Fabricante: Sigma Chemical. Peso neto: 50 gr. Alemania.
- Azul de Cromassie G-250 ($C_{47}H_{49}N_3NaO_7S_2$). Fabricante: Merck. Peso neto: 25 gr. Alemania.
- Dihidrogenofosfato de potasio (). Fabricante: Merck. Peso neto: 250 gr. Alemania.
- Extracto de levadura granulado. Fabricante: Merck. Peso neto: 500 gr. Alemania.
- Fosfato de sodio dibásico ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$). Fabricante: Merck. Peso neto: 250 gr. Alemania.
- Glucosa ($C_6H_{12}O_6$). Fabricante: Loba Chemie. Peso neto: 500 gr. India.
- Inulina dalia. Fabricante: Sigma Chemical. Peso neto: 500 gr. Alemania.
- Peptona bacteriológica Z. Fabricante: Biocen. Peso neto: 500 gr. Cuba.
- Sacarosa ($C_2H_{22}O_{11}$). Fabricante: Loba Chemie. Peso neto: 1 Kg. India.

- Sulfato de amonio granulado ((NH₄)₂SO₄). Fabricante: Mallinckrodt. Peso neto: 1 Kg. Francia.
- Sulfato de magnesio heptahidratado (MgSO₄·7H₂O). Sigma Chemical. Peso neto: 500 gr. Alemania.

3.2.4. Equipos e instrumentos

- Agitador de tubos Max-Mix. Marca Thermolyne. Modelo N° M-37615.
- Agitador orbital Shaker. Marca Line. Modelo 4628-1.
- Centrífuga. Marca Sartorius AG. Modelo Sigma 2-16pk.
- Balanza analítica. Marca Precisa Gravimetrics AG. Modelo 4628-1.
- Equipo de baño maría. Marca Biotron. Modelo Electronic Thermostat Btr-65.
- Espectrofotómetro UV-Visible. Marca Unico. Modelo 2800 E.
- Estufa. Marca Selecta. Modelo 209.
- Incubadora. Marca Oster clásica. Modelo 450-20.
- Micropipetas de 200-1000 um. Marca Brand. Modelo Transferpette.
- Olla a presión. Marca Record. Capacidad de 7.5 L.
- pH-metro. Marca WTW. Modelo Inolab pH level 2.
- Refrigerador. Marca Phillips. Volumen 12 pie³.

3.3. Métodos de Análisis

3.3.1. Determinación de la Acidez

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

3.3.2. Determinación del pH

Se determinó por el método potenciométrico recomendado por la AOAC (1995).

3.3.3. Determinación de cenizas

Se determinó por incineración de la muestra a 600°C por 4 horas según AOAC (1995).

3.3.4. Determinación de °Brix

Se determinó mediante método refractométrico recomendado por AOAC (1995).

3.3.5. Determinación de Humedad

La humedad del tubérculo se determinó por secado y diferencia de los pesos de acuerdo al método 934.06 (37.1.10) del AOAC (1996).

3.3.6. Determinación de Azúcares Reductores

Se determinó por el método de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) según Miller (1959).

3.3.7. Determinación de la Actividad Enzimática

La actividad enzimática (U/ml) se determinó midiendo la velocidad inicial de la producción de azúcares en condiciones controladas. Una muestra de 0.25ml de enzima, se añadió a 2.5ml de solución estándar de sacarosa de 20g/l o inulina 10g/l, a pH 5.0 y se mantuvo a 55°C durante un tiempo de 10 minutos.

3.4. Metodología

3.4.1. Acondicionamiento de la materia prima

Para el acondicionamiento de la materia prima se siguió la metodología de Castillo (2011).

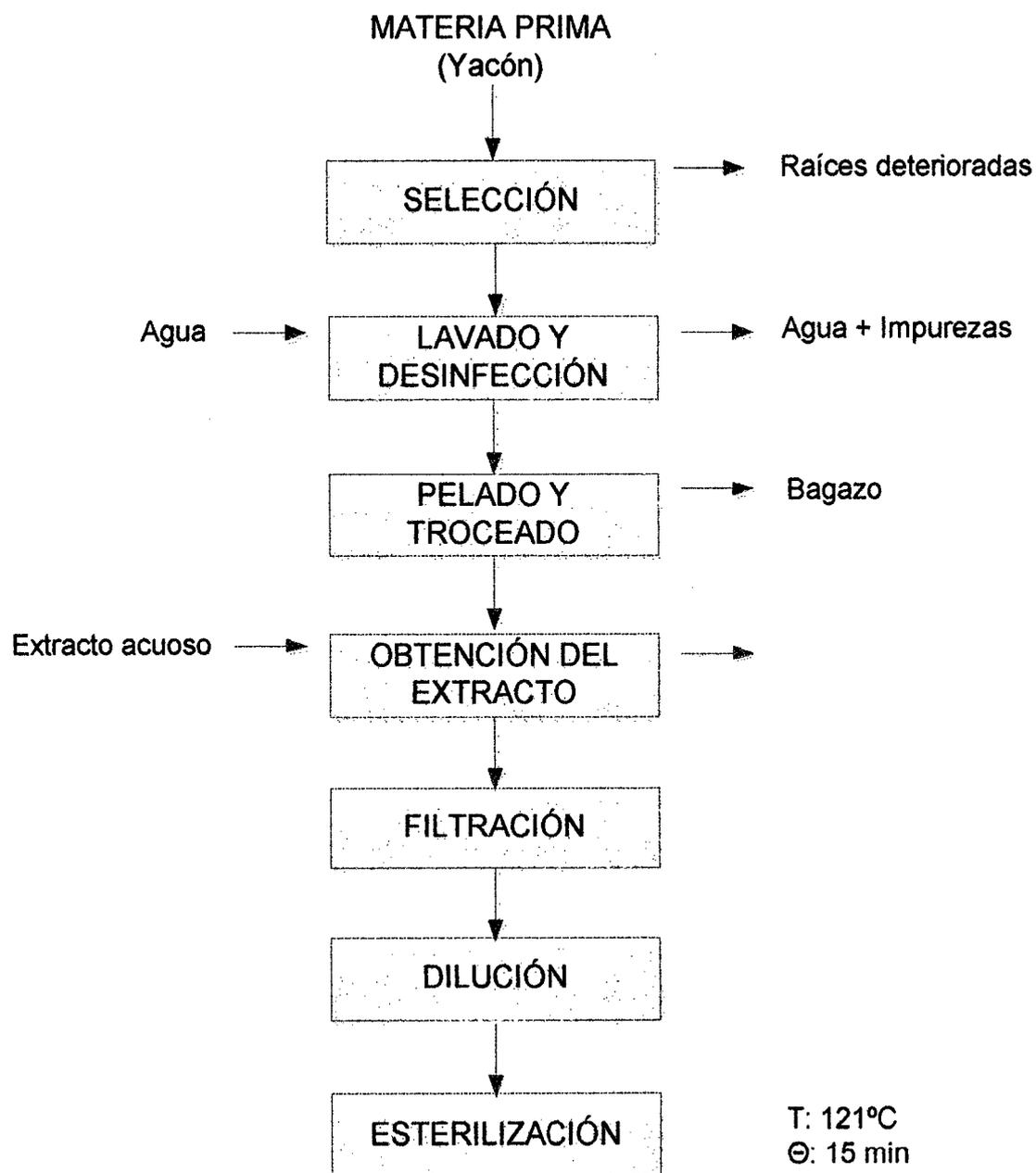


Figura 9. Acondicionamiento de la materia prima

- ✓ **Selección:** Se descartó aquella materia prima que no fue aceptable para el procesamiento, es decir dañada por abrasiones en la cáscara, daños físicos por transporte, deterioro microbiano, coloración manchada y contaminación en general.
- ✓ **Lavado y desinfección:** Se realizó con abundante agua, frotando las raíces unas con otras y empleando una escobilla que facilitó la remoción de la tierra adherida a la superficie de las raíces. Posteriormente, sumergimos las raíces en una solución clorada (200 ppm de cloro residual) por 5 minutos para disminuir la carga microbiana.
- ✓ **Pelado y troceado:** Se realizó manualmente con cuchillos y cortando las raíces en cubos para facilitar la obtención del extracto. Los cubos obtenidos se sumergieron en agua tibia para evitar su pardeamiento.
- ✓ **Obtención del Extracto:** Se utilizó un extractor de jugos para disminuir tiempos de operación y evitar el pardeamiento.
- ✓ **Filtración:** Se realizó con una membrana porosa, forzando el paso del extracto a través de ella para eliminar los restos del bagazo presente.
- ✓ **Dilución:** Con esta etapa se estandarizó el extracto de yacón, añadiendo volúmenes de agua hasta diluir a 8°Brix. A su vez, se utilizó ácido ortofosfórico 1M para regular el valor de pH igual a 4.0
- ✓ **Esterilización:** El extracto se esterilizó a 121°C por 15 minutos, luego se dejó enfriar para luego envasar en botellas de vidrio y se almacenó en refrigeración para su posterior utilización.

En la Figura 10 se observan los frascos de vidrio conteniendo el extracto de yacón preparado para el medio de fermentación.



Figura 10. Extracto de yacón

3.4.2. Obtención y precipitación de Inulinasa

Para purificación de la enzima por la precipitación siguió la metodología de Golunski *et al.*, (2011).

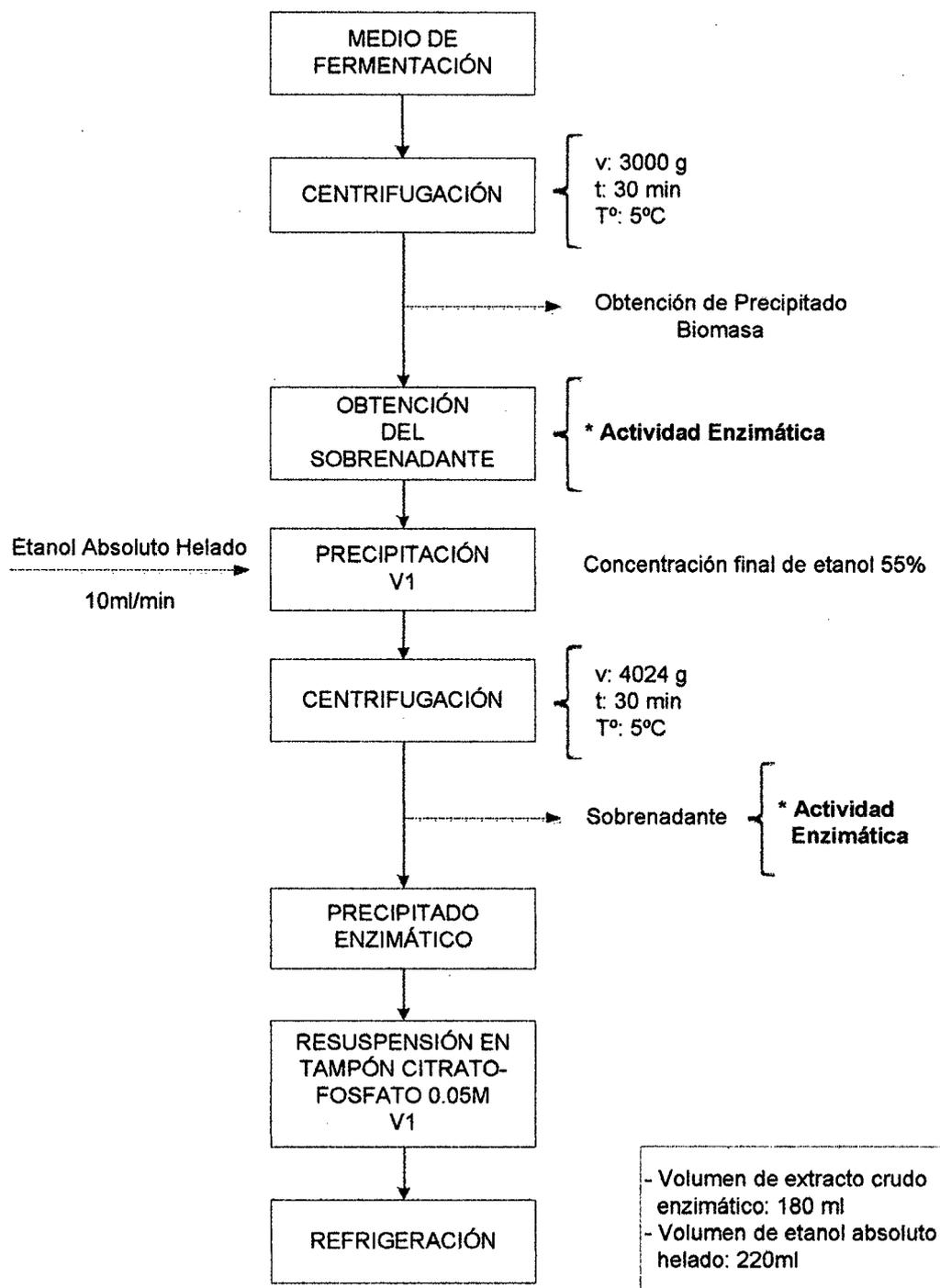


Figura 11. Obtención y precipitación de inulinasa

3.4.2.1. Fermentación

Se preparó suficiente inóculo inicial en matraces Erlenmeyer de 125 ml conteniendo cada uno 30 ml de medio de activación celular. El medio se inoculó con una azada de células mantenidas en un agar inclinado, previamente activadas, se dejó cultivar en un shaker a 30 °C y 180 rpm durante 10 horas. El inóculo se guardó en refrigeración y cada volumen a usar se activó previamente por una hora en la incubadora a 30 °C.

La cinética se realizó en 3 matraces Erlenmeyer de 500 ml conteniendo 100 ml de medio de fermentación incluyendo el 4.275% (v/v) de inóculo, incubados a 30 °C, pH inicial 4.0 y agitados en shaker a 150 rpm por 30 horas, tomándose muestras planificadas de 5 ml cada una.

Para la preparación de los medios de cultivo se siguió la metodología de Castillo A. (2013) y en el Cuadro 5 se muestra la composición de los medios de cultivo para *K. marxianus*.

Cuadro 5. 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	Extracto de yacón %(v/v) Extracto de levadura KH ₂ PO ₄ (NH ₄) ₂ SO ₄ MgSO ₄ .7H ₂ O pH ₀ 4,0 T 30°C, N 150 rpm	26,2 10,0 1,0 10,0 0.386

Castillo A., 2013.

3.4.2.2. Obtención del Extracto Enzimático

Para la obtención del extracto enzimático se siguió la metodología de Castillo (2013).

- **Centrifugación:** Se centrifugó el extracto enzimático obtenido, a 2800 RPM por 30 minutos a 5°C. El objetivo fue eliminar las partículas presentes en el caldo de fermentación. Se recuperó el sobrenadante para los pasos posteriores.
- **Precipitación:** Se utilizó el extracto de enzima bruta para concentrarlo adicionando etanol al 55%, gota a gota a 10ml/min bajo agitación constante y usando una bomba peristáltica. La solución del extracto de enzima bruta se mantuvo a 5°C durante toda la adición y la solución de etanol a temperatura de refrigeración.
- **Resuspensión:** Después de adicionar el etanol, se centrifugó la muestra a 5000 RPM durante 30 minutos a 5°C. El precipitado obtenido fue disuelto en tampón citrato-fosfato pH 5.0 para proceder a la medición de la actividad enzimática.

Se requirieron 500 ml de enzima precipitada para todas las mediciones de actividad enzimática previstas en la investigación.

3.4.2.3. Cinética de Activación y Desactivación Térmica

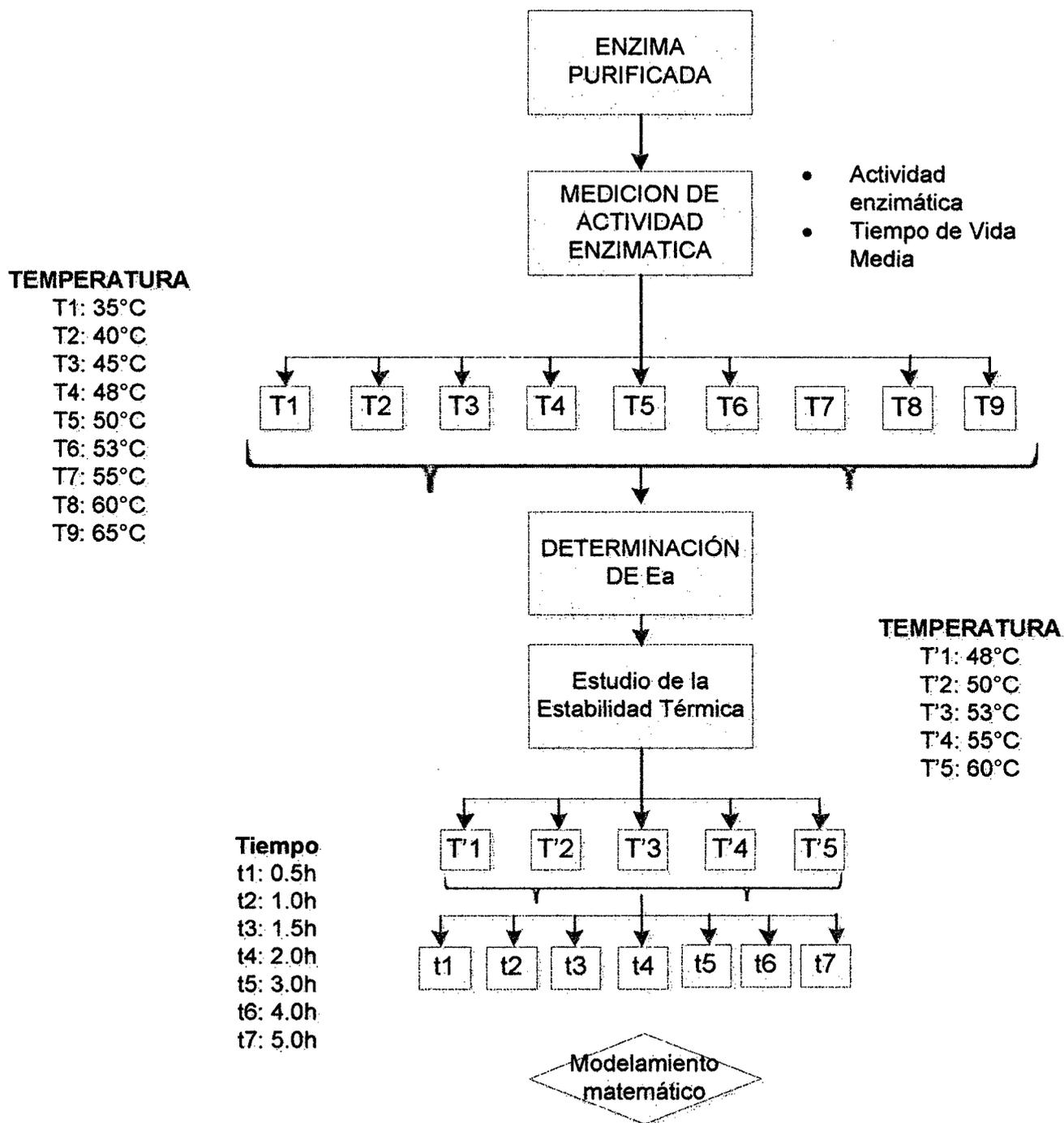


Figura 12. Diseño Experimental para el modelamiento matemático de la estabilidad térmica de la Inulinasa.

3.4.2.3.1. Medición de la Actividad Enzimática

Para la determinación de actividad enzimática se siguió la metodología de Castillo A. (2011), la cual se detalla en la Tabla 4.

Se determinó la actividad enzimática sobre sacarosa e inulina en condiciones controladas; las cuales fueron; muestras de 0.25 ml de enzima y 2.5 ml de solución estándar de sacarosa 20g/L , por **un tiempo total de 10 minutos** a T=55°C y a pH 5.0. En cada tiempo se midió la concentración de azúcares reductores por el Método DNS.

Para la actividad enzimática sobre inulina, se tomaron muestras de 0.25 ml de enzima y 2.5 ml de solución estándar de inulina 10g/L., por **un tiempo total de 10 minutos** a T=55°C y a pH 5.0. En cada tiempo se midió la concentración de azúcares reductores por el Método DNS.

Tabla 4. Medición de la actividad enzimática

Tubo	Volumen Solución Estándar (ml)	Volumen Solución Enzima (ml)	Volumen Agua destilada (ml)
1	2.5	0.25	0
2	2.5	0.25	0
Blanco enzima	0	0.25	2.5
Blanco Sustrato	2.5	0	0

3.4.2.3.2. Efecto de la temperatura en la actividad enzimática

El efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática fue estudiado incubando la solución enzimática bajo diferentes condiciones. El rango de temperaturas fue 48-60 °C.

El procedimiento se realizó utilizando sacarosa (20 g/L) e inulina (10 g/L), ambas disueltas en tampón citrato-fosfato pH 5.

