

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA ACADÉMICA PROFESIONAL DE INGENIERÍA
AGROINDUSTRIAL**



UNS
UNIVERSIDAD
NACIONAL DEL SANTA

**“Estudio de la producción de inulinasa por fermentación
en extractos de alcachofa (*Cynara Scolymus*)
y espárrago (*Asparagus officinalis*)”**

**Tesis para optar el Título Profesional de Ingeniero
Agroindustrial**

Autores:

**Bach. Egoavil Soto, Crying Mishel
Bach. Yupanqui Mendoza, Katherine Yamila**

Asesor:

**Dr. Castillo Calderón, Augusto
DNI. N°. 32931123
Código ORCID: 0000-0001-9237-8542**

**Nuevo Chimbote - Perú
2023**



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA.



FACULTAD DE INGENIERÍA

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

CARTA DE CONFORMIDAD DEL ASESOR

El presente trabajo de tesis titulado “**Estudio de la producción de inulina por fermentación en extractos de alcachofa (*Cynara Scolymus*) y espárrago (*Asparagus officinalis*)**”, para obtener el título profesional de ingeniero agroindustrial, presentado por los bachilleres: **Egoavil Soto, Crying Mishel y Yupanqui Mendoza, Katherine Yamila**, ha contado con el asesoramiento de quien deja constancia de su aprobación. Por tal motivo, firmo el presente trabajo en calidad de asesor.

Dr. Castillo Calderón, Augusto

Asesor

DNI: 32931123

Código ORCID: 0000-0001-9237-8542



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA.



FACULTAD DE INGENIERÍA

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

HOJA AVAL DE JURADO EVALUADOR

El presente trabajo de tesis titulado “Estudio de la producción de inulina por fermentación en extractos de alcachofa (*Cynara Scolymus*) y espárrago (*Asparagus officinalis*)”, para obtener el título profesional de ingeniero agroindustrial, presentado por los bachilleres: **Egoavil Soto, Crying Mishel** y **Yupanqui Mendoza, Katherine Yamila**, teniendo como asesor al Dr. Castillo Calderón, Augusto, designado mediante resolución decanal N° 397-2019-UNS-FI. Ha sido revisado y aprobado el día 10 de mayo del 2023, por el siguiente jurado evaluador designado mediante resolución N°148-2023-UNS-CFI.

Dra. Paucar Menacho, Luz María
Presidente
DNI: 08099817
Código ORCID: 0000-0001-5349-6167

Dr. Castro Zavaleta, Víctor Augusto
Secretario
DNI: 17859760
Código ORCID: 0000-0003-3214-2698

Dr. Castillo Calderón, Augusto
Integrante
DNI: 32931123
Código ORCID: 0000-0001-9237-8542

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Siendo las 10:00 horas del día diez de mayo del dos mil veintitrés, se instalaron en el aula multimedia de la EPIA – 1er piso, el Jurado Evaluador, designado mediante T/Resolución N° 148-2023-UNS-CFI integrado por los docentes:

- **Dra. Luz María Paucar Menacho** (Presidente)
- **Dr. Víctor Augusto Castro Zavaleta** (Secretario)
- **Dr. Augusto Castillo Calderón** (Integrante)
- **Dr. Wilson Daniel Símpalo López** (Accesitario)

Para dar inicio a la Sustentación del Informe Final de Tesis:

“ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE INULINASA POR FERMENTACIÓN EN EXTRACTOS DE ALCACHOFA (*Cynara Scolymus*) Y ESPÁRRAGO (*Asparagus officinalis*)”, elaborado por los bachilleres en Ingeniería Agroindustrial:

- **EGOAVIL SOTO CRYING MISHEL**
- **YUPANQUI MENDOZA KATHERINE YAMILA**

Asimismo, tiene como Asesor a la docente: **Dr. Augusto Castillo Calderón**.

Finalizada la sustentación, el Tesista respondió las preguntas formuladas por los miembros del Jurado Evaluador.