3.4.2.3.3. Modelamiento matemático de la estabilidad térmica de la Inulinasa

El modelamiento matemático de la estabilidad térmica de la Inulinasa de *Kluyveromices marxianus* se realizó utilizando el modelo presentado por Santos *et al.*, (2007), los pasos a seguir se detallan a continuación:

La actividad enzimática o velocidad de reacción puede ser expresada mediante una ecuación, donde K es la constante cinética y E la concentración de enzima activa. Así también se tiene que K varia con la temperatura, y tal variación puede ser expresada en función de una ecuación de tipo Arrhenius:

$$v = KE \quad (1)$$

$$K = K_0 e^{-E_a/RT} \quad (2)$$

Donde:

v: Velocidad de reacción enzimática

K: Constante cinética (min⁻¹)

K₀: Constante (min⁻¹)

E: concentración de enzima activa (μmol ml⁻¹)

E_a: Energía de activación (Kcal/mol)

T: Temperatura absoluta (K°)

Debemos considerar que a altas temperaturas, la cinética de desactivación térmica se convierte en un factor importante pues se relaciona con la actividad de la enzima y sus implicancias en los procesos industriales. Considerando el efecto de la temperatura en la estabilidad enzimática, debemos incluir otros términos en las ecuaciones, el cual deberá predecir el decaimiento enzimático.

Las siguientes ecuaciones se utilizan asumiendo que la desnaturalización de la Inulinasa es una reacción de primer orden:

$$\frac{dE}{dt} = -K_d \cdot E \quad (3)$$

$$E = E_o \cdot e^{-K_d \cdot t} \quad (4)$$

Donde:

E_o: Concentración de enzima activa en el punto inicial, se considera en el tiempo cero.

K_d: Constante de desnaturalización dependiente de la temperatura. También se representa por una ecuación del tipo Arrhenius.

K_{do}: Constante (min⁻¹)

$$K_d = K_{do} \cdot e^{-E_d/RT} \quad (5)$$

Donde:

E_d: Constante de energía de desactivación para la desnaturalización de la enzima (Kcal/mol)

Utilizando las ecuaciones anteriores, se puede expresar la actividad enzimática *v* en función de la temperatura. La ecuación presentada es el modelo matemático presentado y desarrollado por SANTOS, et al, 2006.

$$v = v_o \cdot \exp\left(-\frac{E_a}{RT}\right) \cdot \exp\left[-\left(K_{do} \cdot \exp\left(-\frac{E_d}{RT}\right)\right) \cdot t\right] \quad (6)$$

La concentración de enzima *E*, la cual es significativa a altas temperaturas. Las constantes *K_o* y *E_o* son agrupadas en una constante denominada *v_o*.

La estabilidad térmica de la enzima es un parámetro importante en el diseño de reactores enzimáticos, la cual puede ser expresada por el tiempo de vida media como se muestra en las ecuaciones (7) Y (8),

las cuales son obtenidas de la ecuación (4), sustituyendo E por $E_0/2$ y Kd por su respectiva expresión de (5).

$$\text{Ln}\left(\frac{\frac{E_0}{2}}{E_0}\right) = -Kd * \tau \quad (7)$$

$$\tau = \frac{0.69}{Kd_0 * e^{-E_d/RT}} \quad (8)$$

En base a la ecuación (6) se obtendrán los valores teóricos para la actividad enzimática v así como el tiempo de vida media τ , utilizando la ecuación (8)

Los valores así obtenidos para la actividad enzimática y el tiempo de vida media serán evaluados según las siguientes relaciones:

$$P1 = \frac{v}{v_{\max}}$$

$$P2 = \frac{\tau}{\tau_{\max}}$$

Donde:

v_{\max} : Actividad enzimática máxima determinada por el modelo matemático o experimentalmente.

τ_{\max} : Tiempo de vida media máximo determinado por el modelo matemático o experimentalmente.

Los valores de las relaciones P1 y P2 serán evaluadas en un gráfico X-Y en relación a la temperatura de determinación de la actividad enzimática.

En el mismo gráfico se tendrán así 02 curvas características.

La temperatura óptima para el proceso enzimático y que proporcione un tiempo de vida media adecuado, se determinará interceptando las curvas características proporcionadas por el modelo matemático.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Determinación de las características fisicoquímicas de la Materia prima

Con el conocimiento de la composición fisicoquímica de los alimentos, de su contenido, podemos determinar los parámetros que nos informan de su calidad; por ello a la materia prima se le realizaron pruebas como: humedad, cenizas, pH, °Brix, acidez titulable, para caracterizar el yacón los resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Características fisicoquímicas del Yacón.

CARACTERÍSTICAS	VALOR
Humedad (%)	89.2151
Cenizas (%)	2.6782
pH	6.34
°Brix	14.8
Acidez titulable (%ácido cítrico)	0.28

El contenido de la humedad de la pulpa de yacón fue de 89.2151%; el cual se encuentra dentro de lo referido por Lizárraga *et al.*, (1997) siendo el rango de humedad 70% a 93%, a su vez es superior a lo obtenido por Chirinos *et al.*, (2003), de 82.32% de humedad.

Vilhena *et al.*, (2000), refiere un pH 5.53 para la pulpa de yacón; inferior a 6.34 que se obtuvo en el presente trabajo de investigación; sin embargo, es lo más cercano reportado por Chirinos *et al.*, (2003) pH 6.61. Asimismo el contenido de sólidos solubles del yacón fue de 14.8°brix, mientras que el valor más próximo es reportado por Palomino y Ríos (2004) 13.5°brix, también nos refiere Chirinos *et al.*, (2003) 15.4°brix. En lo que respecta a la acidez titulable se obtuvo 0.28% que es más cercano a lo que reporta Chirinos *et al.*, (2003) con 0.297% de acidez.

Palomino y Ríos (2004), sostienen que en un proceso de maduración del yacón, el pH y los sólidos solubles totales aumentan y la acidez total titulable disminuye. Por tanto, la diferencia entre los valores de pH, °Brix y acidez, pueden ser debido al grado de maduración y la variedad de yacón.

El estudio conducido por Vilhena *et al.*, (2000), determinó que la composición química del yacón presentó valores de 0.5% de cenizas.

En la investigación del yacón realizada por Chirinos *et al.*, (2003) encontraron 2.65% de cenizas, resultado bastante próximo al del presente trabajo 2.6782% de cenizas.

En la Figura 13 se muestra la medición del pH del extracto de yacón.



Figura 13. Análisis Físicoquímico del extracto de Yacón.

4.2. Estudio de la actividad enzimática en el extracto crudo, enzima purificada y sobrenadante.

Se evaluó la actividad enzimática del extracto crudo, sobrenadante resultado de la centrifugación y de la enzima purificada. Los resultados se muestran en el cuadro 6.

Cuadro 6. Actividad enzimática del extracto crudo, enzima purificada y sobrenadante.

	Enzima	Sustrato	
		Sacarosa (20 g/L)	Inulina (10 g/L)
DILUCIÓN 1:3	Enzima cruda	63.6578	3.5948
	Sobrenadante	0.4366	0.4502
	Enzima purificada	47.0926	3.0901
	Pérdidas en la Purificación (%)	26.02	14.04

Castillo (2013), determinó actividades volumétricas de 87.15 UI/ml y 3.35 UI/ml para el extracto crudo enzimático actuando sobre sacarosa (20g/L) e inulina (10g/L) respectivamente.

En el concentrado enzimático, obtenido mediante purificación con etanol, se determinaron actividades volumétricas de 47.0926 UI/ml y 3.0901 UI/ml para el extracto crudo enzimático actuando sobre sacarosa (20g/L) e inulina (10g/L) respectivamente.

Del análisis comparativo de los valores de actividad volumétrica en el extracto crudo y el concentrado enzimático del cuadro 6, se observa que el proceso de precipitación por etanol, origina pérdidas de 26.02% y 14.04% en actividad invertasa e inulinasa respectivamente.

Lo anterior puede explicarse debido a que al proceso de precipitación de proteínas por etanol logra remover inhibidores enzimáticos presentes en el medio de fermentación, sin embargo el etanol concentrado influye sobre el poder catalítico de la enzima, lo cual se expresa en una mayor pérdida de la actividad invertasa, pues los sitios activos de la enzima tienen mayor afinidad por la inulina (Castillo, 2013).

Es probable que la baja estabilidad térmica del concentrado enzimático sea consecuencia de la desnaturalización de la enzima y la inactivación de un número de sitios activos por efectos del etanol durante la etapa de precipitación y el efecto de la temperatura (Castillo, 2013).

Las inulinasas frecuentemente poseen cierta actividad invertasa, lo cual significa que pueden hidrolizar sacarosa en fructosa y glucosa. En este punto, la distinción entre inulinasas e invertasas, las cuales constituyen el grupo de B-fructosidasas es necesaria. Es una práctica común distinguir a las inulinasas de las invertasas de acuerdo al ratio α =inulinase activity/invertase activity.

La determinación se realiza según los valores de la Tabla 6.

Tabla 6. Ratio para la determinación de naturaleza invertasa/inulinasa

Actividad	Valor de α
Inulinasa	>0.01
Invertasa	<0.0001

Fuente: Baratti y Ettalibi, 1987

Así la enzima inulinasa producida por la cepa en estudio es considerada como Inulinasa, debido a que el valor del ratio calculado (0.066) es mayor a 0.01.

Los valores del ratio α medidos durante trabajos experimentales en inulasas de diferentes fuentes confirman los resultados de Pandey et

al., (1999) en torno a que la actividad inulinasa es mucho mayor en las enzimas producidas por levaduras que en las producidas por hongos.

Otros autores reportaron valores del ratio distintos al obtenido en la presente investigación; Derycke y Vandamme., (1984) estudiaron la inulinasa de *Aspergillus niger* y determinaron $\alpha=1.2$; Derycke y Vandamme., (1983) determinaron $\alpha=3.46$ para inulinasa de *Kluyeromices fragilis*.

Es importante destacar que existen pocos casos de enzimas con actividad inulinasa o solo actividad invertasa, generalmente, una enzima muestra ambas actividades, pero en distinta magnitud. Sin embargo, la actividad invertasa de las inulinasas también es deseable, puesto que es necesario hidrolizar el último enlace, formado por una unidad de glucosa y de fructosa, remanente de la acción completa de la enzima sobre la cadena de inulina (Ricca *et al.*, 2007).

4.3. Efecto de la temperatura en la actividad enzimática

Se estudió el efecto de la temperatura en la actividad enzimática del concentrado enzimático de Inulinasa, actuando sobre solución de sacarosa con concentración de 20 g/L.

Se evaluó el efecto de la temperatura en la actividad enzimática de la inulinasa actuando sobre sacarosa (20 g/L) en el rango de temperatura de 35 a 65°C. Se tiene un valor máximo de actividad de 47.0926 UI/ml se logra a 55°C, a temperaturas mayores la actividad disminuye. Los resultados se pueden visualizar en la Tabla 7 y la Figura 14.

Tabla 7. Efecto de la temperatura sobre la actividad invertasa de la enzima.

T (°C)	Av (UI/ml)
35	17.0696
40	22.7986
45	31.6158
48	37.1512
50	41.2323
53	44.3500
55	47.0926
60	31.4544
65	7.8978

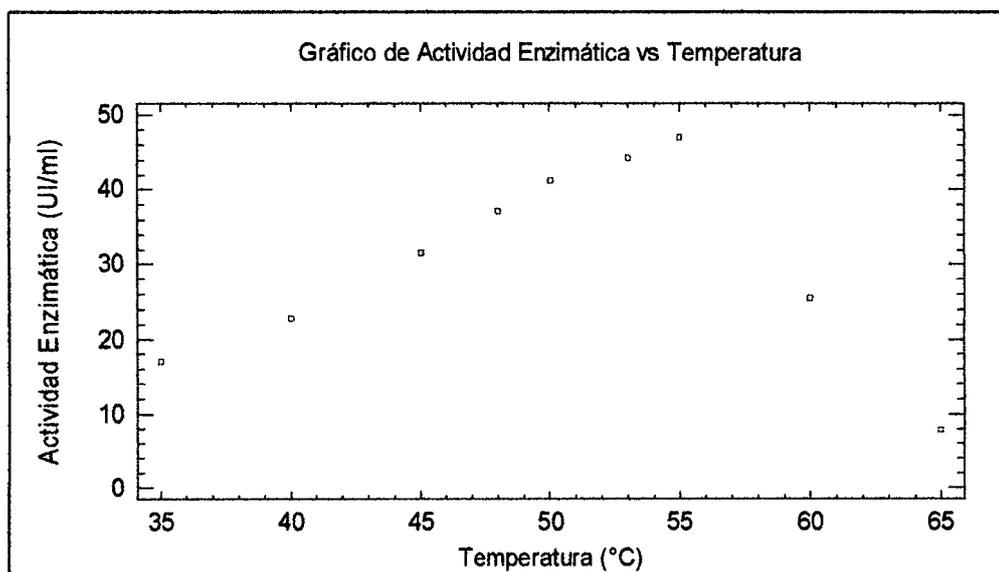


Figura 14. Efecto de la temperatura en la actividad invertasa de la enzima.

En el caso de la inulinasa actuando sobre inulina (10 g/L) también se tiene un valor máximo de actividad de 3.090 UI/ml a 55°C, de igual forma que en el caso anterior la actividad disminuye para valores de temperatura superiores, tal como se aprecia en la Tabla 8 y la Figura 15.

Tabla 8. Efecto de la temperatura en la actividad inulinasa de la enzima

T (°C)	Av (UI/ml)
35	1.400
40	2.000
45	2.480
48	2.600
50	2.720
53	2.956
55	3.090
60	1.120

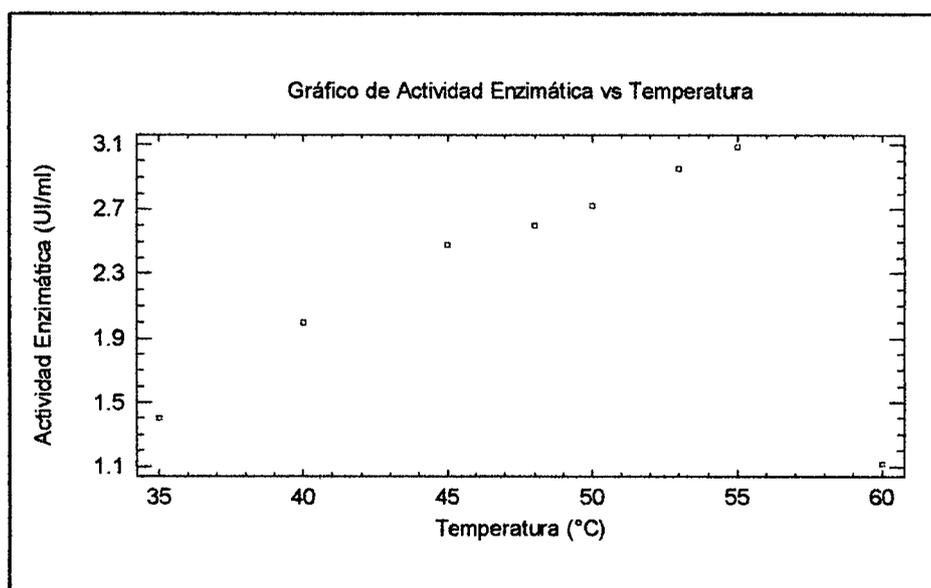


Figura 15. Efecto de la temperatura en la actividad inulinasa de la enzima

En relación a la temperatura de reacción, se ha observado que la actividad enzimática de la inulinasa incrementa con la temperatura, hasta alcanzar valores máximos a 55°C (Cazzeta *et al.*, 2005).

Para ambos casos se observa la gráfica característica para el efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática, una campana donde el máximo valor de actividad enzimática corresponde a una temperatura denominada óptima.

Ello se explica porque la temperatura actúa sobre la actividad enzimática de la misma forma como un catalizador enzimático, hasta un valor óptimo, a partir del cual la actividad decrece debido a la desnaturalización térmica (Zhou y Chen., 2001).

En otros trabajos de investigación se ha utilizado extracto de yacón para la producción de inulinasas.

Se tiene actividad enzimática máxima de 4.1 UI/ml para sustrato sacarosa, para concentraciones de extracto del 30 y 40% y utilizando inulinasa de *Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus* ATCC 16045. (Cazetta et al., 2005).

Kato et al., (1999), mostraron que la inulinasa soluble de *Bacillus stearothermophilus* KPI289 tuvo temperatura óptima de 60°C, mientras que Cruz-Guerrero et al., (1995) verificaron que la inulinasa de *K. marxianus* CDBB-L-278 logró su máxima actividad y buena estabilidad a 50°C.

Santos et al., (2007) obtuvieron valores de temperatura óptima de 63°C para la enzima libre y 52.5°C para la enzima inmovilizada, actuando sobre sacarosa.

Así mismo se ha determinado que la temperatura óptima para la actividad enzimática del extracto crudo de inulinasa de *Saccharomyces sp* sobre inulina 2% es 50°C (Oluwaseun y Abiodun, 2012).

Se obtuvo la máxima actividad enzimática (6.46 UI/ml) para la Inulinasa actuando a 60°C en inulina (1.1%) (Dhiman, 2013).

El tiempo de fermentación para nuestra experiencia fue de 30 h, según Castillo A., (2013). Sin embargo, Cazetta et al., (2005) al trabajar con la misma levadura sólo mantiene la fermentación por espacio de 16 h, tiempo menor al reportado por otros autores cuyos cultivos celulares mantienen la fermentación por espacio de 48 h para *Kluyveromyces marxianus*, 72 h para *Penicillium sp*, y 110 h para *Aspergillus niger* (Parekh y Margaritis, 1985).

El hecho de que la inulina sea una enzima estable a altas temperaturas, es un factor interesante desde el punto de vista industrial (Ettalibi y Baratti, 2001)

El pH para el proceso de fermentación se considera constante en 4.0, según Castillo (2013).

En relación al pH para la reacción enzimática, las inulinasa microbianas son descritas como estables en el rango de 3.5 a 6.5 (Zittan L., 1981).

Para *Kluyeromices sp* Y-85 la máxima actividad inulinasa fue obtenida a pH 4.5 (Wenling et al., 1999) y a a pH 4.7 para *Aspergillus ficuum* (Ettalibi y Baratti, 2001).

4.4. Cálculo de la Energía de activación enzimática

La constante de energía de activación se determinó mediante regresión lineal de acuerdo a las figuras 16 y 17 elaboradas en el Software Statgraphics Centurión XV, los resultados se muestran a continuación en la Tabla 9, así mismo los datos utilizados para el cálculo se muestran en las Tablas 10 y 11.