El Jurado después de deliberar sobre aspecto relacionados con el trabajo, contenido y sustentación del mismo, y con las sugerencias pertinentes en concordancia con el Artículo 103° del Reglamento de Grados y títulos de la Universidad Nacional del Santa, declaran:

BACHILLER	PROMEDIO VIGESIMAL	PONDERACIÓN
EGOAVIL SOTO CRYING MISHEL	DIECIOCHO	BUENO

Siendo las 11:30 horas del mismo día, se dio por terminada dicha sustentación, firmando en señal de conformidad el Jurado Evaluador.

Nuevo Chimbote, 10 de mayo del 2023.



Dra. Luz María Paucar Menacho
Presidente



Dr. Víctor Augusto Castro Zavaleta
Secretario



Dr. Augusto Castillo Calderón
Integrante

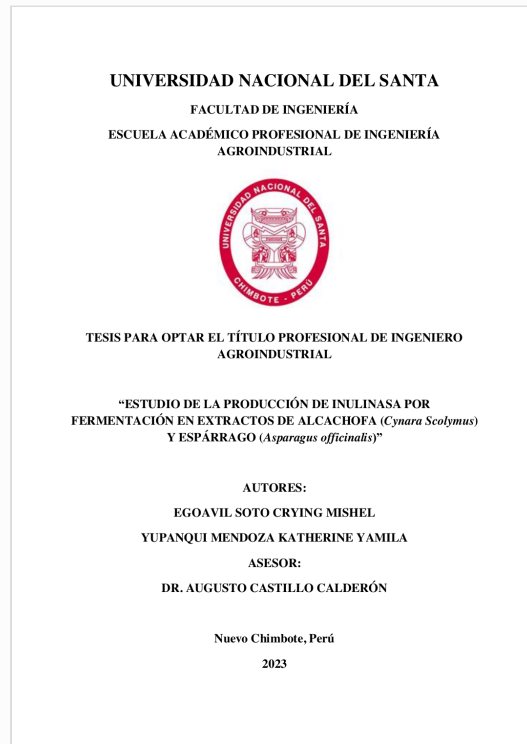


Recibo digital

Este recibo confirma que su trabajo ha sido recibido por **Turnitin**. A continuación podrá ver la información del recibo con respecto a su entrega.

La primera página de tus entregas se muestra abajo.

Autor de la entrega: Katherine Yupanqui
Título del ejercicio: Informe-tesis
Título de la entrega: TESIS AGROINDUSTRIAL-KATHERINE-MISHEL
Nombre del archivo: Tesis_17.05.23_turnitin.pdf
Tamaño del archivo: 1.32M
Total páginas: 71
Total de palabras: 15,455
Total de caracteres: 76,323
Fecha de entrega: 17-may.-2023 10:57p. m. (UTC-0500)
Identificador de la entrega... 2095955271



DEDICATORIA

A Dios por permitirme llegar hasta este momento y nunca haberme abandonado en momentos de incertidumbre.

A mis padres Olinda y Nestor quienes son mi mayor motivación, por todo el apoyo brindado durante mi etapa universitaria siendo mi fortaleza día a día. A mi hermano Frank por su amistad incondicional.

A mi asesor y mis profesores de la universidad quienes me brindaron muchos conocimientos y me formaron académicamente para lograr dar este importante paso.

A mis compañeros y amigos de la universidad quienes hicieron fácil y grata mi estadía durante los años compartidos. A mi compañera de tesis por haber sido mi soporte en la culminación de esta investigación.

Mishel Egoavil Soto

DEDICATORIA

A Dios, mi Padre, quien me inspiro en la formación del proyecto desde el inicio hasta el final, por brindarme sabiduría, y salud, así poder lograr cumplir mis metas como profesional y persona.

A mis padres Eusebia y Apolinar, que me inculcaron de pequeña el respeto, humildad y amor, quienes hoy son un pilar fundamental en mi vida.