Tabla 9. Valores de Energía de Activación de Inulinasa actuando sobre Sacarosa (20 g/L) e Inulina (10 g/L)

Sustrato	Ea (Kcal/mol)	Ea(KJ/mol)
Sacarosa (20 g/L)	10.4695	43.76
Inulina (10 g/L)	7.1039	29.69

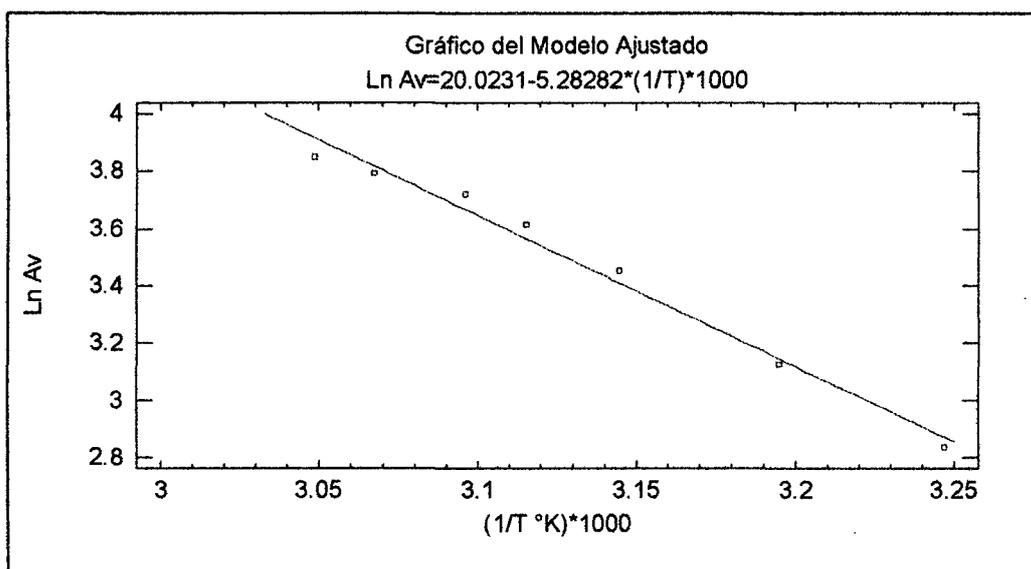


Figura 16. Cálculo de la Energía de Activación de Inulinasa actuando sobre sacarosa (20 g/L)

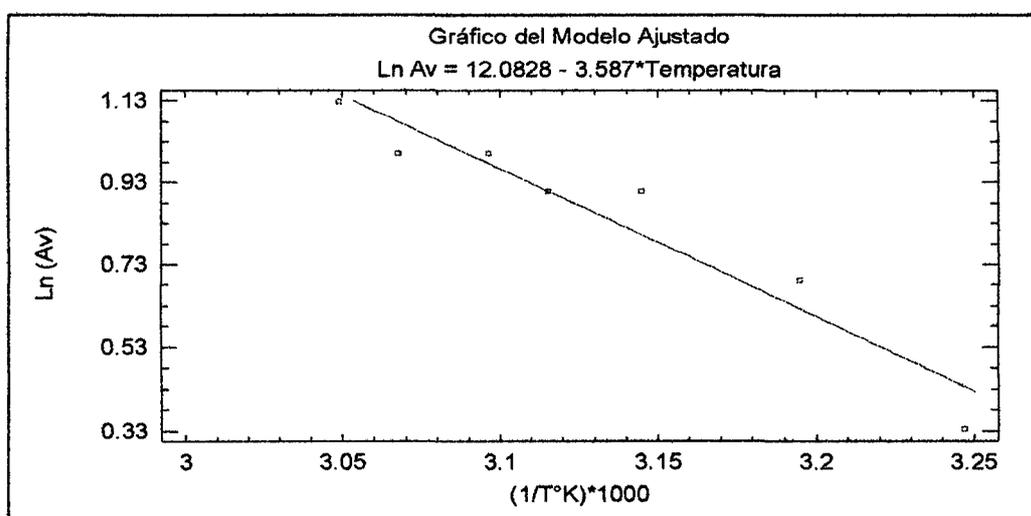


Figura 17. Cálculo de la Energía de Activación de Inulinasa actuando sobre inulina (10 g/L)

Tabla 10. Valores de Av y Temperatura para cálculo de la Energía de activación de Inulinasa actuando sobre Sacarosa (20 g/L)

T (°C)	Av	Ln (Av)	T (°K)	1/T (°K) *10 ³
35	17.0696	2.837	308.000	3.246753
40	22.7986	3.127	313.000	3.194888
45	31.6158	3.454	318.000	3.144654
48	37.1512	3.615	321.000	3.115265
50	41.2323	3.719	323.000	3.095975
53	44.3500	3.792	326.000	3.067485
55	47.0294	3.851	328.000	3.048780
60	31.4466	3.448	333.000	3.003003
65	7.8978	2.067	338.000	2.958580

Tabla 11. Valores de Av y Temperatura para cálculo de la Energía de activación de Inulinasa actuando sobre inulina (10 g/L)

T (°C)	Av (UI/ml)	Ln (Av)	T (°K)	1/T (°K) *10 ³
35	1.400	0.336	308.000	3.246753
40	2.000	0.693	313.000	3.194888
45	2.480	0.908	318.000	3.144654
48	2.600	0.956	321.000	3.115265
50	2.720	1.001	323.000	3.095975
53	2.956	1.084	326.000	3.067485
55	3.090	1.128	328.000	3.048780
60	1.120	0.113	333.000	3.003003

Tabla 12. Coeficientes de regresión para la relación entre Ln Av y (1/T) de la Inulinasa actuando sobre inulina (10 g/L)

Mínimos Cuadrados Estándar Estadístico				
Parámetro	Estimado	Error	T	Valor-P
Intercepto	12.0828	1.47521	8.1906	0.0004
Pendiente	-3.587	0.471128	-7.61365	0.0006

Tabla 13. Análisis de Varianza (ANOVA) para el modelo matemático que evalúa entre Ln Av y (1/T) de la Inulinasa actuando sobre inulina (10 g/L)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	0.385149	1	0.385149	57.97	0.0006
Residuo	0.033221	5	0.00664419		
Total (Corr.)	0.41837	6			

Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0.05, lo cual indica que existe una relación estadísticamente significativa entre (1/T °K) y Ln Av con un nivel de confianza del 95.0%.

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo ajustado explica 92.0594% de la variabilidad en Ln (Av). El coeficiente de correlación es igual a -0.959476, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables. De esta manera hemos definido la ecuación de regresión siguiente:

$$\text{Ln (Av)} = 12.0828 - 3.587 \cdot (1/T) \cdot 1000$$

Espinoza y Acuña (2013), obtuvieron un valor de la energía de activación de 7.508 Kcal/mol, para la reacción del extracto crudo enzimático de Inulinasa de *Kluyeromices marxianus* sobre sacarosa (20 g/L). Según Aldave y Jorrín (2010), determinaron el valor de energía de activación de la reacción de la invertasa de 9,41 Kcal/mol,

Espinoza y Acuña (2013) obtuvieron un valor de la energía de activación de 5.460 Kcal/mol, para la reacción del extracto crudo enzimático de Inulinasa de *Kluyeromices marxianus* sobre inulina (10 g/L).

4.5. Cálculo de la Energía de desactivación enzimática

La constante de energía de desactivación enzimática fue determinada en el rango de temperaturas de 48-60°C para el sustrato sacarosa y 48-55°C para el sustrato inulina, planteando $\ln(A_v)$ contra el tiempo (h), los resultados se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14. Valores de Energía de desactivación enzimática de Inulinasa actuando sobre sacarosa (20 g/L) e inulina (10 g/L)

Sustrato	Ed (Kcal/mol)	Ed (KJ/mol)
Sacarosa (20 g/L)	61.9173	258.81
Inulina (10 g/L)	27.7105	115.82

En las Tablas y Figuras descritas a continuación se presentan los resultados del estudio de la estabilidad térmica de la Inulinasa en los rangos de temperaturas mencionados.

Tabla 15. Medida de la Actividad enzimática residual de la Inulinasa actuando sobre sacarosa (20 g/L) en el intervalo de temperaturas de 48-60°C.

TIEMPO (h)	48°C	50°C	53°C	55°C	60°C
0	0	0	0	0	0
0.5	-0.4449359	-0.500	-0.75296859	-0.9058614	-4.44043484
1	-0.45790118	-0.628	-0.9603525	-1.22674442	-5.70433469
1.5	-0.52979944	-0.774	-1.43888484	-1.71153385	
2	-0.63892396	-0.853	-1.65025239	-2.40404631	
3	-0.85554621	-0.995	-2.42970644	-3.09686453	
4	-0.86231292	-1.325	-2.56323094	-4.23476708	
5	-0.98091985				

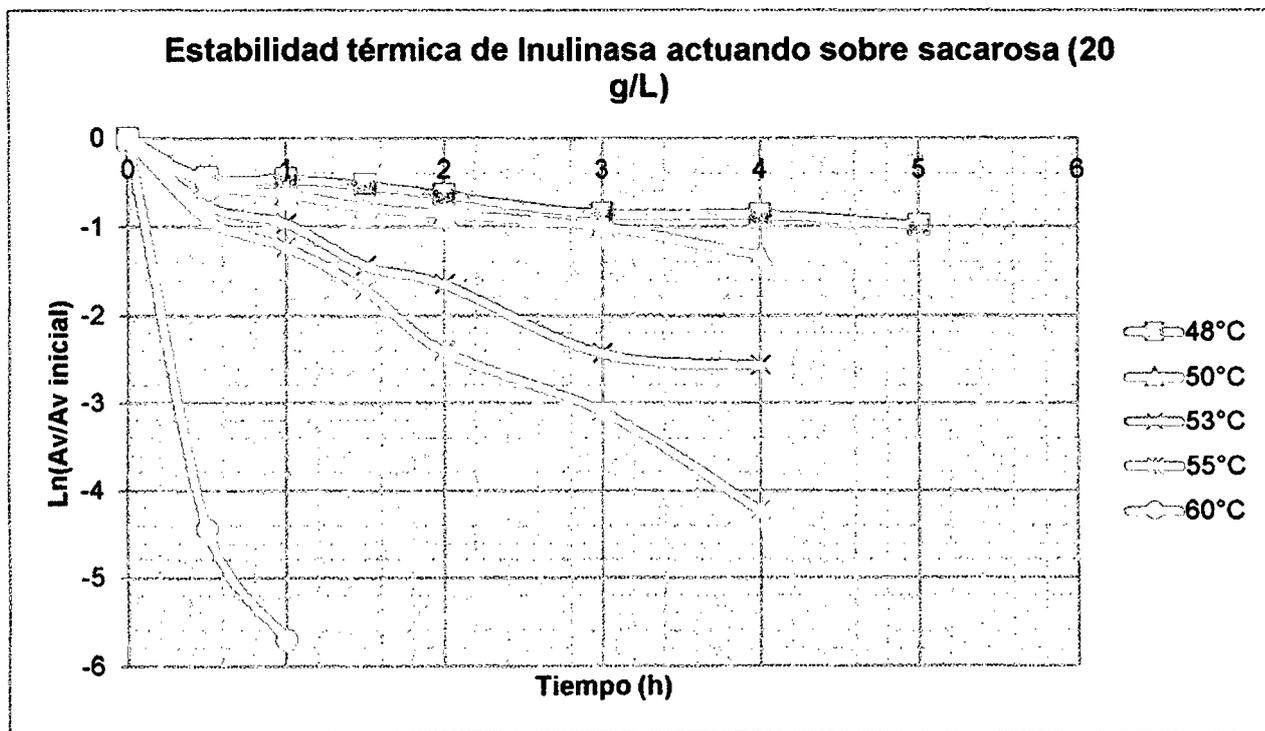


Figura 18. Estabilidad térmica de Inulinasa actuando sobre sacarosa (20 g/L)

En las siguientes Figuras presentamos los resultados del estudio de estabilidad térmica de Inulinasa actuando sobre sacarosa (20 g/L), evaluado a 48, 50, 53, 55 y 60°C.

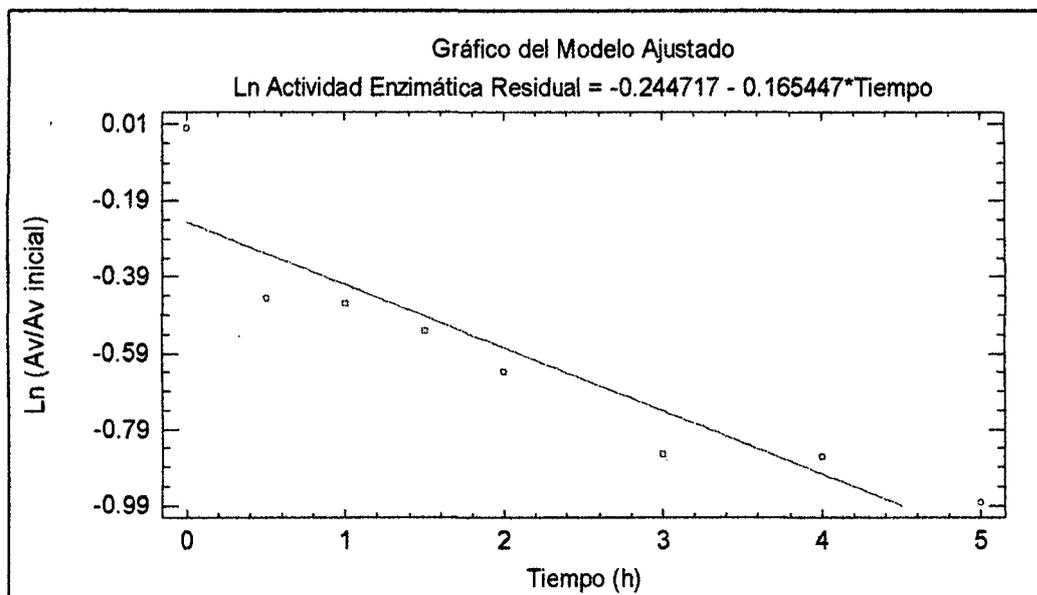


Figura 19. Estabilidad térmica de Inulinasa a 48°C, actuando sobre sacarosa (20 g/L)

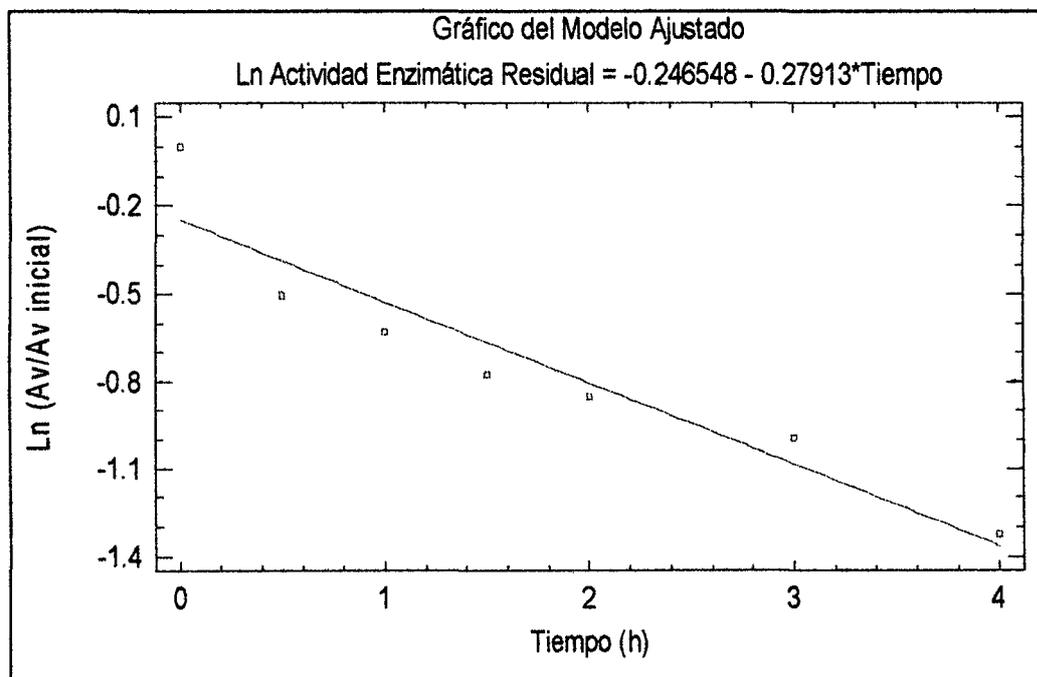


Figura 20. Estabilidad térmica de Inulinasa a 50°C, actuando sobre sacarosa (20g/L)

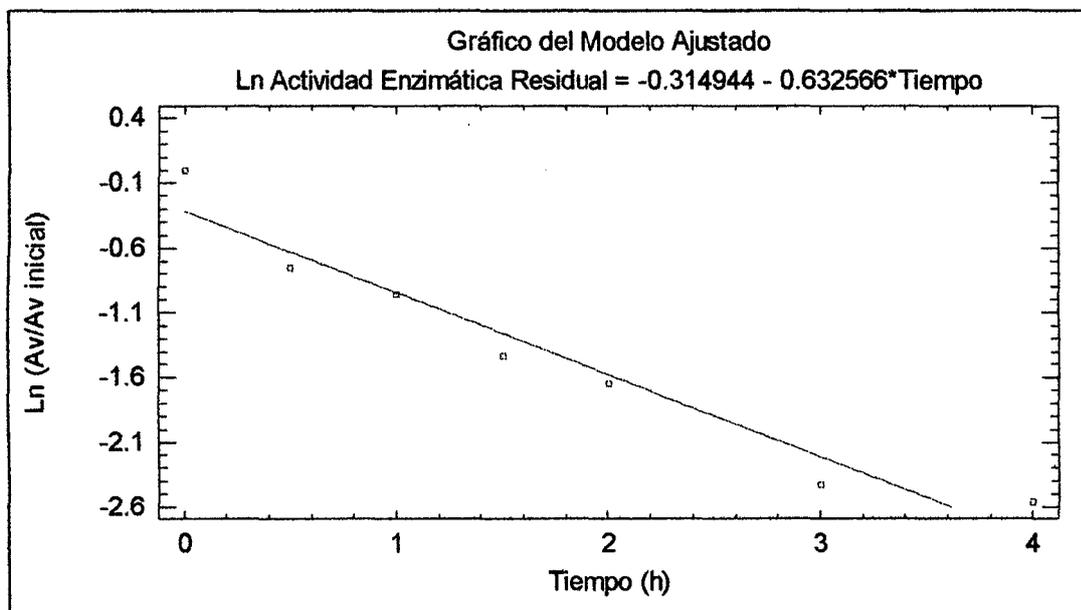


Figura 21. Estabilidad térmica de Inulinasa a 53°C, actuando sobre sacarosa (20 g/L)

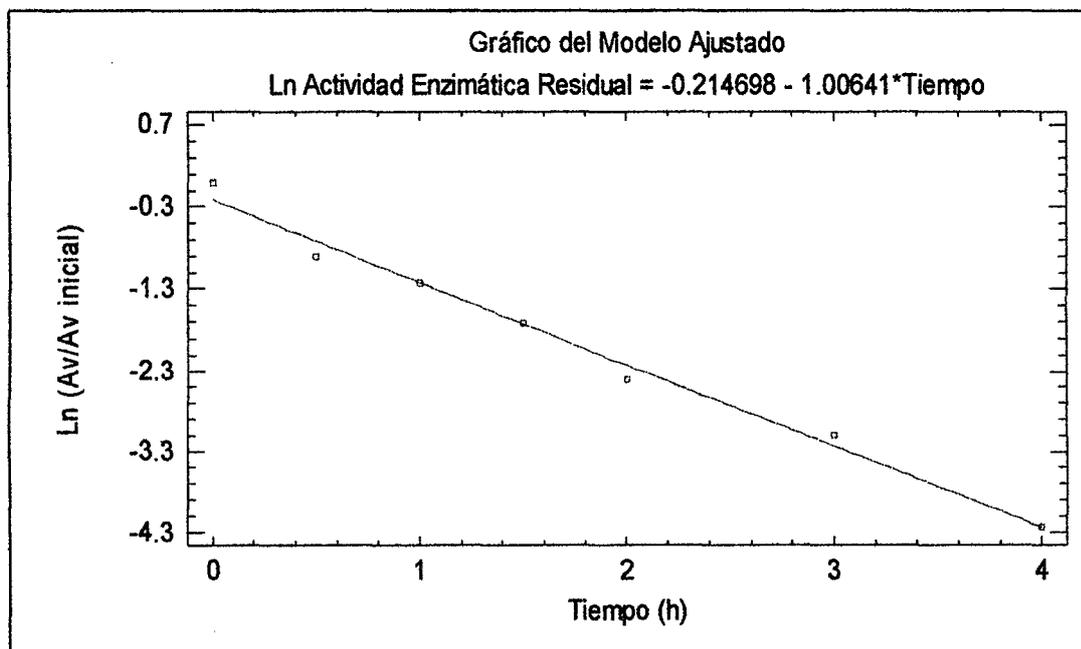


Figura 22. Estabilidad térmica de Inulinasa a 55°C, actuando sobre sacarosa (20g/L)

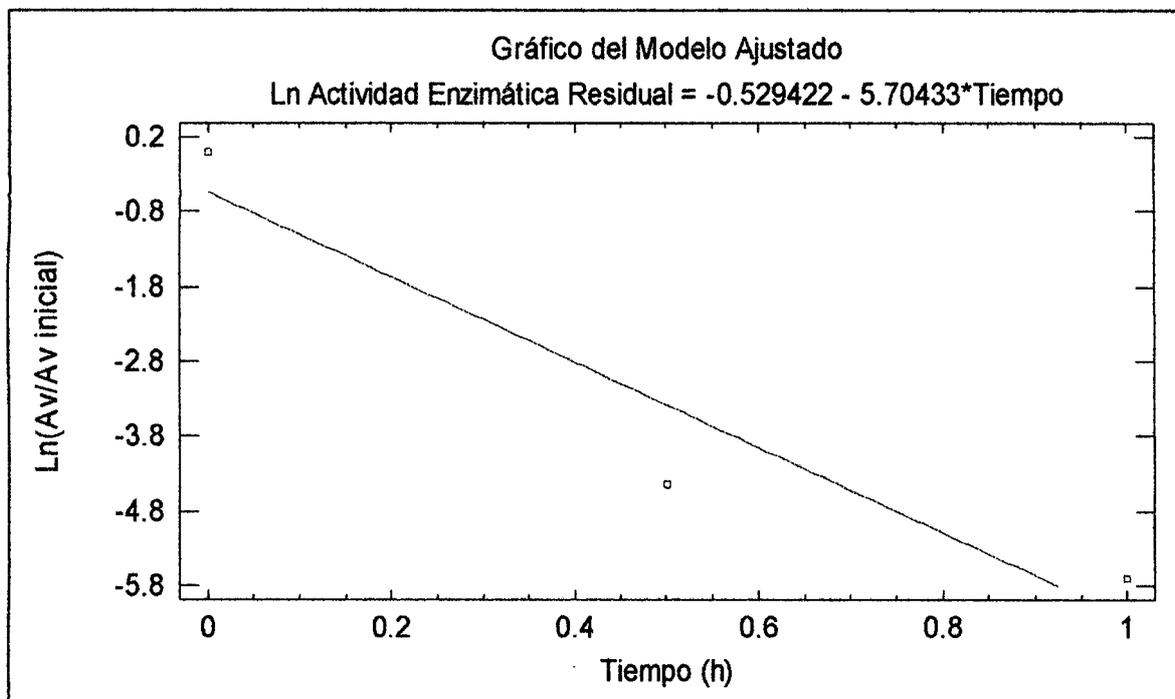


Figura 23. Estabilidad térmica de Inulinasa a 60°C, actuando sobre sacarosa (20 g/L)

Se calcularon las constantes de desnaturalización enzimática (K_d) por regresión lineal en cada una de las gráficas anteriores y según el rango de temperaturas establecido para estudiar la estabilidad térmica de la Inulinasa actuando sobre sustrato sacarosa (20 g/L), los resultados se muestran en la Tabla 16.