A mi hermano Sergio, por estar a mi lado y apoyarme como amigo, y ser la persona quien me instruyó en cada peldaño de vida universitaria,

A mis profesores de la E.A.P de Ingeniería Agroindustrial, en especial a mi asesor Augusto Castillo, por haberme transmitido diversos conocimientos en cada etapa académica.

Katherine Yupanqui

AGRADECIMIENTO

Primero agradecer a Dios, por habernos brindado la dicha de llegar a este momento y culminar satisfactoriamente esta investigación.

A nuestras familias por ser un gran soporte durante todo este tiempo con su apoyo incondicional. De manera especial a nuestro asesor el Dr. Augusto Castillo Calderón, por su constante apoyo desde la concepción de las primeras ideas de esta investigación, las etapas que comprendieron su desarrollo y hasta la sustentación del informe final; agradecer sus enseñanzas, ideas y conocimientos compartidos en todo este camino de la investigación, gracias a su experiencia y sabiduría supo direccionarnos.

A los docentes de la Escuela de Ingeniería agroindustrial de la UNS, quienes nos formaron como profesionales íntegros al servicio de nuestra comunidad y de manera especial a la Ing. Berenice Córdova por orientarnos durante la ejecución de la presente investigación.

Por último, pero no menos importante a nuestra querida amiga Evelyn Pasión por su amistad, por siempre estar pendiente de nosotras, ser un ejemplo de superación y animarnos a culminar nuestros objetivos.

ÍNDICE

	Pág.
Carátula.....	i
Hoja del asesor.....	ii
Aval de los jurados.....	iii
Dedicatoria y agradecimiento.....	vi
Índice.....	xi
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
I. INTRODUCCION	14
II. MARCO TEÓRICO	15
2.1. Materias Primas	15
2.1.1. Alcachofa.....	15
2.1.1.1. Generalidades de la Alcachofa.....	15
2.1.1.2. Variedades de Alcachofa más comunes en el Perú.....	15
2.1.1.3. Composición de la Alcachofa	16
2.1.1.4. La Alcachofa como residuo agroindustrial	17
2.1.2. Espárrago	18
2.1.2.1. Generalidades del Espárrago.....	18
2.1.2.2. Tipos de espárrago	18
2.1.2.3. Composición del espárrago.....	21
2.2. Inulina	21
2.4. Fermentación.....	25
2.4.1. Concepto	25
2.4.1.1. Cultivo por Lotes	25
2.4.1.2. Producción de enzimas microbianas	26
2.5. Enzimas.....	27
2.5.1. Definición	27
2.5.2. Actividad Enzimática	27
2.5.3. Cinética Enzimática.....	27
2.5.4. Inulinasa.....	27
2.5.5. Microorganismo productor de la Enzima Inulinasa: <i>Kluyveromyces Marxianus</i>	28
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29

3.1.	Método de estudio.....	29
3.2.	Localización del experimento	29
3.3.	Material de estudio.....	29
3.3.1.	Biológico	29
3.3.2.	Materia Prima	29
3.4.	Materiales e instrumentos	29
3.4.1.	Reactivos	29
3.4.2.	Materiales	30
3.4.3.	Equipos e instrumentos.....	31
3.4.4.	Otros	32
3.5.	Metodología	33
3.5.1.	Obtención y procesamiento de las materias primas.....	33
3.5.2.	Métodos de análisis	36
3.5.3.	Diseño y preparación del medio de cultivo	37
3.5.4.	Optimización de la concentración de sustrato y agitación del medio de fermentación.....	39
3.5.5.	Determinación de la actividad enzimática.....	39
3.5.5.1.	Determinación de Azúcares Reductores por Método DNS	40
A.	Curva de calibrado DNS	40
B.	Procedimiento para su determinación	40
3.5.6.	Determinación de Glucosa por Kit God Pop	41
3.5.7.	Análisis Estadístico de Curva de Calibrado DNS	42
3.6.	Diseño experimental	43
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
4.1.	Determinación de la composición fisicoquímica de las materias primas	47
4.2.	Obtención de los extractos	50
4.3.	Determinación de valores de parámetros cinéticos Km y Vmax, en la fermentación de <i>kluveromyces marxianus</i> , para producción de la enzima inulinasa.....	54
4.4.	Análisis preliminar del contenido de sólidos disueltos (°Brix) en el extracto de espárrago y extracto de Alcachofa.....	55
4.5.	Optimización de la actividad enzimática en la producción de caldo crudo enzimático de inulinasa a partir de un cultivo en matraces de <i>kluveromyces marxianus</i> , en un medio que contiene extracto de alcachofa y otro de extracto de espárrago como fuente de carbono y energía.....	56
V.	CONCLUSIONES.....	79

V. RECOMENDACIONES	80
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
ANEXO 1	86
ANEXO 2	87
ANEXO 3	89
ANEXO 4	91
ANEXO 5	92
ANEXO 6	93
ANEXO 7	95
ANEXO 8	96
ANEXO 9	97
ANEXO 10	98
ANEXO 11	101

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Composición de la alcachofa (100 g de materia seca).....	17
Tabla 2. Composición del espárrago por 100g.	21
Tabla 3. Materias primas fuente de inulina	23
Tabla 4. Comparación de tres fructanos	24
Tabla 5. Composición de medios para la fermentación de <i>kluveromyces marxianus</i>	38
Tabla 6. Medición de la actividad enzimática	39
Tabla 7. Detalle de técnica para curva de calibrado DNS	40
Tabla 8. Matriz de variables independientes utilizadas en el modelo	44
Tabla 9. Diseño experimental según DCCR para las variables concentración de extracto y agitación del medio con extracto de alcachofa	45
Tabla 10. Diseño experimental según DCCR para las variables concentración de extracto y agitación del medio con extracto de espárrago.....	46
Tabla 11. Composición química de las brácteas de alcachofa en base seca.....	47
Tabla 12. Composición química del espárrago en base seca.....	48
Tabla 13. Composición Fisicoquímica del extracto de brácteas de alcachofa en porcentual en base seca	49
Tabla 14. Composición Fisicoquímica del extracto de espárrago en porcentual en base seca.....	49
Tabla 15. Rendimiento para los extractos	51
Tabla 16. Características fisicoquímicas de los extractos	52
Tabla 17. Determinación de Proteínas.....	53
Tabla 18.....	54
Tabla 19. Análisis de Grado °Brix de soluciones.....	55
Tabla 20. Diseño experimental según DCCR para las variables de concentración de extracto de espárrago y agitación – valores codificados y reales.....	57
<i>Tabla 21.</i> Análisis de varianza (ANOVA) de la actividad enzimática de inulinasa con extracto de espárrago sobre inulina.....	58
<i>Tabla 22.</i> Análisis de Varianza (ANOVA) de la actividad enzimática de inulinasa con extracto de espárrago sobre sacarosa.....	62
Tabla 23. Valores deseables para maximizar el valor del grado de actividad enzimática de extracto espárrago.....	66
Tabla 24. Valores óptimos de actividad enzimática en extracto de espárrago.....	67

Tabla 25. <i>Diseño Experimental según DCCR para las variables de concentración de extracto de alcachofa y agitación – Valores Codificados y Reales.</i>	68
Tabla 26. Análisis de Varianza (ANOVA) de la actividad enzimática de inulinasa con extracto de alcachofa sobre inulina	69
Tabla 27. Análisis de Varianza (ANOVA) de la actividad enzimática de inulinasa con extracto de alcachofa sobre sacarosa.....	73
Tabla 28. Valores deseables para maximizar el valor del grado de actividad enzimática de extracto de alcachofa	77
Tabla 29. Valores óptimos de actividad enzimática en extracto de alcachofa	78
Tabla 30. Determinación de humedad en ambos extractos	90
Tabla 31 . Detalle de técnica para curva de calibrado Bradford.....	95
Tabla 32 . Curva de KID GOD POD DE GLUCOSA.....	97
Tabla 33. Parámetros cinéticos Km y Vmax ajustados al modelo de Lineweaver-Burk.	101
Tabla 34. Parámetros cinéticos Km y Vmax ajustados al modelo de Lineweaver-Burk.	103
Tabla 35. Parámetros cinéticos Km y Vmax ajustados al modelo de Lineweaver-Burk.	105
Tabla 36. Parámetros cinéticos Km y Vmax ajustados al modelo de Lineweaver-Burk.	107