Tabla 16. Valores de la constante de desnaturalización enzimática a Kd en el rango de temperaturas de 48-60°C para sacarosa.

T (°C)	Kd (h ⁻¹)
48	0.1654
50	0.2791
53	0.6326
55	1.0064
60	5.7043

La constante Kd0 se determinó por regresión lineal utilizando los (Ln Kd) determinados previamente. Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 17 y la Figura 24.

Tabla 17. Valores para el cálculo de la Constante Kd0 para la Inulinasa actuando sobre sacarosa 20 g/L.

T (°C)	T (°K)	1/T	Kd	Ln(Kd)
48	321	3.115265	0.1654	-1.7994
50	323	3.095975	0.2791	-1.2762
53	326	3.067485	0.6326	-0.4579
55	328	3.048780	1.0064	-0.0064
60	333	3.003003	5.7043	1.7412

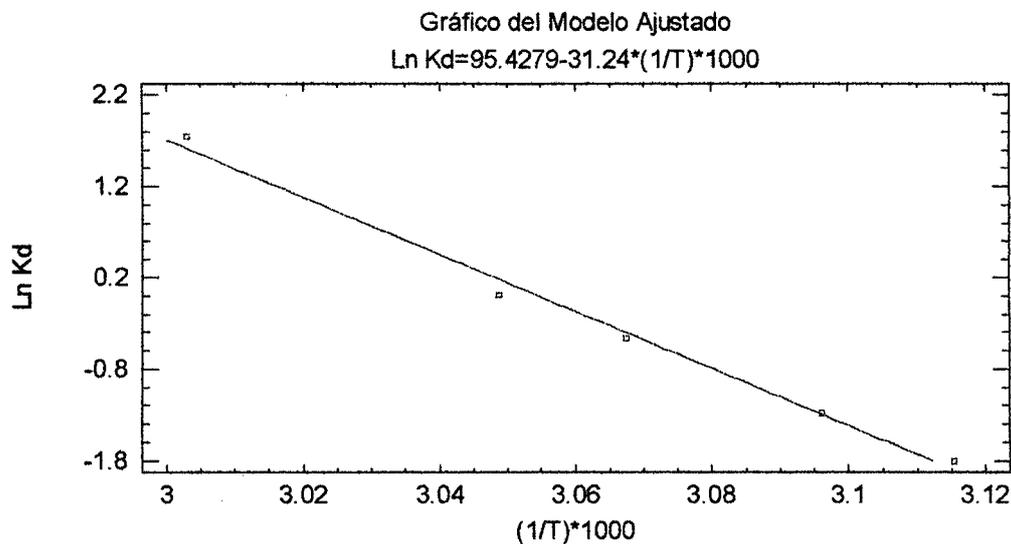


Figura 24. Cálculo de la Constante. K_d para la Inulinasa actuando sobre sacarosa (20g/L)

Tabla 18. Coeficientes de regresión para la relación entre $\text{Ln}(K_d)$ y $(1/T)$ de la Inulinasa actuando sobre sacarosa (20 g/L)

Mínimos Cuadrados Estándar Estadístico				
Parámetro	Estimado	Error	T	Valor-P
Intercepto	95.4279	4.97561	19.1791	0.0003
Pendiente	-31.24	1.62265	-19.2525	0.0003

Tabla 19. Análisis de Varianza (ANOVA) para el modelo matemático que evalúa entre $\text{Ln}(K_d)$ y $(1/T)$ de la Inulinasa actuando sobre sacarosa (20 g/L)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	7.41015	1	7.41015	370.66	0.0003
Residuo	0.0599	3	0.01999		
Total	7.47013	4			
(Corr.)					

La figura 24 muestra los resultados de ajustar un modelo lineal para describir la relación entre $\ln(K_d)$ y T . La ecuación del modelo ajustado es

$$\ln(K_d) = 95.4279 - 31.24 \cdot (1/T) \cdot 1000$$

Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre $(1/T \text{ } ^\circ\text{K})$ y $\ln(K_d)$ con un nivel de confianza del 95.0%.

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo ajustado explica 99.1971% de la variabilidad en K_d . El coeficiente de correlación es igual a -0.995974, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables. De esta manera hemos definido la ecuación de regresión siguiente:

$$\ln(K_d) = 95.4279 - 31.24 \cdot (1/T) \cdot 1000$$

En los gráficos y tablas descritos a continuación se presentan los resultados del estudio de la estabilidad térmica de la Inulinasa en los rangos de temperaturas mencionados.

Tabla 20. Medida de la Actividad enzimática residual de la Inulinasa actuando sobre inulina (10 g/L) en el intervalo de temperaturas de 48-60°C.

TIEMPO (h)	48°C	50°C	53°C	55°C	60°C
0	0	0	0	0	0
0.5	-0.07563173	-0.364	-1.04110875	-1.34511645	-3.40122974
1	-0.56294646	-1.016	-1.45254951	-1.49060907	-3.87707565
1.5	-1.57261731	-1.616	-2.00527347	-1.66093391	
2	-1.94148643	-1.673	-2.12787579	-3.28236854	
3	-3.12036699				

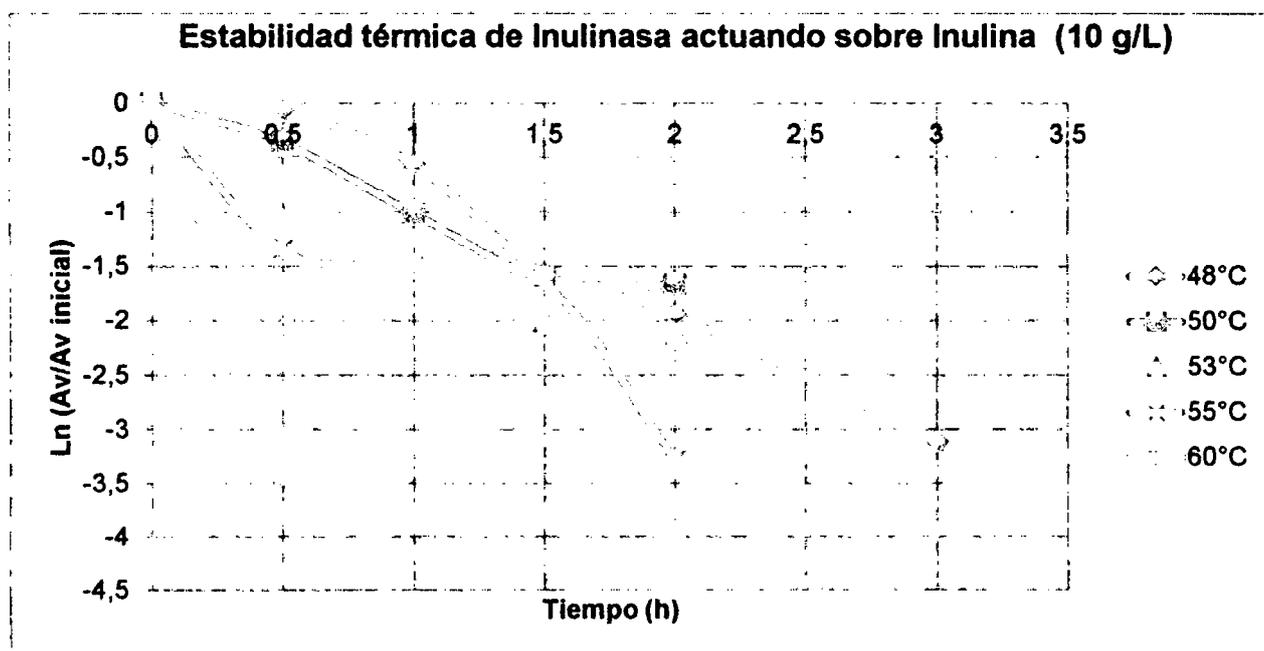


Figura 25. Estabilidad térmica de Inulinasa actuando sobre inulina (10 g/L)

A continuación presentamos los resultados del estudio de estabilidad térmica de Inulinasa actuando sobre inulina (10 g/L), evaluado a 48, 50, 53, 55 y 60°C

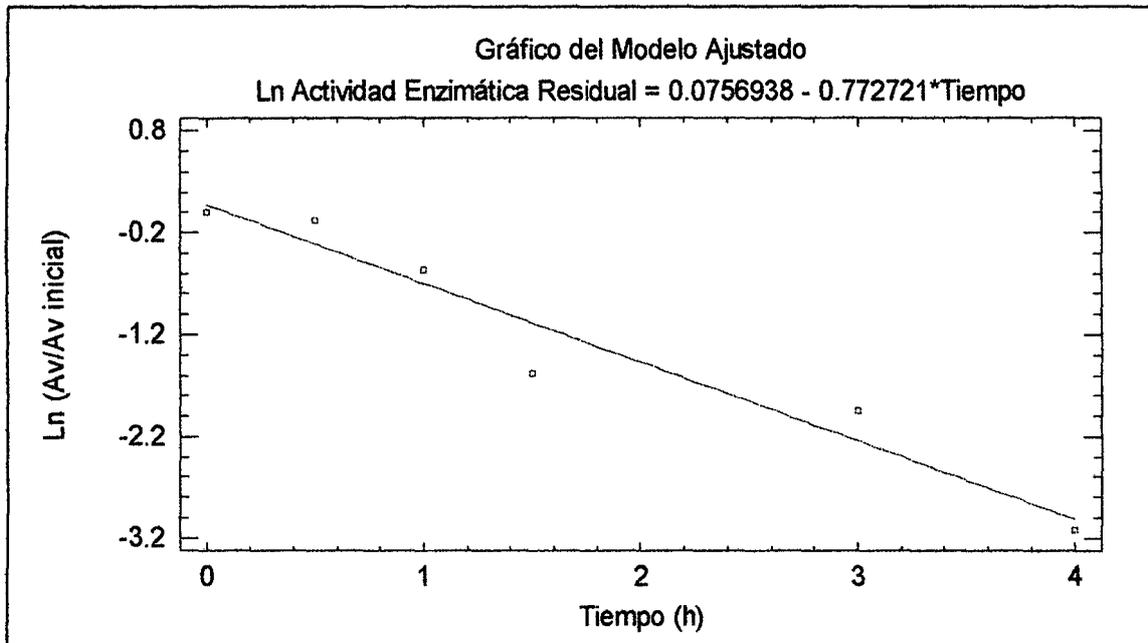


Figura 26. Estabilidad térmica de Inulinasa a 48°C, actuando sobre inulina (10 g/L)

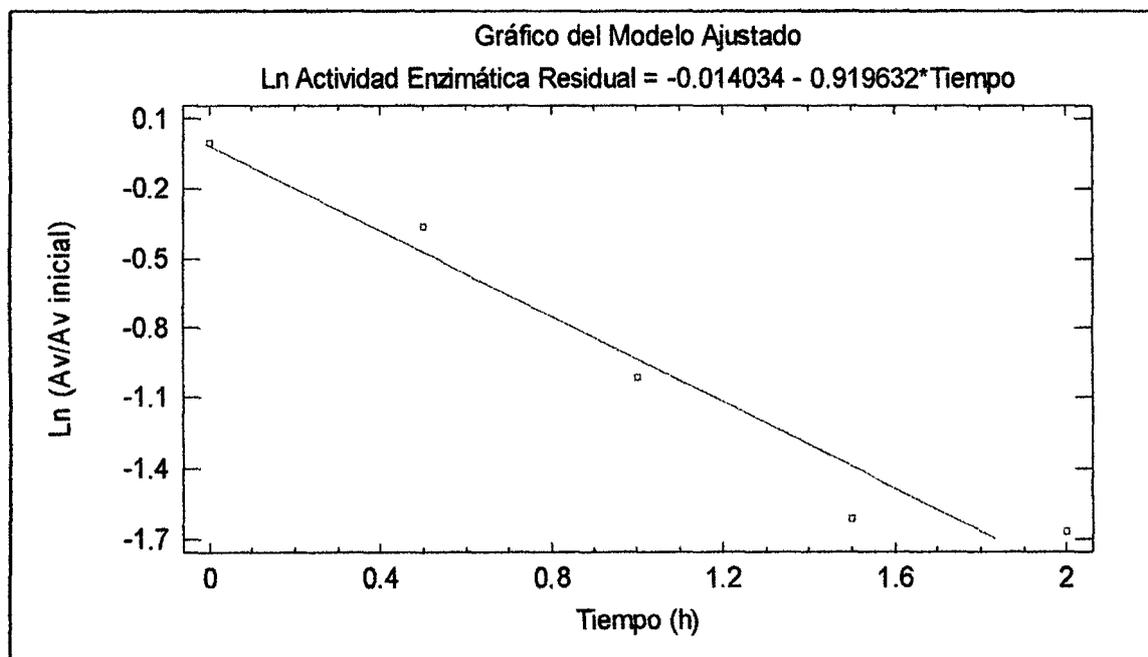


Figura 27. Estabilidad térmica de Inulinasa a 50°C, actuando sobre inulina (10 g/L)

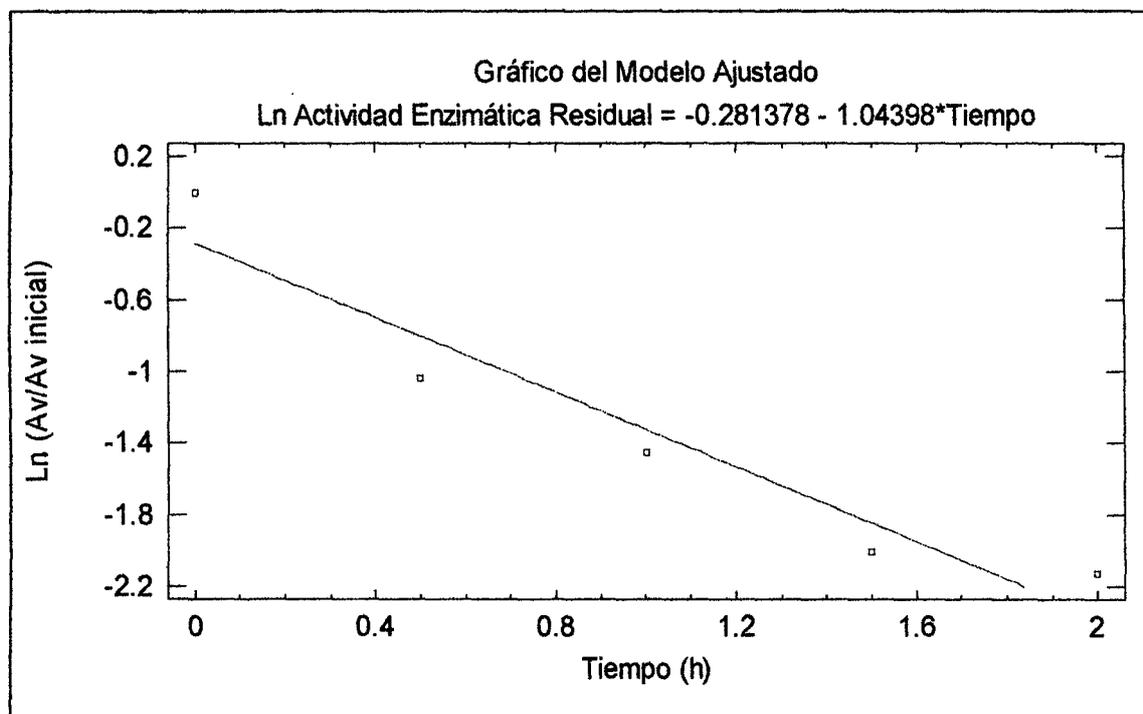


Figura 28. Estabilidad térmica de Inulinasa a 53°C, actuando sobre inulina (10 g/L)

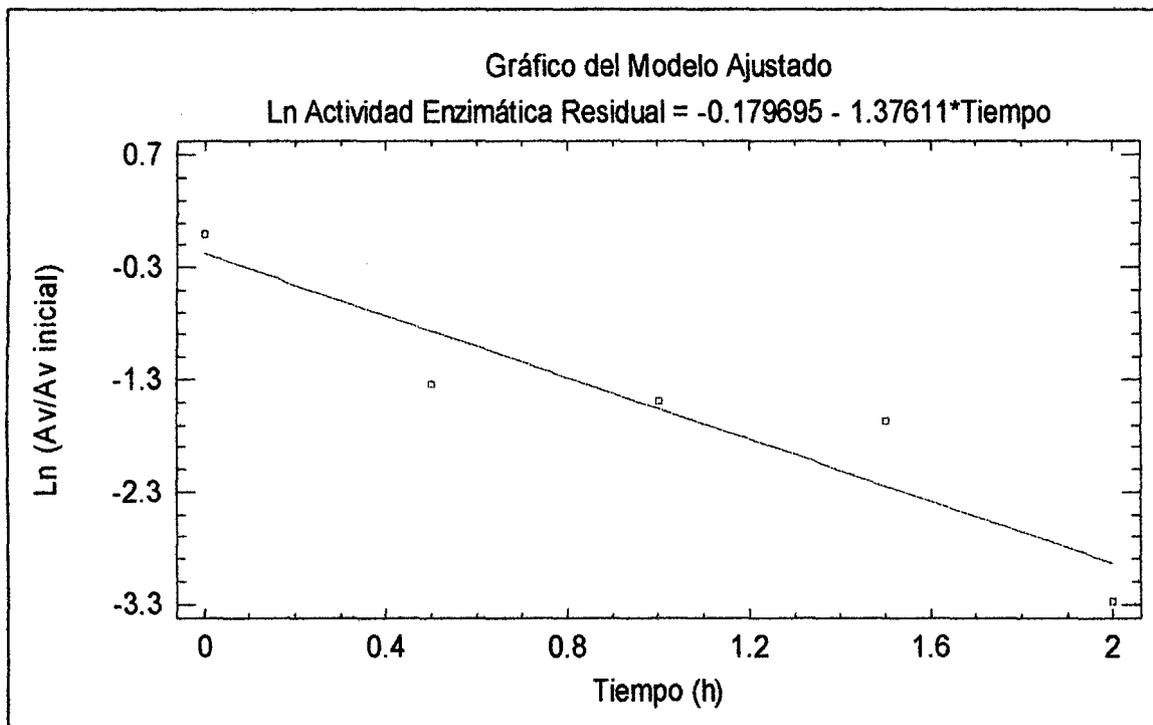


Figura 29. Estabilidad térmica de Inulinasa a 55°C, actuando sobre inulina (10 g/L)

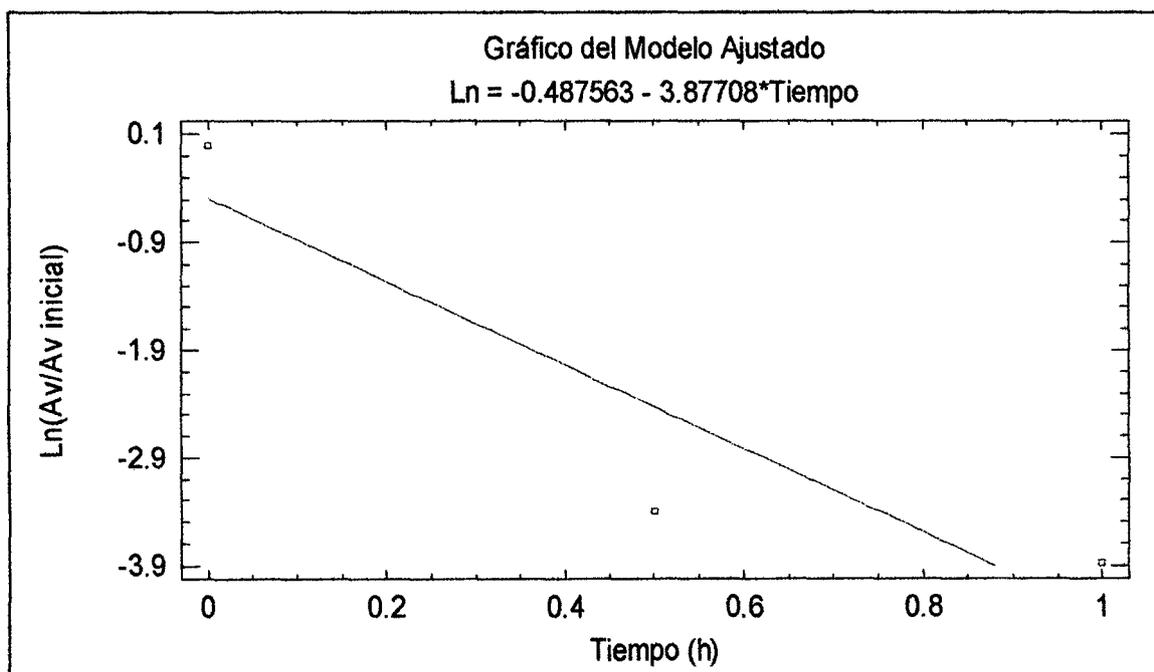


Figura 30. Estabilidad térmica de Inulinasa a 53°C, actuando sobre inulina (10 g/L)

Se calcularon las constantes de desnaturalización enzimática (Kd) por regresión lineal en cada una de las gráficas anteriores y según el rango de temperaturas establecido para estudiar la estabilidad térmica de la Inulinasa actuando sobre sustrato inulina (10 g/L), los resultados se muestran en la Tabla 21.