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Alcachofa en el Perú	15
Figura 2. Espárrago triguero o silvestre.....	19
Figura 3. Espárrago blanco	20
Figura 4. Espárrago perico.....	20
Figura 5.....	23
Figura 6. Fases de un cultivo por lote.....	26
Figura 7. Materias primas	29
<i>Figura 8. Determinación de azúcares reductores por el método de DNS</i>	<i>41</i>
Figura 9. Diagrama de pareto para la actividad Enzimática Inulinasa - Extracto De Espárrago sobre inulina.	60
Figura 10. Superficie de respuesta de actividad inulinasa de extracto de espárrago – inulina.....	61
Figura 11. Gráfica de contorno de actividad Inulinasa de extracto de espárrago – inulina.....	61
Figura 12. Diagrama de Pareto para la actividad enzimática inulinasa – extracto de espárrago sobre sacarosa	64
Figura 13. Superficie de Respuesta de actividad inulinasa de extracto espárrago – sacarosa.....	65
Figura 14. Gráfica de contorno de actividad inulinasa de extracto espárrago – sacarosa.	65
Figura 15. Perfil de deseabilidad para maximizar el valor del grado de actividad enzimática de Extracto de Espárrago.....	67
Figura 16. Gráfica de Pareto para la actividad enzimática inulinasa - extracto de alcachofa sobre inulina.	71
Figura 17. Superficie de Respuesta de actividad inulinasa de extracto alcachofa – inulina.	72
Figura 18. Gráfica de contorno de actividad inulinasa de extracto de alcachofa – inulina.	72
Figura 19. Gráfica de Pareto para la actividad enzimática inulinasa - extracto de alcachofa sobre sacarosa.....	75
Figura 20. Superficie de respuesta de actividad inulinasa de extracto alcachofa – sacarosa.	76
Figura 21. Gráfica de contorno de actividad inulinasa de extracto alcachofa – sacarosa.	76
Figura 22. Perfil de deseabilidad para maximizar el valor del grado de actividad enzimática de extracto de Alcachofa	78
Figura 23. Proceso de obtención del extracto de alcachofa.....	88
Figura 24. Proceso de obtención del extracto de espárrago.....	88
Figura 25. Diagrama de Flujo de la Determinación de Humedad.	90

	Pág.
Figura 26. Diagrama de flujo para determinación de grasa por método Soxhlet.	91
Figura 27. Diagrama de flujo para determinación de fibra cruda por método Weende.	92
Figura 28. Diagrama de flujo para determinación de Cenizas.	94
Figura 29. Preparación de Soluciones Estándar y Mezclas de Soluciones Estándar.....	96
Figura 30. Curva de calibrado KIT GOD POD a 505nm.	97
Figura 31. Curva de calibrado DNS	98
Figura 32. Preparación del medio de fermentación	99
Figura 33. Preparación del medio de fermentación	99
Figura 34. Medio de fermentación en shaker	99
Figura 35 . Medio de fermentación luego de 30 horas.	100
Figura 36. Gráfica de Lineweaver-Burk obtenida para la producción de enzima inulinasa.....	102
Figura 37. Gráfica de Lineweaver-Burk obtenida para la producción de enzima inulinasa.....	104
Figura 38. Gráfica de Lineweaver-Burk obtenida para la producción de enzima inulinasa.....	106
Figura 39. Gráfica de Lineweaver-Burk obtenida para la producción de enzima inulinasa.....	108

RESUMEN

La búsqueda de alternativas de edulcorantes naturales motiva a estudiar la producción de la enzima inulinasa empleando subproductos agroindustriales vegetales tales como la alcachofa y el espárrago para la producción de fructosa prácticamente pura.