Tabla 21. Valores de la constante de desnaturalización enzimática a Kd en el rango de temperaturas de 48-60°C para inulina.

T (°C)	Kd (h ⁻¹)
48	0.7727
50	0.9196
53	1.044
55	1.3761
60	3.8771

La constante Kd0 se determinó por regresión lineal utilizando los (Ln Kd) determinados previamente. Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 22 y Figura 31.

Tabla 22. Valores para el cálculo de la Constante de Kd0 para la Inulinasa actuando sobre inulina 10 g/L.

T (°C)	T (°K)	1/T	Kd	Ln(Kd)
48	321	0.0031153	0.7727	-0.2579
50	323	0.0030960	0.9196	-0.0838
53	326	0.0030675	1.044	-0.0431
55	328	0.0030488	1.3761	-0.3193
60	333	0.0030030	3.8771	1.3551

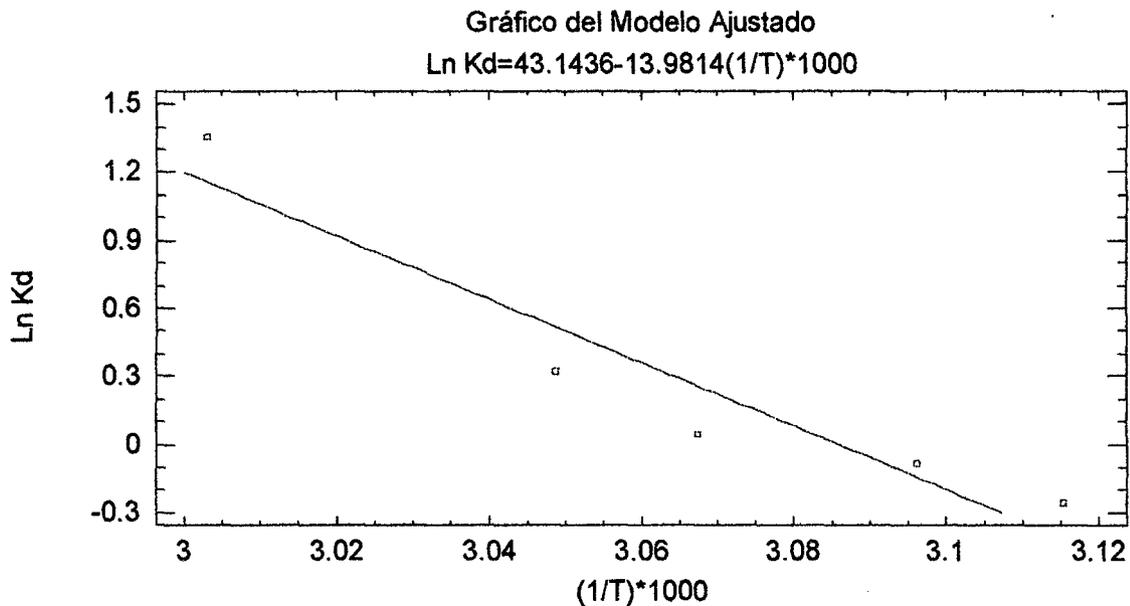


Figura 31. Cálculo de la Constante K_d0

Tabla 23. Coeficientes de regresión para la relación entre $\text{Ln}(K_d)$ y $(1/T)$ de la Inulinasa actuando sobre inulina (10 g/L)

<i>Mínimos Cuadrados</i>		<i>Estándar</i>	<i>Estadístico</i>	
<i>Parámetro</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error</i>	<i>T</i>	<i>Valor-P</i>
Intercepto	43.1436	7.89039	5.46787	0.0120
Pendiente	-13.9814	2.57322	-5.43343	0.0122

Tabla 24. Análisis de Varianza (ANOVA) para el modelo matemático que evalúa entre $\text{Ln}(K_d)$ y $(1/T)$ de la Inulinasa actuando sobre inulina (10 g/L)

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	1.4842	1	1.4842	29.52	0.0122
Residuo	0.1508	3	0.0502		
Total (Corr.)	1.6350	4			

La figura 31 muestra los resultados de ajustar un modelo lineal para describir la relación entre Kd y T. La ecuación del modelo ajustado es

$$\text{Ln}(Kd) = 43.1436 - 13.9814*(1/T)*1000$$

Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre (1/T °K) y Ln (Kd) con un nivel de confianza del 95.0%. El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo ajustado explica 90.7755% de la variabilidad en Ln (Kd). El coeficiente de correlación es igual a -0.9527, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables. De esta manera hemos definido la ecuación de regresión siguiente:

$$\text{Ln}(Kd) = 43.1436 - 13.9814*(1/T)*1000$$

En la figura 18 se observa que la actividad catalítica de la inulinasa, actuando sobre sacarosa 20g/L, disminuye rápidamente por efecto de la temperatura, así a 50°C mantiene el 26.57% de su actividad luego de 04 h de monitoreo, mientras que a 53 y 55°C, la actividad residual obtenida es de 7.7 y 1.45% respectivamente. A 60°C la actividad es insignificante luego de 30 minutos de monitoreo.

En la figura 25 se observa que la actividad catalítica de la inulinasa, actuando sobre inulina 10g/L, disminuye rápidamente por efecto de la temperatura, así a 50°C mantiene el 18.76% de su actividad luego de 02 h de monitoreo, mientras que a 53 y 55°C, la actividad residual obtenida es de 11.9 y 3.75% respectivamente. A 60°C el porcentaje de actividad residual es de 2.07% luego de 02 horas de monitoreo.

Otros autores reportaron mayores estabilidades térmicas, como el caso de Paula *et al.* (2008) donde el extracto crudo enzimático alcanzó una

actividad residual del 46.2% a las 04 h del ensayo, así mismo Cruz-Guerrero *et al* (1995) obtuvieron el 50% de actividad residual a 50°C luego de 3 h de monitoreo.

En la presente investigación se evaluó la estabilidad térmica del extracto crudo a 50°C, logrando 21.95% de actividad residual luego de 5.5 h de ensayo.

La veloz pérdida de la estabilidad térmica de la inulinasa se ve reflejada en los altos valores obtenidos para las constantes cinéticas de desnaturalización enzimática, mostrados en la Tabla 16 cuando el concentrado enzimático actúa sobre sacarosa (20 g/L), al ser comparados con Ricca *et al* (2009), que obtuvo valores de 0.00263 h⁻¹ a 50°C y 0.0118 h⁻¹ a 55°C, ensayados con un extracto crudo de inulinasa de *Aspergillus niger*. Lo anterior se ve corroborado al comparar el tiempo de vida media de la enzima a 50°C, de apenas 2.48 h en la experiencia, los cuales son menores a los reportados por otros autores como Cruz-Guerrero *et al.*, (1995) de 03 h de vida media y Santos *et al.*, (2007) de 228 h a la misma a la temperatura.

Lo anterior no es corroborado al contrastar los valores del tiempo de vida media y el de la energía de desactivación, con los reportados por Castillo (2013), puesto que el valor de la energía de desactivación de 73.055 Kcal/mol es mayor que el obtenido en la presente investigación de 61.917 Kcal/mol, lo cual supone una mayor estabilidad enzimática, sin embargo para 50°C el tiempo de vida media calculado para el concentrado enzimático es 2.48 h superando al tiempo de vida media de 1.12 h reportado por este autor para la misma temperatura. Lo mismo sucede al comparar valores de tiempo de vida media calculados para 53 y 55°C.

Se resalta que se evaluó la estabilidad enzimática de la inulinasa actuando sobre sacarosa a 48, 50, 53, 55 y 60°C, es decir en un mayor rango, lo cual asegura la exactitud y precisión de los cálculos realizados para la determinación de las constantes. Para el caso del concentrado enzimático actuando sobre inulina (10 g/L), los valores para el tiempo de vida media

son menores que los correspondientes al sustrato sacarosa (20 g/L) evaluados a la misma temperatura. Se tienen valores de 0.89, 0.75, 0.66 y 0.5 h para 48, 50, 53 y 55°C respectivamente.

Se resalta que el valor de la energía de desactivación para la reacción de la inulinasa sobre inulina es 27.7105 Kcal/mol, menor al obtenido para la reacción de inulinasa sobre sacarosa que es de 61.9173 Kcal/mol.

Una buena estabilidad térmica a 50°C pero no 60°C es descrita para la cepa *Kluyeromices marxianus* CDBB-L-278 (Cruz-guerrero *et al.*, 1995).

Kluyeromices marxianus var. *bulgaricus* con temperatura óptima de 55°C es estable por 3.5 h a 40°C y tiene una vida media de 40 min a 50°C. (Singh, 2006). Se resaltan 2 casos de termoestabilidad de inulinasas: *Aspergillus oryzae*, retiene alrededor del 90% de su actividad, luego de 02 h de incubación a 70°C. *Aspergillus awamori*, retiene el 90% de su actividad luego de 24 h a 50°C (Singh., 2006).

El extracto crudo enzimático retiene el 82% de su actividad enzimática después de 02 horas de incubación a 50°C, 69% a 60°C, y 30% a 70°C, sin embargo la enzima fue completamente inactivada a 80°C. (Oluwaseun y Abiodun, 2012)

La enzima mostró estabilidad a 50°C durante 03 h, a 55 y 60°C la enzima perdió su actividad rápidamente (Cazzeta *et al.*, 2005).

Se han reportado valores para la energía de desactivación de Inulinasa de *Kluyeromices marxianus* actuando sobre sacarosa; 29.01 Kcal/mol (Cruz-Guerrero *et al.*, 1995), 74.872 Kcal/mol (Ricca *et al.*, 2009) y 61.917 Kcal/mol (Santos *et al.*, 2007). Se resalta el trabajo de Castillo (2013) que reporta un valor de 73.055 Kcal/mol para la energía de desactivación del concentrado enzimático actuando sobre sacarosa (20 g/L), obtenido para el mismo microorganismo en estudio y bajo las mismas condiciones.

La Energía de desactivación E_d representa la energía necesaria para iniciar la reacción de desnaturalización de la enzima, siendo así se afirma

que el concentrado enzimático es menos estable que los valores citados puesto que el valor de Ed determinado en la investigación es menor que los reportados.

4.6. Modelamiento matemático de la estabilidad térmica de la Inulinasa

A lo largo de la presente investigación se ha destacado que la inulina es considerada de interés industrial, por ser un sustrato relativamente abundante y cómodo para la producción de jarabes ricos en fructosa.

Este tipo de jarabe puede ser obtenido por hidrólisis ácida de inulina a 80-100°C, sin embargo, bajo estas condiciones la inulina es fácilmente degradada obteniéndose productos coloreados, tales como anhídrido de difructosa. La hidrólisis enzimática con inulinasas ofrece una alternativa. (Dhiman, 2013).

El proceso industrial para la producción de fructosa y fructooligosacaridos es llevado a cabo a temperaturas de 60°C. La mayoría de las inulinasas reportadas pierden su actividad enzimática después de pocas horas a esta temperatura y por lo tanto requieren reposición, lo cual eleva el costo de producción. Por lo que existe un creciente interés en aislar y caracterizar inulinasas con elevada estabilidad térmica (Dhiman, 2013).

Es por ello que una elevada temperatura óptima para las inulinasas, es un factor extremadamente importante para la aplicación de estas enzimas en la producción comercial de fructosa o fructooligosacáridos de inulina, dado que las altas temperaturas (60°C o más) confieren propiedades de solubilidad a la inulina y previenen la contaminación microbiana (Singh, 2006).

En la presenta investigación se ha determinado que la temperatura óptima de la inulinasa de *Kluyeromices marxianus* NRRL fermentado en extracto de yacón es 55°C, con lo cual se logran valores de actividad enzimática de

47.0926 y 3.0901 UI/ml para el concentrado enzimático actuando sobre sacarosa (20g/L) e inulina (10 g/L) respectivamente.

Los resultados anteriores similares a los obtenidos en nuestro trabajo, no son apropiados para el diseño de reactores, dado que no es posible predecir el comportamiento de la enzima en relación a la temperatura. Valores de temperatura óptimos relativamente altos son particularmente interesantes en procesos industriales, debido a que inhiben la contaminación microbiana y permiten tener altas concentraciones de azúcares, una condición ideal para la producción de Fructooligosacáridos con inulinasas (Santos y Maugeri, 2002).

Sin embargo, se sabe también que los valores óptimos de pH y temperatura no son necesariamente aquellos que deberían ser usados en un proceso industrial, debido a la existencia de otros factores tales como la estabilidad enzimática, el riesgo de contaminación, la solubilidad de la inulina, que contribuyen a definir los valores óptimos para las condiciones de operación de los reactores enzimáticos (Ricca *et al.*, 2007).

Por ello se sugieren valores de pH bajos pues evitan la formación de compuestos coloreados, sin embargo, los valores de temperatura que maximizan la actividad enzimática podrían afectar la estabilidad, debido a la desnaturalización térmica (Ricca *et al.*, 2007).

Se observa que la temperatura adecuada para el proceso no es necesariamente la temperatura correspondiente a la máxima actividad enzimática, dado que en este punto la velocidad de desnaturalización de la enzima es muy elevada. Por lo tanto, la temperatura de proceso debería ser algo más baja que la temperatura óptima para la actividad enzimática, con el objetivo de incrementar el tiempo de vida media de la enzima, pero no tanto como para afectar la productividad del proceso (Santos *et al.*, 2007).

Asimismo se resalta la necesidad de la producción de inulinasas termoestables, pues las altas temperaturas generan las condiciones térmicas necesarias para la solubilidad de la inulina y la prevención de la

contaminación microbiana, sin una masiva desactivación del catalizador (Ricca *et al.*, 2007).

La alta termoestabilidad de las enzimas utilizadas en la industria también reduce los costos de producción, debido a que se requiere una menor cantidad de enzima para obtener el producto deseado (Singh, 2006)

Resaltamos que inulinasas de levaduras, hongos y bacterias han sido estudiadas, pero pocas de estas enzimas tienen temperaturas óptimas de 60°C o más, como es requerido para las aplicaciones industriales. Las enzimas inulinasas de *Aspergillus niger* con actividad hidrolítica sobre inulina son las más termoestables (Singh, 2006).

Escasos trabajos de investigación en el área reportan información en torno a la actividad enzimática y el tiempo de vida media en relación a la temperatura, información de vital importancia para determinar las condiciones óptimas de operación de reactores enzimáticos para la producción de jarabes de fructosa utilizando inulinasas.

Lo anterior se resalta puesto que en los procesos industriales, determinar una temperatura de trabajo que redunde en alta actividad enzimática y buena estabilidad térmica, representa un compromiso entre bajos costos de proceso y altas productividades (Santos *et al.*, 2007).

En la presente investigación se utilizó el modelo de Santos *et al.*, (2007) el cual establece la temperatura óptima para la operación de reactores enzimáticos basándose en el modelamiento matemático de la estabilidad térmica y de la actividad de la enzima y fue desarrollado utilizando conceptos termodinámicos y datos experimentales para la enzima libre e inmovilizada, utilizando la inulinasa de *Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus* ATCC 16045 actuando sobre sustrato sacarosa (20g/L).

El modelo empleado predice la actividad enzimática con respecto a la temperatura y el tiempo para el proceso enzimático y lo relaciona con el tiempo de vida media en el rango de temperatura predeterminado.

Las constantes obtenidas para el modelamiento matemático para la inulinasa actuando sobre Sacarosa 20g/L e inulina 10g/L se muestran a continuación en las Tablas 25 y 26.

Tabla 25. Constantes obtenidas para el modelamiento matemático de la actividad enzimática de inulinasa actuando sobre Sacarosa 20g/L.

Constantes	
Vo	450000000
Ea	10469.5
Ed	61917.3
Kd0	4.6329E+39

Tabla 26. Constantes obtenidas para el modelamiento matemático de la actividad enzimática de inulinasa actuando sobre Inulina 10g/L.

Constantes	
Vo	229333.07345
Ea	7103.9
Ed	27710.4866
Kd0	9.08513E+16

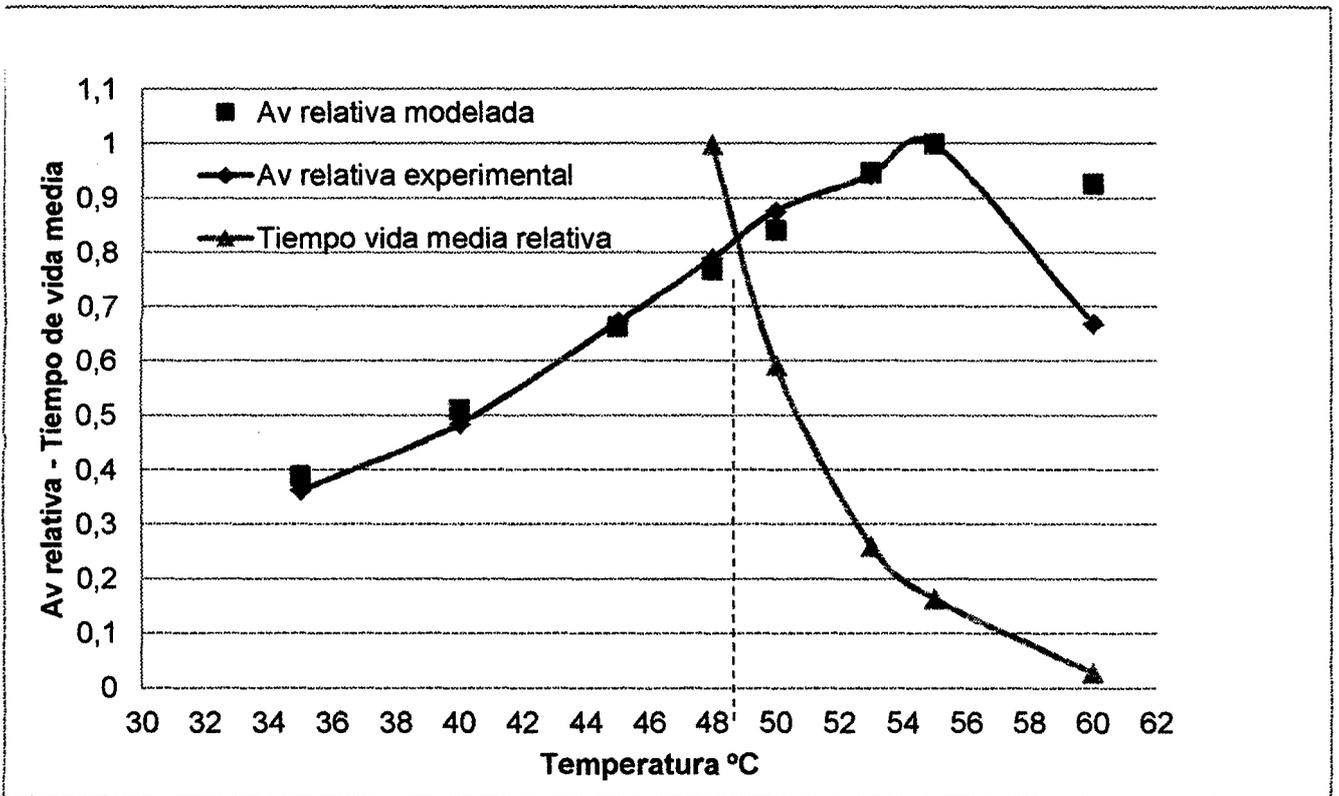


Figura 32. Estimación de la temperatura de proceso para la actividad enzimática actuando sobre Sacarosa 20g/L, usando la actividad relativa y el tiempo de vida media relativo.

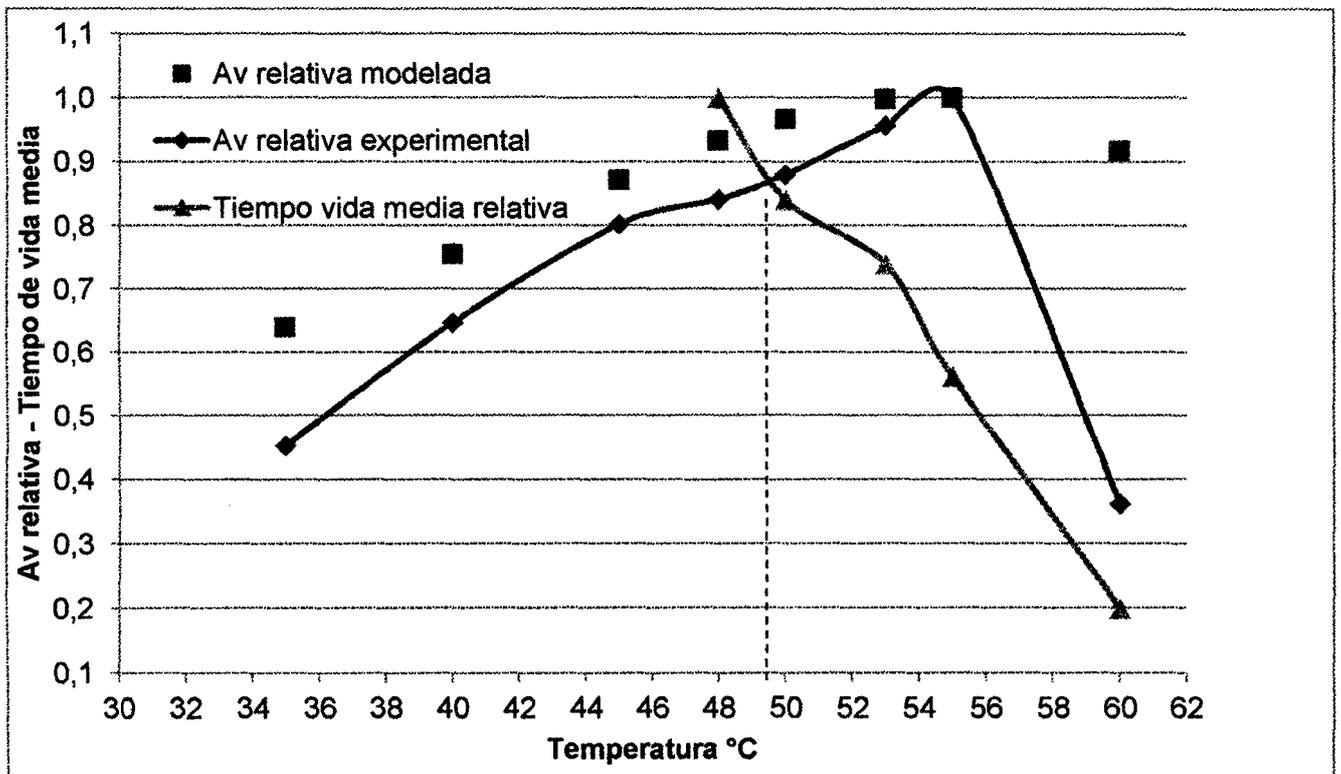


Figura 33. Estimación de la temperatura de proceso para la actividad enzimática actuando sobre Inulina 10g/L, usando la actividad relativa y el tiempo de vida media relativo.

Tal como puede observarse en las Figuras 32 y 33, la temperatura puede ser estimada de la intercepción de las gráficas que representan a la actividad enzimática relativa y la vida media de la enzima en relación a la temperatura.

El modelo matemático utilizado es un procedimiento muy útil para obtener las condiciones óptimas para operar reactores enzimáticos. Según se muestra en las Figuras 32 y 33, las temperaturas de operación óptimas son de 49°C y 49.5°C para la enzima purificada actuando sobre sacarosa (20 g/L) e inulina (10 g/L). En el punto de intersección mencionado, la estabilidad enzimática es significativamente alta, lo que significa que la pérdida de actividad enzimática es significativamente menor.

Es notoria la disminución de la velocidad de reacción, lo cual posiblemente sea una consecuencia de un incremento proporcional de la concentración de enzima en el medio de reacción, por lo que la productividad será menos afectada. Sin embargo, el tiempo de vida media decrece rápidamente con el incremento de temperatura, por lo que la selección de una temperatura menor incluso, podría mejorar la estabilidad enzimática sin ninguna pérdida considerable de actividad (Santos *et al.*, 2007).

Es posible que la metodología descrita pudiera necesitar de una prueba complementaria, como una función objetivo que involucre los costos de la enzima y la producción, para posteriormente utilizar procesos de optimización estándar para la determinación del punto óptimo.

La información proporcionada por este modelo podría ser utilizada para obtener temperatura de operación óptimas que proporcionen altas productividades y bajos costos de proceso (Santos *et al.*, 2007). El trabajo de Santos *et al.*, (2007) utilizando este modelo matemático determina que valores de temperatura operacionales de 52 y 42°C para la inulinasa libre e inmovilizada, valores menores a los reportados como temperatura óptimas, de 63 y 57.5°C respectivamente. Lo anterior demuestra que la temperatura de trabajo no es necesariamente la misma que aquella con la que se obtiene la mayor velocidad de reacción. Se prefiere temperaturas menores donde la enzima es mucho más estable.

La validación del modelo matemático empleado se realizó mediante la metodología planteada por Bard (1974).

Los resultados se muestran en las Tablas 27 y 28 a continuación.

Tabla 27. Test de Bard para la validación del modelo matemático para la estabilidad térmica de la enzima actuando sobre sacarosa 20 g/L

Γ	Av relativa	Av relativa	Δ_{ij}	Δ_j	$(\Delta_{ij}-\Delta_j)^2$	S_j	$(\Delta_j^2)/S_j$
C)	experimental	modelada					
15	0.3630	0.388389416	0.02543333	0.04728563	0.00047752	0.00735399	0.30404321
10	0.4848	0.510370825	0.02559793	0.04728563	0.00047036		
15	0.6723	0.662830133	0.00942464	0.04728563	0.00143345		
18	0.7900	0.768329007	0.02162708	0.04728563	0.00065836		
30	0.8767	0.841956153	0.03477684	0.04728563	0.00015647		
33	0.9430	0.946999418	0.00397328	0.04728563	0.00187596		
55	1.0000	1	3.3307E-16	0.04728563	0.00223593		
30	0.6687	0.926109545	0.25745192	0.04728563	0.04416987		
	TOTAL:		0.37828501		0.05147792		

Tabla 28. Test de Bard para la validación del modelo matemático para la estabilidad térmica de la enzima actuando inulina 10g/L

Av relativa experimental	Av relativa modelada	Δ_{ij}	Δ_j	$(\Delta_{ij}-\Delta_j)^2$	S_j	$(\Delta_j^2)/S_j$
0.4531	0.639162489	0.18610272	0.14211691	0.00193475	0.03067612	0.6584018
0.6472	0.755484737	0.10825649	0.14211691	0.00114653		
0.8026	0.871741375	0.06917835	0.14211691	0.00532003		
0.8414	0.933229144	0.09183243	0.14211691	0.00252853		
0.8802	0.966451455	0.08622104	0.14211691	0.00312435		
0.9566	0.997286533	0.04068319	0.14211691	0.0102888		
1.0000	1	8.8818E-16	0.14211691	0.02019722		
0.3624	0.917108865	0.55466105	0.14211691	0.17019267		
TOTAL:		1.13693526		0.21473287		

A partir de los valores obtenidos se calcula el estadístico λ , obteniendo valores de 2.43 y 5.267, para cuando la enzima actúa sobre sacarosa 20g/L e inulina 10g/L. Los valores calculados son menores al valor $F(1,7)$ de las Tablas Estadísticas al 99% de confianza, por lo que se concluye que no existe desviación entre los datos experimentales y los datos modelados, es decir se valida la aplicación del modelo para ambos casos.

V. CONCLUSIONES

- Se obtuvo un extracto enzimático con actividad enzimática de inulinasa a partir de la fermentación de *Kluyveromyces marxianus* NRRL- Y7571 sobre extracto de yacón en un cultivo por lotes realizado en matraces.
- Se purificó la enzima inulinasa mediante la técnica de precipitación con etanol al 55% con un flujo de 10mL/min.
- Se evaluó la actividad enzimática volumétrica del proceso de concentración resultando pérdidas de 26.02% y 12.62% en actividad invertasa e inulinasa respectivamente, cuando la enzima actúa sobre Sacarosa 20g/L e Inulina 10g/L.
- Se determinó que los valores de energía de activación de la actividad de Inulinasa sobre sacarosa 20g/L e inulina 10g/L, están en una relación de 1.47.
- Se determinó que la temperatura óptima para la actividad enzimática actuando sobre sacarosa 20g/L e inulina 10g/L fue 55°C en ambos casos.
- Se determinó que los valores de energía de desactivación en la actividad de Inulinasa sobre sacarosa 20g/L e inulina 10g/L, están en una relación de 2.23.
- Se determinó que el tiempo de vida media máximo de la enzima purificada se logra a 48°C para ambos casos.
- Se obtuvieron modelos matemáticos que permiten predecir la actividad enzimática de la inulinasa actuando sobre sacarosa 20g/L e inulina 10g/L, en relación a los cambios de la temperatura en el rango de 35-60°C y el tiempo.
- Se determinó, en base al modelamiento matemático, que la temperatura de proceso adecuada para la reacción de la enzima inulinasa actuando sobre sacarosa 20g/L e inulina 10g/L fue 6°C menor que la temperatura óptima para ambos casos.

VI. RECOMENDACIONES

- Realizar la investigación con otras materias primas como fuente de carbono y energía en el medio de fermentación, como residuos agroindustriales.
- Realizar trabajos de investigación en torno a la producción de jarabes de fructosa utilizando materia prima local como fuente de inulina.
- Realizar una etapa posterior de ultrafiltración, para mejorar el proceso de purificación de la enzima.
- Adquirir inulina químicamente pura, libre de azúcares reductores.
- Realizar mayores estudios en torno al uso de etanol como sustancia de concentración de la enzima durante la precipitación a fin de incrementar el valor de la actividad enzimática en comparación con el extracto crudo.
- Evaluar la purificación de la enzima inulinasa con otras sustancias químicas y solventes orgánicos como sulfato de amonio ($\text{NH}_4(\text{SO})_4$), isopropanol o acetona.
- Realizar la caracterización de la enzima inulinasa mediante electroforesis.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acuña, J & Espinoza, D. (2013). Optimización del pH y la temperatura en la actividad de inulinasa soluble de *Kluyveromyces marxianus* fermentado en extracto de yacón. Tesis de grado académico. Universidad Nacional del Santa. Perú.
- Aldave M. & Jorrín, J. Estudio cinético de la actividad invertasa de levadura de panadería. Disponible en <http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biolmol/pdfs/31>
- Amaya J. 2002. Desenvolvimento de yacón (*Polymnia sonchifolia* Poep & Endl) a partir de rizóforos y de gemas axilares, en diferentes espaçamentos. Tese do título de Doutor em Agronomia – Area de concentração em horticultura, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Brasil, 89 p.
- Bassanezi, R. & Sallet, M. (1997). Modelación matemática: una antigua forma de investigación-un nuevo método de enseñanza. *Números Revista Didáctica de las matemáticas* 32:13-25.
- Blomhoj, M. (2004) Mathematical modelling - A theory for practice. En Clarke, B.; Clarke, D. Emanuelsson, G.; Johnansson, B.; Lambdin, D.; Lester, F. Walby, A. & Walby, K. (Eds.) *International Perspectives on Learning and Teaching Mathematics*. National Center for Mathematics Education. Suecia, p. 145-159.
- Cacesa, P. & Hubble, J. (1990). Tecnología de las enzimas. Zaragoza-España: Editorial escriba S.A.
- Castillo, A. (2009). Estudio de la fermentación de cepas de *Kluyveromyces marxianus* para la producción de inulinasa. PIC.FF.II. 001.2008. Universidad Nacional del Santa. Chimbote Perú.
- Castillo, A. (2011). Estudio de la producción de Inulinasa de *Kluyveromyces marxianus* en cultivos por lote. PIC.FF.II. 001.2008. Universidad Nacional del Santa. Chimbote Perú.
- Castillo, A. & Chamy R. (2010). Produccion de inulinasa por levaduras de de *Kluyveromyces marxianus*. *Scientia Agropecuaria*, 3y4, 235-245.

- Cazetta, M., Martins, P., Monti, R. & Contiero, J.(2005). Yacón (*Polymnia sanchifolia*) extract as a substrate to produce inulinase by *Kluyveromyces marxianus* var. *vulgaricus*. Journal of food engineering, 34,179-184.
- Castillo, A. (2013). Optimization of the Enviromental parameters of the fermentation of *Kluyveromyces marxianus* in yacon extract for the production of inulinase. Actas del 9th World Congress of Chemical Engineering. Agosto 2013. Seúl, Corea del Sur.
- Chen Han-Qing. Chen Xiao-Ming. Chen Tian-Xiang. Xu Xue-Ming. & Jin Zheng-Yu. (2011). Extraction optimization of inulinase obtained by solid state fermentation of *Aspergillus ficuum* JNSP5-06. Carbohydrate Polymers, 85, 446–451.
- Chirinos R & L Cisneros-Zevallos, Pedreschi R, Campos D, Noratto G, 2003. Andean yacon root (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. Endl) fructooligosaccharides as a potential novel source of prebiotics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51(18): 5278-5284.
- Chi Zhen-Ming. Tong Zhang. Cao Tian-Shu. Xiao-Yan Liu, Wei Cui. & Chun-Hai Zhao. (2011). Biotechnological potential of inulin for bioprocesses. Bioresource Technology, 102, 4295–4303.
- Cruz-Guerrero, A., Garcia-Peña, I., Barzana, E., Garica-Garibay, M. & Gómez-Ruiz, L., (1995). *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-278: a wild inulinase hyperproduction strain. J. Ferment. Bioeng, 80 (2), 159–163.
- Cunningham, R. & López,G. (1994). Etanol de lignocelulósicos: tecnología y perspectivas, Santiago de Compostela, Universidad, servicio de publicaciones e intercambio científico. Programa CYTED
- Doran, P. (1998). Principios de ingeniería de los bioprocesos. España: Editorial Acribia S.A, pg 285-287.
- De Paula, F., Cazetta, M., Monti, R. & Contiero, J. 2008. Sucrose hydrolysis by gelatin-immobilized inulinase from *Kluyveromices marxianus* var. *Bulgaricus*. Food Chemistry, 111, 691-695.
- Dhiman, V. (2013) .Optimization of thermostable Inulinase production from *Aspergillus* isolated from Punjab region. Journal of sustainable biotechnology. India,24, 28-32.

- Ettalbi, M., & Baratti, J.C. (2001). Sucrose hydrolysis by thermostable immobilized inulinase from *Aspergillus ficcum*. *Enzyme Microb. Technol.*,28, 596–604.
- Fennema, O. (2000). *Química de los alimentos*. (4ta edición). España: Editorial Acribia S.A.
- Frank, A. y De Leenheer, L. 2004. Inulin. In: *Polysaccharides from Eukaryotes*, S. De Baets, E. Vandamme, A. & Steinbuchel, Ed. Weinheim, Wiley-VHC.
- Golunski, S., Astolfi, V., Carniel, N., Oliveira, D., Di Luccio, M., Mazutti, M. A. & Treichel, H. (2011). Ethanol precipitation and ultrafiltration of inulinases from *Kluyveromyces marxianus*. *Separation and Purification Technology*,78,261-265.
- Goto K, Fukai K, Hikida J, Nanjo F. & Hara, Y. (1995). Isolation and structural analysis of oligosaccharides from yacón (*Polymnia sonchifolia*). *Biosci. Biotech. Biochem.* 59(12),2346-2347.
- Hermann M, Freire I & Pazos, C. (1999). Compositional diversity of the yacón storage root. In: *Impact on a changing world: Program report 1997-98*. International Potato Center (CIP), Lima (Perú), p. 425-432.
- Hicks, J. (2000). *Bioquímica*. México: Editorial McGraw-Hill Interamericana S.A., 900 p.
- Kato, K., Araki, T., Kitamura, T., Morita, N., Mouri, M. & Suzuki, Y. (1999). Purification and properties of a thermostable inulinase (b-d-Fructan Fructohydrolase) from *Bacillus stearothermophilus* KP1289. *Starch–Starke*, 51 (7), 253–258.
- Lane, M. & Morrissey, J. (2010). *Kluyveromyces marxianus*: A yeast emerging from its sister's shadow. *Fungal Biology Reviews*, doi:10.1016/j.fbr.2010.01.001.
- Leroy, G., Grongnet, J.F., Mabeau, S., Corre, D., Baty-Julien, C. 2010. Changes in inulin and soluble sugar concentration in artichokes (*Cynara scolymus* L.) during storage. *J. Sci. Food Agric.* 90, 1203-1209.
- Lizárraga L, Ortega R, Vargas W & A Vidal. 1997. Cultivo de yacón (*Polymnia sonchifolia*). IX Congreso Internacional de Cultivos Andinos: Resúmenes curso precongreso, 21 de abril 1997. Universidad Nacional

de San Antonio Abad del Cusco (UNSAAC), Centro de Investigación en Cultivos Andinos (CICA), Asociación ARARIWA, Cusco, Perú, p. 55-70.

- Manrique, I.; Párraga, A. & Hermann, I. (2005). Jarabe de yacón: Principios y Procesamiento. **Serie:** Conservación y uso de la biodiversidad de raíces y tubérculos andinos: Una década de investigación para el desarrollo (1993-2003). Centro Internacional de la Papa, Universidad Nacional Daniel Alcides Carrión, Fundación Erbacher, Agencia Suiza para el Desarrollo y la Cooperación. Lima, Perú. 31 p.
- Murray, R. Granner, D. Mayes, P. & Rodwell, V. (2003). Bioquímica de Harper. (11ava Edición). Editorial El Manual Moderno S.A.
- Neagu, C. & Bahrim, G. (2011). Inulinases: A versatile tool for biotechnology. "Dunarea de Jos" University, Faculty of Food science and Engineering. Galati, Romania.
- Niness KR. (1999). Breakfast foods and the health benefits of inulin and oligofructose. *Cereal Foods World*, 44(2),79-81.
- Oluwasem, E. & Abiodun, A. (2012). Characterization of crude thermostable exoinulinase produced by *Saccharomyces sp.* Departament of microbiology. University of Ibadan. Nigeria. Disponible en http://www.journal.au.edu/au techno/2012/oct2012/journal162_article03.pdf. Accesado el 10 de Setiembre del 2014.
- Parekh, S., & Margaritis, A. (1985). Production of inulinase (B-Fructan Fructanohydrolase) by *Kluyeromices marxianus*. *Agricultural and Biology Chemistry*, 50(4), 1085-1087.
- Pedreschi, R.; Campos, D.; Noratto, G.; Chirinos, R.; 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.
- Poorna, V. & Kulkarni, P.R. (1995). A study of inulinase production in *Aspergillus niger* using fractional factorial design. *Bioresource Technology*,54,315-320.
- Singh Prabhjeet & Gill Prabhjot Kaur. (2006). Production of Inulinases; Recent Advances. *Food Technol. Biotechnol*, 44 (2), 151–162.

- Ricca, E. Calabró, V. Curcio, S & Lorio, G. (2007). The State of the Art in the production of Fructose from Inulin Enzymatic Hydrolysis. *Crit Rev Biotech*, 27,129-145.
- Ricca, E. Calabró, V. Curcio, S & Lorio, G. (2009). Optimization of inulin hydrolysis by inulinase accounting for enzyme time- and temperature-dependent deactivation. *Biochemical Engineering Journal* ,48 (2009), 81–86.
- Roberfroid, M.B. (1999). Caloric Value of Inulin and Oligofructose. *Journal of Nutrition*, 129:,1436-1437.
- Roberfroid, M. B. (2005). Introducing inulin-type fructans. *British Journal of Nutrition*, 93, 13-25.
- Rocha, J., Catana, R., Ferreira, B., Cabral, J. & Fernandes, P. (2006). Design and characterisation of an enzyme system for inulin hydrolysis. *Food Chemistry*, 95,77-82.
- Rouwenhorst, R. Hensing, M. Verbakel, J. Scheffers, W. & 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.
- Santos, A.M.P., & Maugeri, F. (2002). Production of sugar syrup contend fructose and glucose, enriched or not with fructooligosaccharides from sucrose. Patent, PI 0202.602-3 (Brazil office).
- Santos, A.M., Oliveira, M.G. & Maugeri, F. (2006) "Modeling thermal stability and activity of free and immobilized enzymes as a novel tool for enzyme reactor design". *Bioresource Technology*, 98,3142–3148.
- Seminario, J. Valderrama, M. & Manrique, I. (2003). El yacón: fundamentos para el aprovechamiento de un recurso promisorio. Lima, Perú: Centro Internacional de la Papa (CIP), Universidad Nacional de Cajamarca, Agencia Suiza para el Desarrollo y la Cooperación (COSUDE).
- Soto Fernández, R. (1998). Estudio de la biología floral del germoplasma regional de yacón. Tesis de Grado. Universidad Nacional de Cajamarca, Perú, 51 p.

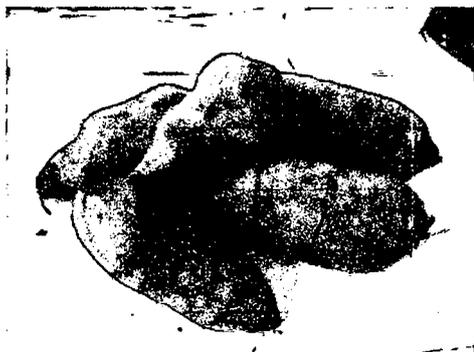
- Vandamme, E.J. & Derycke, D.G. (1983). Microbial inulinases: fermentation process, properties and applications. *Adv. Appl. Microbiol.*, 29,139-176.
- Valero, F. (1998). Módulo de Enzimas, Ingeniería Bioquímica. Departamento de Ingeniería Química. Barcelona: Universitat Autònoma de Barcelona.
- Vilhena, S. M. C.; Câmara, F. L. A.; Kakiyama, S. T. 2000. O cultivo de yacón no Brasil. *Horticultura brasileira* 18 (1), 5-8.
- Walter, W. McBee, R. & Temple Ken. 1994. Introducción a la microbiología. México: Editorial CECSA.
- Zhenming Chi, Zhe Chi, Tong Zhang, Guanglei Liu (2009). Inulinase-expressing microorganisms and applications of inulinases, China.
- Zittan, L. (1981). Enzymatic hydrolysis of inulin-an alternative way to fructose production. *Starch*, 33, 373-377.