El objetivo del presente trabajo de investigación fue el estudio de la comparación de producción de la enzima inulinasa por fermentación *kluveromyces marxianus* NRRL Y-7571 sobre dos extractos acuosos de subproductos vegetales: la alcachofa y el espárrago.

La experiencia se realizó, de acuerdo con el Diseño Compuesto Central Rotacional (DCCR) y por análisis de Metodología Superficie de Respuesta (MSR) para determinar los valores óptimos de agitación y concentración de extracto y como respuesta la actividad inulinasa y la actividad específica empleando para todas las corridas las siguientes condiciones de fermentación: temperatura 30 °C y un tiempo de cultivo de 30 horas en un agitador orbital. La matriz experimental para cada extracto vegetal consistió de once corridas para cinco niveles de valores de las variables, concentración de extracto en un rango de 13 a 56 % v/v y velocidad de agitación de 139 a 210 rpm.

Por fermentación sobre el extracto de espárrago se obtuvieron los valores óptimos de concentración 56% y una velocidad de agitación de 163 rpm correspondiendo a los valores de actividad enzimática sobre inulina de 12,344 UI/mL. y sobre sacarosa de 124,058 UI/mL y una actividad específica de 34,577 UI/mg sobre inulina y 347,501 UI/mg sobre sacarosa.

Correspondientemente, se obtuvieron los valores óptimos para el extracto de brácteas de alcachofa, a una concentración 56% y una velocidad de agitación de 177 rpm correspondiendo a los valores de actividad enzimática sobre inulina de 7,406 UI/mL y sacarosa de 109,48 UI/mL y una actividad específica de 18,377 UI/mg sobre inulina y 271,66 UI/mg sobre sacarosa.

Se concluyó que el extracto de espárrago a las condiciones óptimas de fermentación originó los mejores valores de actividad inulinasa e invertasa.

PALABRAS CLAVES:

Kluveromyces marxianus, optimización, condiciones de fermentación, extractos vegetales.

ABSTRACT

The search for alternatives to natural sweeteners motivates us to study the production of the inulinase enzyme using vegetable agro-industrial by-products such as artichoke and asparagus for the production of practically pure fructose.

The objective of this research work was to study the comparison of the production of the inulinase enzyme by fermentation *kluveromyces marxianus* NRRL Y-7571 on two aqueous extracts of vegetable by-products: artichoke and asparagus.

The experience was carried out, according to the Rotational Central Composite Design (DCCR) and by analysis of Response Surface Methodology (MSR) to determine the optimal values of agitation and extract concentration and as a response the inulinase activity and the yield using for all the runs under the following fermentation conditions: temperature 30 °C and a culture time of 30 hours in an orbital shaker. The experimental matrix for each plant extract consisted of eleven runs for five levels of variable values, extract concentration in a range of 13 to 56% v/v, and agitation speed of 139 to 210 rpm.

By fermentation on the asparagus extract, the optimum concentration values 56% and a stirring speed of 163 rpm corresponding to the values of enzymatic activity on inulin of 12,344 IU/mL and on sucrose of 124,058 IU/mL and a specific activity of 34,577 IU/mg on inulin and 347,501 IU/mg on sucrose.

Correspondingly, the optimal values were obtained for the artichoke bract extract, at a concentration of 56% and a stirring speed of 177 rpm, corresponding to the values of enzymatic activity on inulin of 7,406 IU/mL and sucrose of 109.48 IU/mL and a specific activity of 18.377 IU/mg on inulin and 271.66 IU/mg on sucrose.

It was concluded that the asparagus extract at optimal fermentation conditions originated the best values of inulinase and invertase activity.