ANEXO

ANEXO 1

Obtención del Extracto de Yacón

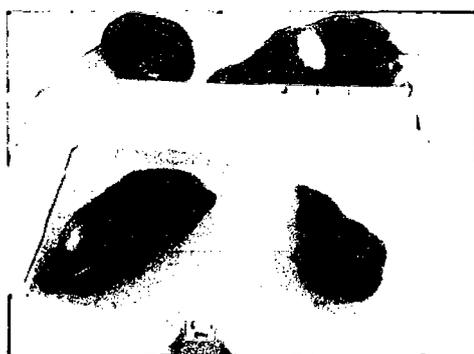
SELECCIÓN DE MATERIA PRIMA



LAVADO DEL YACÓN



DESINFECCIÓN CLORO



CORTADO EN CUBOS



OBTENCIÓN DEL EXTRACTO

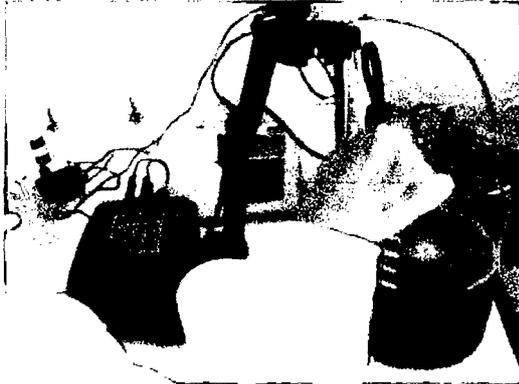


FILTRADO DEL EXTRACTO

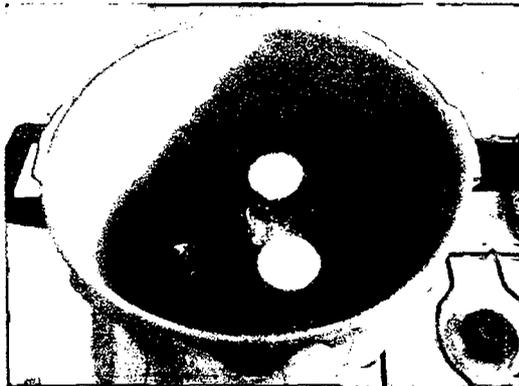


PARÁMETROS QUÍMICOS

(pH: 4.02 y 8 °Brix)



ESTERILIZACIÓN (121°C)



CENTRIFUGACIÓN

(Precipitado en el inferior)



EXTRACTO FINAL



ALMACENAMIENTO EN REFRIGERACIÓN



ANEXO 2

Inóculo y Fermentación por Lotes (Obtención del Caldo Crudo Enzimático)

Preparación del Medio de Mantención:

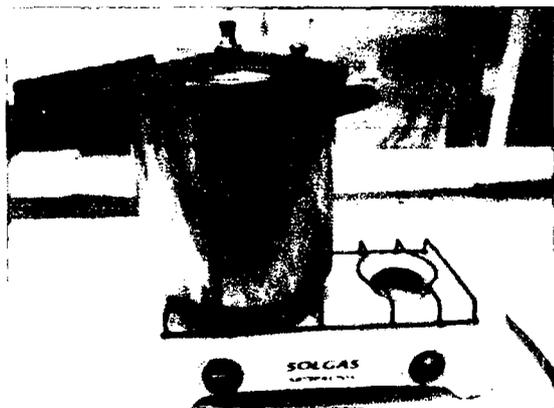
Pesado de sustrato, levadura y sales



Adición en matraces Erlenmeyer



Esterilización de los nutrientes 121°C x 15 min.



Activación de la cepa



Mezcla de nutrientes Siembra de *Kluyveromices m.* Cultivo en Shaker x10hrs.



Fermentación:

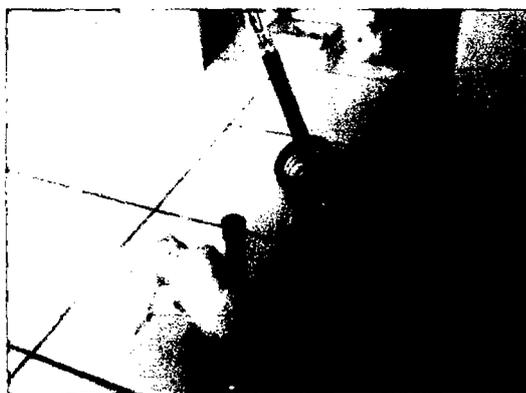
Mezcla de los medios



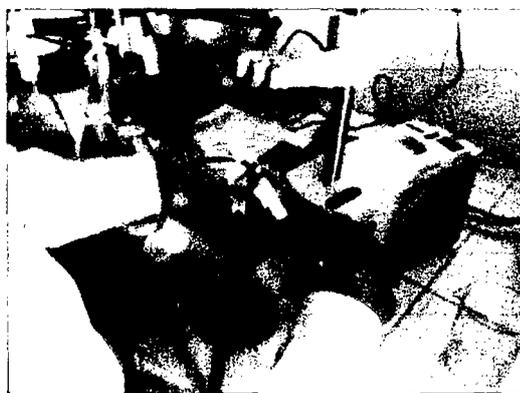
Adición del inóculo



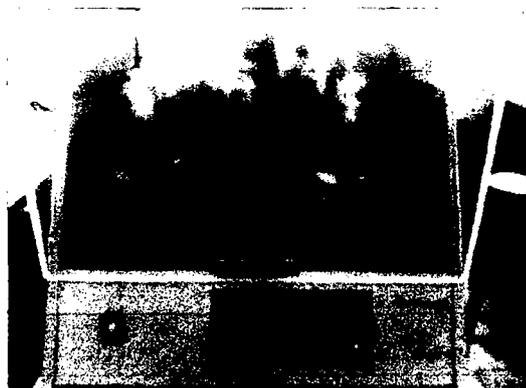
Adición del extracto de yacón



Regulación del pH hasta 4.0



Fermentación en Shaker x 30 y 48 hrs.



Almacenamiento en refrigeración



ANEXO 3

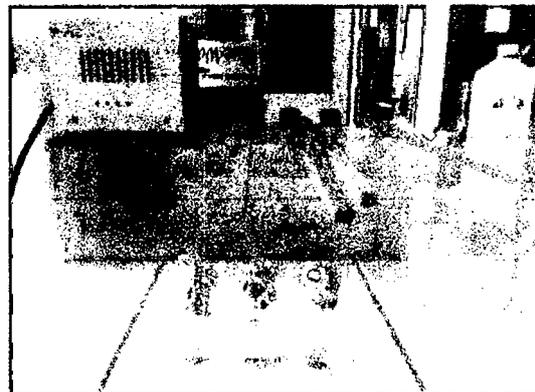
Medición de la Actividad enzimática

Enzima: Extracto crudo - Sobrenadante - Purificada



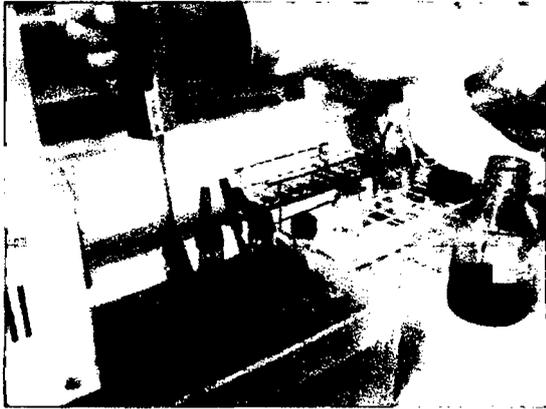
Adición Del Sustrato-Tampón

Inmersión en Baño María

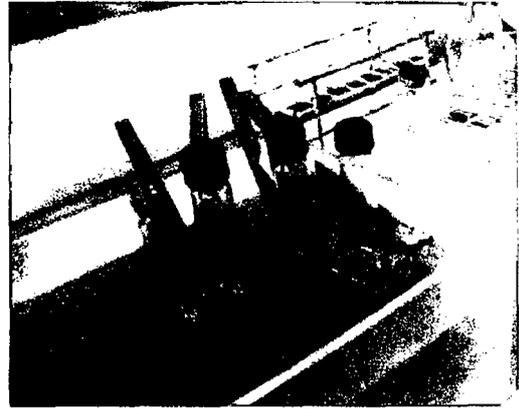


Adición De La Enzima-Tampón

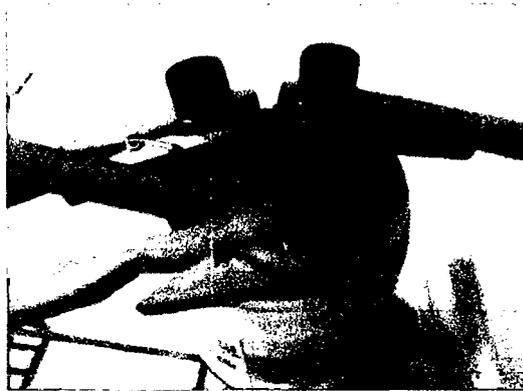
Reacción por 10 Min.



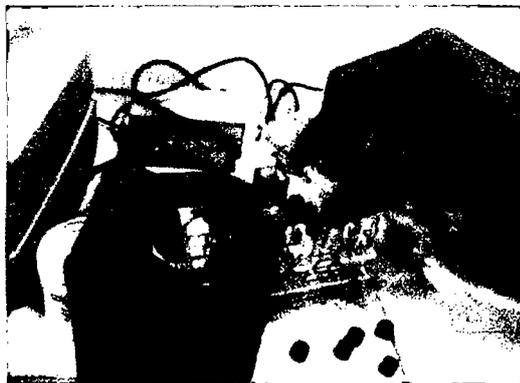
Inmersión en Agua A 100°C Por 3 Min.



Inmersión en Agua Helada



Medición de Absorbancia por Método DNS, Cálculo de Concentración de Producto y Cálculo de Actividad Enzimática.



ANEXO 4

Curva de Calibrado para azúcares reductores (Método DNS)

El principio de la metodología se fundamenta en la relación del 3,5-dinitrosalicílico que actúa como agente oxidante a la presencia del grupo reductor (aldehído) del azúcar, en un medio alcalino (NaOH), que aporta el medio para que se produzca la reacción Redox y el tartrato de sodio-potasio impide la disolución del oxígeno en la reacción. Por lo tanto, el 3,5-dinitrosalicílico que actúa como agente oxidante pasa a reducirse en ácido 3-amino, 5-nitrosalicílico y el azúcar que tiene un agente reductor se oxida por el lado del aldehído cambiando a grupo carboxílico.

La reacción resulta en forma de un compuesto coloreado (marrón) según la ley de Lambert Beer, la intensidad del este color es proporcional a la concentración de azúcares presentes.

Preparación del Reactivo:

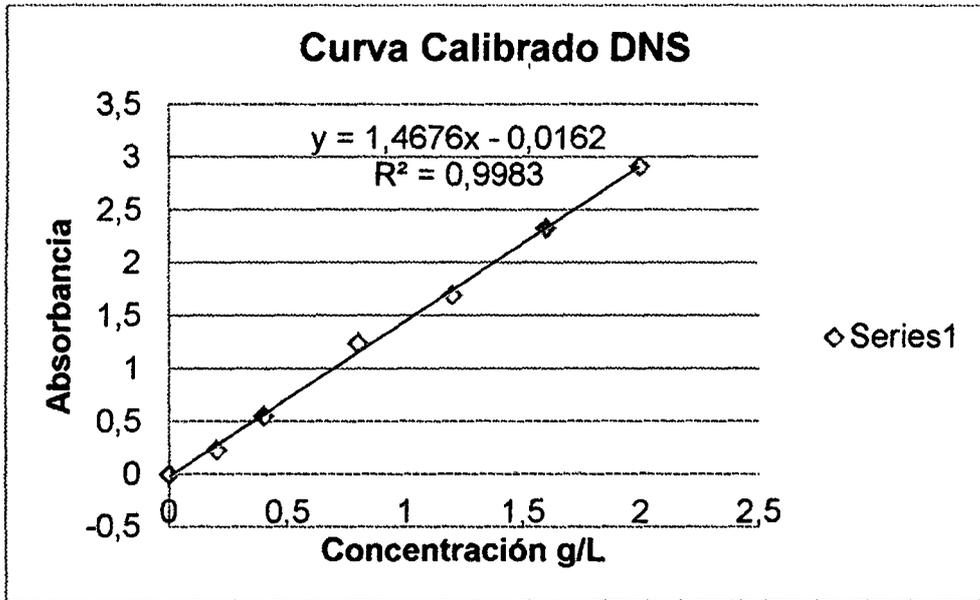
- ✓ 1.6mL/L de NaOH 2N
- ✓ 1g/L de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)
- ✓ 30g/L de tartrato de sodio y potasio tetrahidratado

Para la preparación del reactivo, se disolvió el tartrato en aproximadamente 15ml de agua destilada juntamente con el hidróxido de sodio y luego se agregó a los 50ml de agua destilada que están en constante agitación, posteriormente, cuando la mezcla calentó se le agregó el DNS poco a poco conforme se fue disolviendo, siempre en constante agitación. Luego se le agregó al matraz aforo hasta completar 100ml con agua destilada, posteriormente se agitó y se colocó en una botella de vidrio que fue cubierta rápidamente con papel aluminio, ya que este reactivo tiende a reaccionar con la luz.

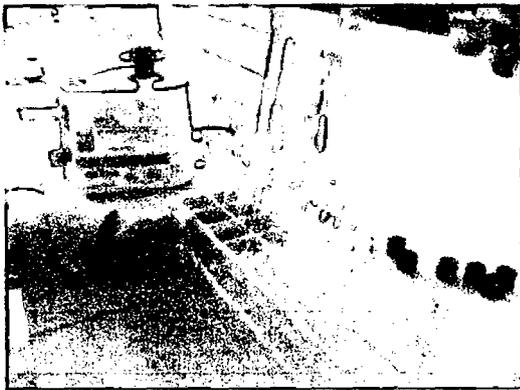
Procedimiento:

Se preparó una solución madre de fructosa a una concentración de 2g/l. se colocó en los tubos de ensayo (7), con sus respectivas diluciones y se le adicionó 0.5ml del reactivo DNS a todos los tubos; se llevó los tubos a ebullición durante 5 minutos para luego enfriarlos en agua helada por 3 minutos. Cuando se encontraron los tubos fríos se le agregó 5ml de agua destilada y se le dejó reposar 15min. Después se le llevó al agitador de tubos y se llevaron al espectrofotómetro para medir los azúcares reductores a 540nm. Con estos datos se construyó la curva de calibrado.

Nº Tubo	Sol. Fructosa (ml)	Vol. Agua (ml)	Azúcares Red. (g/L)	Absorbancia (540nm)
1	0.500	0.000	2.0	2.919
2	0.400	0.100	1.6	2.332
3	0.300	0.200	1.2	1.699
4	0.200	0.300	0.8	1.245
5	0.100	0.400	0.4	0.556
6	0.050	0.450	0.2	0.235
7	0.000	0.500	0.0	0



ADICIÓN DE AGUA DESTILADA



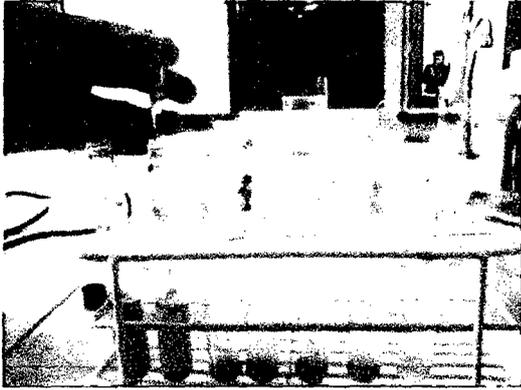
ADICIÓN DE REACTIVO DNS



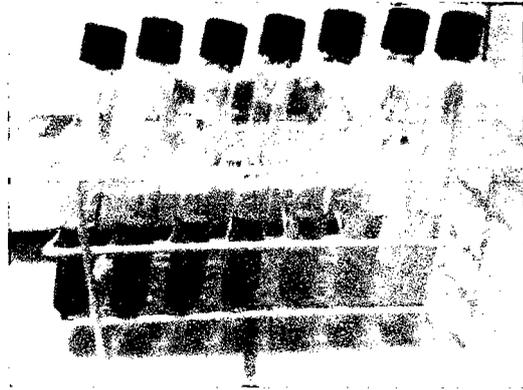
REACCIÓN EN AGUA A EBULLICIÓN POR 5 MIN. INMERSIÓN EN AGUA HELADA POR 3 MIN.



ADICIÓN DE AGUA DESTILADA



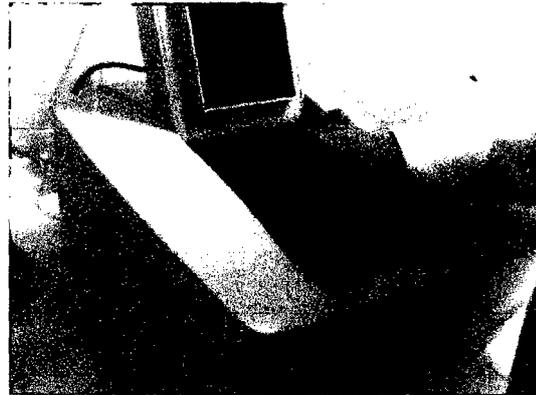
REPOSO POR 15 MIN.



AGITACIÓN MAX-MIX.