KEYWORDS:

Kluveromyces marxianus, optimization, fermentation conditions, plant extracts.

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad existe gran demanda por el uso de edulcorantes naturales para el consumo humano lo cual motiva a investigarlos y obtenerlos, como es el caso de la fructosa. Gran parte de su relevancia se refleja en su gran gama de aplicaciones posibles en la industria, como consecuencia se han buscado fuentes y métodos de obtención de la fructosa, con mejores rendimientos y empleando productos de origen natural, siendo una de ellas la obtención por hidrólisis enzimática de la inulina. Grupos de interés, como aquellos que padecen enfermedades crónicas como la diabetes, se verían beneficiados al contar con productos más saludables y poder contar con mayores alternativas en la rutina diaria de nutrición.

Por otro lado, diariamente se da la generación de grandes cantidades de desechos de materias primas agroindustriales generando problemas de disposición y de contaminación ambiental produciendo efectos dañinos a la población. Estos residuos son muchas veces son las brácteas de las alcachofas y las raíces de los espárragos.

La presencia de inulina en la alcachofa (*Cynara scolymus*) y en el espárrago (*Asparagus officinalis*) resultaría valioso como sustrato para el crecimiento de microorganismos que empleen el polisacárido para la producción de inulinasa, resultando de esta manera producto de interés para investigadores. Para desarrollar la Investigación se plantea como propuesta experimental de metodología superficie respuesta, la cual nos permite optimizar resultados, para obtenerlos de mayor exactitud empleando dos variables independientes como la concentración de extracto (% v/v) y la agitación (rpm), asimismo dos variables respuesta que es la actividad enzimática (U/mL).

Por lo expuesto anteriormente este trabajo pretende optimizar las condiciones de fermentación para un medio favorecido con sustratos como el extracto de brácteas de alcachofa y en el otro con extracto de raíces del espárrago, hallando cual de ambas logra tener una mayor actividad enzimática mediante la realización de un estudio comparativo. Por lo tanto, es importante considerar la siguiente incógnita: ¿Cuál es el efecto de los tipos de extractos y parámetros en la fermentación de *kluveromyces marxianus* para la producción de la enzima inulinasa?

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Materias Primas

2.1.1. Alcachofa

2.1.1.1. Generalidades de la Alcachofa

(INFOAGRO, 2010), detalla la alcachofa la denominación de *Cynara colymus*, en el grupo de familia Compositae (Compuestas), en donde incluye la lechuga, el girasol, la dalia, la manzanilla y entre otras especies alimenticias, tanto medicinal como ornamental.

Ubicada al sur de Europa y norte de África y; se considera un vegetal que crece dos o tres veces al año, con tallos erectos, robustos, acanalados longitudinalmente y ramificados que alcanzan una altura de más de un metro.

Parte alimenticia de la planta es la inflorescencia, constituida por un receptáculo carnoso introducido al final del tallo en el que se forman las flores y se recogen en inflorescencias terminales; este grupo está cubierto por brácteas cuyas bases también son carnosas.

El fruto es un aquenio con pappus, alargado y de color gris, que se considera la semilla de la planta, con un peso entre 600 y 610 g. Y la capacidad de germinar entre los 6 a 12 años. (INFOAGRO, 2010).

Según el Ministerio de Agricultura del Perú, las alcachofas de mayor cultivo son las siguientes (Estrella & Criollo, 2013): Imperial star, Green globe Emerald, Caribou y Camery

Figura 1. Alcachofa en el Perú



2.1.1.2. Variedades de Alcachofa más comunes en el Perú

La alcachofa podría ser caracterizada por presentar espinas o no en su estructura. En el Perú resalta la Alcachofa Criolla que presenta espinas, se dice que esta planta

puede ser oriunda de Cerdeña una Isla que se ubica en Italia. Sus principales caracteres son: de textura correosa, un fuerte sabor al paladar, y coloración morada. Su consumo es de un vegetal fresco de temporada (Martínez, 2016)

La Alcachofa que no presenta espinas, posee en su estructura brácteas exteriores sutilmente curvadas y las puntas achatadas, la parte central del corazón lleva consigo un sabor delicado, de coloración blanquecina y textura desfibrada.