LECTURA DE ABSORBANCIA



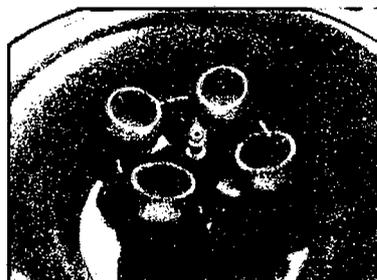
ANEXO 5

Concentración de la Enzima mediante la técnica de precipitación con Etanol

MEDIO DE FERMENTACIÓN



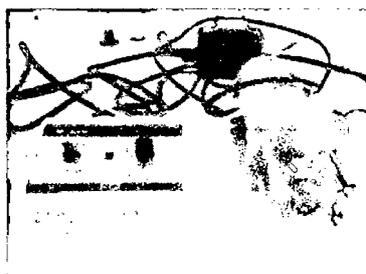
CENTRIFUGACIÓN DEL MEDIO



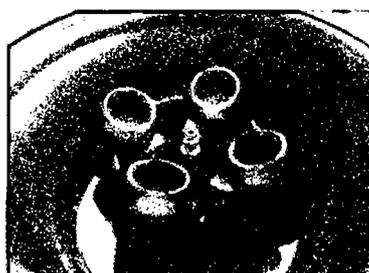
OBTENCIÓN DEL SOBRENADANTE



PRECIPITACIÓN CON ETANOL



CENTRIFUGACIÓN

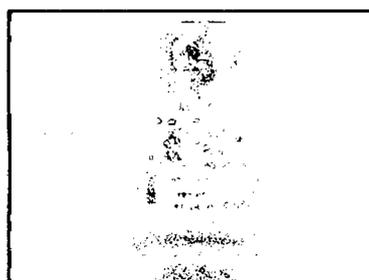


RE SUSPENSIÓN DEL PRECIPITADO ENZIMÁTICO

CON TAMPÓN CITRATO-FOSFATO



OBTENC. DEL MEDIO PRECIPITADO



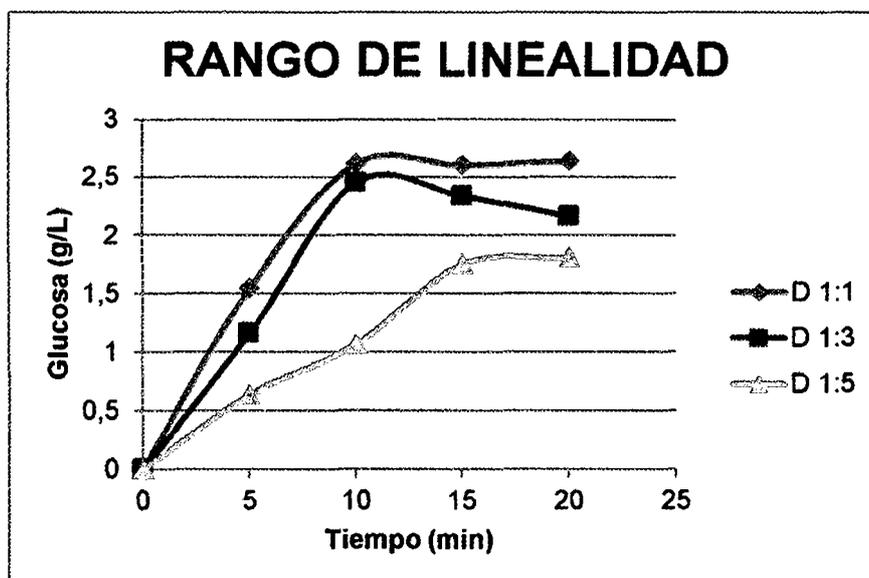
REFRIGERACIÓN



ANEXO 6

Determinación del Rango de Linealidad

EXTRACTO ENZIMA DILUCIÓN	Nº TUBO	TIEMPO min.	ABSORB. $\lambda=540\text{nm}$	F.D	CONCENTR. g/L	CONCENTR. FINAL (g/L)
01:01		0				0
	I	5	0.604	4	1.69037885	1.543063505
	II	10	0.998	4	2.764240938	2.616925593
	III	15	0.994	4	2.753338784	2.60602344
	IV	20	0.802	5	2.78754429	2.640228945
	B.S			0.2		0.147315345
	B.E		-0.091		-0.050967566	
01:03		0				0
	I	5	0.362	5	1.288498228	1.160261652
	II	10	0.615	6	2.580539657	2.45230308
	III	15	0.501	7	2.46688471	2.338648133
	IV	20	0.464	7	2.290406105	2.162169528
	B.S			0.172		0.128236577
	B.E		-0.077		-0.041428182	
01:05		0				0
	I	5	0.566	2	0.793404197	0.637912238
	II	10	0.583	3	1.224856909	1.06936495
	III	15	0.917	3	1.907604252	1.752112292
	IV	20	0.704	4	1.962932679	1.80744072
	B.S			0.212		0.15549196
	B.E		-0.031		-0.010084492	



ANEXO 7

Medición de Actividad Enzimática para determinar la Temperatura óptima

T (°C)	TUBO	ABSORB. ($\lambda=540\text{nm}$)		CONCENTR. (g/L)	CONCENTR. FINAL (g/L)	promedio	ACTIVIDAD (UI/ml)
		MEDICION ABS.	F.D				
35	I	0.668	2	0.9591	0.9506	0.9312	17.0696
	II	0.642	2	0.9204	0.9119		
	BS	0.035	1	0.0085			
	BE	0	1	0.0000			
40	I	0.885	2	1.2820	1.2401	1.2438	22.7986
	II	0.89	2	1.2895	1.2475		
	BS	0.08	1	0.0420			
	BE	0	1	0.0000			
45	I	0.82	3	1.7779	1.7360	1.7248	31.6158
	II	0.81	3	1.7556	1.7136		
	BS	0.08	1	0.0420			
	BE	0	1	0.0000			
50	I	1.1	3	2.4030	2.4057	2.2494	41.2323
	II	0.96	3	2.0905	2.0932		
	BS	0.02	1	-0.0027			
	BE	0	1	0.0000			
55	I	1.23	3	2.6933	2.6662	2.5657	47.0294
	II	1.14	3	2.4923	2.4652		
	BS	0.06	1	0.0271			
	BE	0	1	0.0000			
60	I	1.209	2	1.7643	1.7595	1.7156	31.4466
	II	1.15	2	1.6764	1.6717		
	BS	0.03	1	0.0048			
	BE	0	1	0.0000			
65	I	0.66	1	0.4736	0.4458	0.4309	7.8978
	II	0.62	1	0.4438	0.4160		
	BS	0.061	1	0.0278			
	BE	0	1	0.0000			

ANEXO 8

Estabilidad térmica en el tiempo y Temperatura de la enzima inulinasa actuando sobre Sacarosa (20 g/L).

Tabla A1. Estabilidad térmica de Inulinasa a 48°C, actuando sobre sacarosa (20 g/L)

Tiempo (h)	Av	Ln Av	Ln (Av/Av inicial)	% Actividad Residual
0	47.096	3.8522	0	100
0.5	30.1822	3.4073	-0.444935898	64.0865355
1	29.7934	3.3943	-0.457901179	63.2609988
1.5	27.7265	3.3224	-0.529799437	58.8723034
2	24.8601	3.2133	-0.638923963	52.7860116
3	20.0182	2.9966	-0.855546212	42.505096
4	19.8832	2.9899	-0.862312918	42.2184474
5	17.6594	2.8713	-0.980919852	37.4966027

Tabla A2. Estabilidad térmica de Inulinasa a 50°C, actuando sobre sacarosa (20 g/L)

Tiempo(h)	Av(UI/ml)	Ln v	Ln (Av/Av inicial)	% Actividad Residual
0	47.096	3.852	0	100
0.5	28.5519	3.352	-0.500465714	60.6248255
1	25.14114204	3.225	-0.627682443	53.3827544
1.5	21.71131617	3.078	-0.774354465	46.1001278
2	20.07133824	2.999	-0.852895232	42.6179256
3	17.41380166	2.857	-0.994924981	36.9751182
4	12.51736369	2.527	-1.325071296	26.5784009

Tabla A3. Estabilidad térmica de Inulinasa a 53°C, actuando sobre sacarosa (20 g/L)

Tiempo (h)	Av	Ln Av	Ln (Av/Av inicial)	% Actividad Residual
0	47.096	3.85	0	100
0.5	22.180632	3.10	-0.752968594	47.0966367
1	18.026368	2.89	-0.960352496	38.2757941
1.5	11.1708	2.41	-1.438884841	23.7192118
2	9.0425	2.20	-1.650252387	19.2001444
3	4.1474	1.42248163	-2.42970644	8.80626805
4	3.629	1.28895713	-2.563230943	7.70553763

Tabla A4. Estabilidad térmica de Inulinasa a 55°C, actuando sobre sacarosa (20 g/L)

Tiempo(h)	Av(UI/ml)	Ln V	Ln (Av/Av inicial)	% Actividad Residual
0	47.096	3.85	0	100
0.5	19.0359	2.95	-0.905861402	40.4193562
1	13.8107	2.63	-1.226744418	29.3245711
1.5	8.505	2.14	-1.711533846	18.0588585
2	4.2552	1.45	-2.404046307	9.03516222
3	2.1283	0.75532354	-3.096864533	4.51906744
4	0.6821	-0.382579	-4.234767076	1.44831833

Tabla A5. Estabilidad térmica de Inulinasa a 60°C, actuando sobre sacarosa (20 g/L)

Tiempo(h)	Av(UI/ml)	Ln V	Ln (Av/Av inicial)	% Actividad Residual
0	47.096	3.85	0	100
0.5	0.5553	-0.59	-4.440434842	1.17908103
1	0.1569	-1.85	-5.704334691	0.33314931

ANEXO 9

Estabilidad térmica en el tiempo y Temperatura de la enzima inulina actuando sobre Inulina (10 g/L).

Tabla A6. Estabilidad térmica de Inulina a 48°C, actuando sobre inulina
(10 g/L)

Tiempo(h)	Av(UI/ml)	Ln v	Ln(Av/Av inicial)	% Actividad Residual
0	3.0901	1.1282	0	100.0000
0.5	2.8650	1.0526	-0.075631726	92.7158
1	1.7599	0.5653	-0.562946464	56.9528
1.5	0.6412	-0.4444	-1.572617311	20.7501
3	0.4434	-0.8133	-1.941486435	14.3491
4	0.1364	-1.9922	-3.120366986	4.4141

Tabla A7 Estabilidad térmica de Inulina a 50°C, actuando sobre inulina
(10 g/L)

Tiempo(h)	Av(UI/ml)	Ln Av	Ln (Av/Av inicial)	% Actividad Residual
0	3.0901	1.128	0	100
0.5	2.148	0.765	-0.363666276	69.5123
1	1.119	0.112	-1.015768024	36.2124
1.5	0.614	-0.488	-1.615963804	19.8699
2	0.58	-0.545	-1.672930628	18.7696

Tabla A8. Estabilidad térmica de Inulinasa a 53°C, actuando sobre inulina
(10 g/L)

Tiempo(h)	Av(UI/ml)	Ln Av	Ln(Av/Av inicial)	% Actividad Residual
0	3.0901	1.13	0	100
0.5	1.091	0.09	-1.041108746	35.3063
1	0.723	-0.32	-1.45254951	23.3973
1.5	0.416	-0.88	-2.005273472	13.4623
2	0.368	-1.00	-2.127875794	11.9090

Tabla A9. Estabilidad térmica de Inulinasa a 55°C, actuando sobre inulina
(10 g/L)

Tiempo(h)	Av(UI/ml)	Ln Av	Ln(Av/Av inicial)	% Actividad Residual
0	3.0901	1.13	0	100
0.5	0.805	-0.22	-1.345116454	26.0509
1	0.696	-0.36	-1.490609071	22.5235
1.5	0.587	-0.53	-1.660933912	18.9961
2	0.116	-2.15	-3.282368541	3.7539

Tabla A10. Estabilidad térmica de Inulinasa a 60°C, actuando sobre inulina
(10 g/L)

Tiempo(h)	Av(UI/ml)	Ln Av	Ln(Av/Av inicial)	% Actividad Residual
0	3.0901	1.13	0	100
0.5	0.103	-2.27	-3.401229744	3.3332
1	0.064	-2.75	-3.877075648	2.0711

ANEXO 10

Valor de Actividad enzimática según datos experimentales, datos obtenidos del modelamiento matemático y el tiempo de vida media en el rango de temperaturas de 35-60°C

Tabla A11. Actividad determinada por el experimento, por el modelo matemático y tiempo de vida media en Sacarosa 20g/L.

T (°C)	Actividad según experimento			Tiempo de vida media			Actividad según modelamiento		
	Av	Av max	Av relativa	T	Tmax	τ relativa	Av modelamiento	Av max	Av relativa
35	17.0696	47.0294	0.3630				16.02672153	41.2645681	0.38838942
40	22.7986	47.0294	0.4848				21.06023169	41.2645681	0.51037083
45	31.6158	47.0294	0.6723				27.35139919	41.2645681	0.66283013
48	37.1512	47.0294	0.7900	4.1907	4.1907	1.0000	31.70476467	41.2645681	0.76832901
50	41.2323	47.0294	0.8767	2.4835	4.1907	0.5926	34.74295704	41.2645681	0.84195615
53	44.3500	47.0294	0.9430	1.0957	4.1907	0.2615	39.07752201	41.2645681	0.94699942
55	47.0294	47.0294	1.0000	0.6887	4.1907	0.1643	41.26456813	41.2645681	1
60	31.4466	47.0294	0.6687	0.1215	4.1907	0.0290	38.21551042	41.2645681	0.92610955

Tabla A12. Actividad determinada por el experimento, por el modelo matemático y tiempo de vida media en Inulina 10g/L

T (°C)	Actividad según experimento			Tiempo de vida media			Actividad según modelamiento		
	Av	Av max	Av relativa	T	Tmax	τ relativa	Av modelamiento	Av max	Av relativa
35	1.4000	3.0901	0.4531				1.990406275	3.11408493	0.63916249
40	2.0000	3.0901	0.6472				2.352643637	3.11408493	0.75548474
45	2.4800	3.0901	0.8026				2.714676682	3.11408493	0.87174138
48	2.6000	3.0901	0.8414	0.8970	0.8970	1.0000	2.906154815	3.11408493	0.93322914
50	2.7200	3.0901	0.8802	0.7537	0.8970	0.8403	3.009611913	3.11408493	0.96645145
53	2.9560	3.0901	0.9566	0.6639	0.8970	0.7401	3.105634965	3.11408493	0.99728653
55	3.0901	3.0901	1.0000	0.5037	0.8970	0.5615	3.114084932	3.11408493	1
60	1.120	3.0901	0.3624	0.1788	0.8970	0.1993	2.855954896	3.11408493	0.91710886



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL



OFICINA CENTRAL DE INVESTIGACIÓN

CATÁLOGO DE TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN Y TESIS

ASAMBLEA NACIONAL DE RECTORES

Resolución N°1562-2006-ANR

RESUMEN DE TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN Y TESIS

I. NIVEL

- **PREGRADO**

-FACULTAD: Ingeniería

-ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL: Ingeniería
Agroindustrial

-TÍTULO PROFESIONAL: Ingeniero Agroindustrial

-TÍTULO DEL TRABAJO: "Modelamiento matemático de la estabilidad térmica de la inulinasa de *Kluyeromyces marxianus* fermentado en extracto de yacón (*Polymnia sanchifolia*)".

-AUTORES: Diestra Balta Jesús Grabiél (DNI 70553964)

Margarito Aguilar Lucas Eli (DNI 4712435)



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

FACULTAD DE INGENIERÍA

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL



II. CONTENIDO DEL RESUMEN

-METODOLOGÍA:

La enzima fue obtenida de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571, en un cultivo por lotes en extracto de yacón (*Polymnia sanchifolia*) como medio complejo, y purificada por precipitación con etanol. Las actividades enzimáticas, se determinaron por mediciones de velocidad inicial sobre 20 g/L de sacarosa y 10 g/L de inulina a 55°C y pH 5.0. Se evaluó la estabilidad térmica de la enzima en el rango de temperaturas de 48-60°C y se modelaron los valores de actividad enzimática utilizando un modelo matemático obtenido a partir de constantes y parámetros cinéticos.

-PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

¿Será posible describir la estabilidad térmica de la inulinasa de *Kluyveromyces marxianus* fermentado en extracto de yacón, mediante un modelo matemático obtenido a partir de constantes y parámetros cinéticos?

-OBJETIVOS:

- Obtener la Inulinasa soluble a partir de la fermentación de *Kluyveromyces marxianus* NRRL- Y7571 sobre extracto de yacón en un cultivo por lotes.
- Concentrar con etanol la enzima soluble obtenida de la fermentación.
- Determinar las energías de activación (E_a) de las actividades de Inulinasa sobre sacarosa 20g/L e inulina 10g//L.
- Determinar la estabilidad térmica de la Inulinasa en el rango de 48-60°C.
- Determinar las energías de desactivación (E_d) de la actividad de Inulinasa sobre sacarosa e inulina.
- Evaluar el tiempo de vida media de la enzima soluble en el rango de temperaturas de 48-60°C.



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

FACULTAD DE INGENIERÍA

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL



- Determinar experimentalmente el valor de los parámetros y constantes cinéticas para la enzima estudiada.
- Obtener el valor de temperatura de proceso de un reactor enzimático en base al modelamiento matemático.

-HIPÓTESIS:

Es posible describir la estabilidad térmica de la inulinasa de *Kluyveromyces marxianus* fermentado en extracto de yacón, mediante un modelo matemático obtenido a partir de constantes y parámetros cinéticos.

-REFERENCIA AL MARCO TEÓRICO

Las inulinasas son 2,1-B-D-fructano furohidrolasas (E.C. 3.2.1.7) que catalizan la hidrólisis de inulina produciendo inulooligosacáridos, fructosa y glucosa como productos principales (Neagu y Bahrim, 2011). En la actualidad existe un gran interés por producir Inulinasa, purificarla y caracterizarla a partir de cultivos microbianos en medios sintéticos y complejos de extractos de vegetales, siendo las levaduras *Kluyveromyces* las más estudiadas (Castillo y Chamy, 2010; Cazetta *et al.*, 2005;). La presencia de inulina en tubérculos de yacón (*Polymnia sonchifolia*) aumenta el interés de estudiar este vegetal como sustrato para el crecimiento de microorganismos que usen este polisacárido para producir Inulinasa (Cazetta *et al.*, 2005). En los últimos años se ha incrementado el interés por la búsqueda de las mejores condiciones de operación para la producción de fructosa mediante la hidrólisis de inulina y utilizando inulinasas. Sin embargo, no se han realizado trabajos integrales que permitan estudiar la estabilidad térmica de la enzima en un amplio rango de temperaturas. El conocimiento de la cinética de reacción y velocidad de desactivación enzimática y su efecto global sobre el progreso de la reacción, podría ser muy útil para el



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL



desarrollo de las potencialidades de producción de fructosa a partir de la hidrólisis enzimática de inulina. (Ricca *et al.*, 2009).

-CONCLUSIONES

- Se obtuvo un extracto enzimático con actividad enzimática de inulinasa a partir de la fermentación de *Kluyveromyces marxianus* NRRL- Y7571 sobre extracto de yacón en un cultivo por lotes realizado en matraces.
- Se purificó la enzima inulinasa mediante la técnica de precipitación con etanol al 55% con un flujo de 10mL/min.
- Se evaluó la actividad enzimática volumétrica del proceso de concentración resultando pérdidas de 26.02% y 12.62% en actividad invertasa e inulinasa respectivamente, cuando la enzima actúa sobre Sacarosa 20g/L e Inulina 10g/L.
- Se determinó que los valores de energía de activación de la actividad de Inulinasa sobre sacarosa 20g/L e inulina 10g/L, están en una relación de 1.47.
- Se determinó que la temperatura óptima para la actividad enzimática actuando sobre sacarosa 20g/L e inulina 10g/L fue 55°C en ambos casos.
- Se determinó que los valores de energía de desactivación en la actividad de Inulinasa sobre sacarosa 20g/L e inulina 10g/L, están en una relación de 2.23.
- Se determinó que el tiempo de vida media máximo de la enzima purificada se logra a 48°C para ambos casos.
- Se obtuvieron modelos matemáticos que permiten predecir la actividad enzimática de la inulinasa actuando sobre sacarosa 20g/L e inulina 10g/L, en relación a los cambios de la temperatura en el rango de 35-60°C y el tiempo.



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

FACULTAD DE INGENIERÍA

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



- Se determinó, en base al modelamiento matemático, que la temperatura de proceso adecuada para la reacción de la enzima inulinasa actuando sobre sacarosa 20g/l e inulina 10g/L fue 6°C menor que la temperatura óptima para ambos casos.

-BIBLIOGRAFÍA

- Castillo, A. & Chamy R. (2010). Producción de inulinasa por levaduras de *Kluyveromyces marxianus*. *Scientia Agropecuaria*, 3y4, 235-245.
- Cazetta, M., Martins, P., Monti, R. & Contiero, J.(2005). Yacón (*Polymnia sanchifolia*) extract as a substrate to produce inulinase by *Kluyveromyces marxianus* var. *vulgaricus*. *Journal of food engineering*, 34,179-184.
- Castillo, A. (2013). Optimización de los parámetros ambientales de la fermentación de *Kluyveromyces marxianus* en extracto de yacón para la producción de inulinasa. *Actas del 9th World Congress of Chemical Engineering*. Agosto 2013. Seúl, Corea del Sur.
- Chen Han-Qing. Chen Xiao-Ming. Chen Tian-Xiang. Xu Xue-Ming. & Jin Zheng-Yu. (2011). Optimización de la extracción de inulinasa obtenida por fermentación en estado sólido de *Aspergillus ficuum* JNSP5-06. *Carbohydrate Polymers*, 85, 446–451.
- Chi Zhen-Ming. Tong Zhang. Cao Tian-Shu. Xiao-Yan Liu, Wei Cui. & Chun-Hai Zhao. (2011). Potencial biotecnológico de la inulina para bioprocesos. *Bioresource Technology*, 102, 4295–4303.
- Doran, P. (1998). Principios de ingeniería de los bioprocesos. España: Editorial Acribia S.A, pg 285-287.
- De Paula, F., Cazetta, M., Monti, R. & Contiero, J. 2008. Hidrólisis de sacarosa por inulinasa inmovilizada en gelatina proveniente de *Kluyveromyces marxianus* var. *Bulgaricus*. *Food Chemistry*, 111, 691-695.



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

FACULTAD DE INGENIERÍA

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



- Dhiman, V. (2013) .Optimization of thermostable Inulinase production from *Aspergillus* isolated from Punjab region. Journal of sustainable biotechnology. India,24, 28-32.
- Hermann M, Freire I & Pazos,C. (1999). Compositional diversity of the yacón storage root. In: Impact on a changing world: Program report 1997-98. International Potato Center (CIP), Lima (Perú), p. 425-432.
- Singh Prabhjeet & Gill Prabhjot Kaur. (2006). Production of Inulinases; Recent Advances. Food Technol. Biotechnol, 44 (2), 151–162.
- Ricca, E. Calabró, V. Curcio, S & Lorio,G. (2007). The State of the Art in the production of Fructose from Inulin Enzymatic Hydrolysis. Crit Rev Biotech, 27,129-145.
- Ricca, E. Calabró, V. Curcio, S & Lorio,G. (2009). Optimization of inulin hydrolysis by inulinase accounting for enzyme time- and temperature-dependent deactivation. Biochemical Engineering Journal ,48 (2009), 81–86.
- Santos, A.M., Oliveira, M.G. & Mauger, F. (2006) “Modeling thermal stability and activity of free and immobilized enzymes as a novel tool for enzyme reactor design”. Bioresource Technology, 98,3142–3148.
- Zhenming Chi, Zhe Chi, Tong Zhang, Guanglei Liu (2009). Inulinase-expressing microorganisms and applications of inulinases, China.
- Zittan, L. (1981). Enzymatic hydrolysis of inulin-an alternative way to fructose production. Starch, 33, 373-377.