Las alcachofas sin espinas son de gran demanda en el Mercado Internacional como Estados Unidos y el continente Europeo, en la parte Nacional los departamentos que demandan en mayor potencia el cultivo de la Alcachofa es Junín, Ica, Lima y La Libertad (Martínez, 2016).

La Green Globe viene hacer una de las variedades con mayor apogeo en el Perú, así también la Blanca de Tude Imperial Star. La Green Globe es una alcachofa de mayor tamaño, con una forma de globo, coloración verdosa y no presenta espinas y se caracteriza por ser rústica, tiene un gran índice de reproducción y es de buen sabor para el consumidor, cuenta con un alto grado de reproducción y es de agradable sabor al paladar.

Además de las mencionadas, existen otras variedades como Verde de Provenza, Violeta de Toscana, Lorca, A-106, A-107, Francesa, Americana, entre otras (MINAG, 2008). INIA (2016) menciona que desde el año 2015, la alcachofa de la variedad Lorca, es cultivada en el valle de Chancay (Huaral) como parte del plan de capacitación dirigido a los pequeños productores de la zona. Esta variedad se caracteriza por no tener espinas y poseer innumerables propiedades alimenticias, por ello el INIA, a través de su Estación Experimental Agraria Donoso, sembró aproximadamente 50 hectáreas.

2.1.1.3. Composición de la Alcachofa

Bajas en nutrición, bajas en calorías y una buena fuente de fibra, las alcachofas se consideran una verdura blanda.

La alcachofa es una hortaliza con una amplia gama de propiedades medicinales y se recomienda para el consumo final porque contiene valiosos valores nutricionales, ya que posee reconocidas propiedades coléricas, protectoras del hígado y diuréticas, por lo que se considera saludable para el cuerpo humano.

Reduce el colesterol, es diurético y evita el aumento repentino de los niveles de glucosa en el cuerpo (por lo que es bueno para los diabéticos). (Pimentel, 2015).

La tabla 1 indica la composición para 100 g de alcachofa para el consumo humano.

Tabla 1. *Composición de la alcachofa en 100 g de materia seca.*

Componente	Cantidad		
	INS del Perú, 2009	Valero, T. & et al., 2018	Centro Nac. De Alimentación y Nutrición, 2009
Energía (kcal)	19	40	22
Agua (g)	92.9	88.1	82.5
Proteína (g)	2.8	2.3	2.4
Grasa total (g)	0.2	0.1	0.1
Carbohidratos (g)	2.9	7.5	2.6
Fibra	6.8	2	10.8

Los ácidos con mayor relevancia dentro de la composición química de la alcachofa son cafeíco, clorogénico, cinarina (diéster de los ácidos cafeíco y químico), flavonoides y cinaropicrina. Contienen también ácidos orgánicos, sales potásicas y magnésicas, mucílagos, aceite esencial, fitoesteroles, alcoholes triterpénicos, vitaminas A, B2 y C. (Fonnegra & Jimenez, 2007).

2.1.1.4. La Alcachofa como residuo agroindustrial

El valor de los productos secundarios como los procesados, residuos sólidos y efluentes es de gran significancia para el crecimiento sustancial en áreas de la industria competitiva (Federici, Fava, Kalogerakis, & Mantzavinos, 2009).

La inclinación hacia la reutilización de residuos agroindustriales y de alimentos, se ha desarrollado significativamente en los últimos años, con el fin de encontrar la manera de ampliar beneficios a los residuos agroindustriales de la alcachofa (Mirabella, Castellani, & Sala, 2014).

Cabe destacar, a la alcachofa como residuo (brácteas externas, tallos) generada por su procesamiento, constituye del 80-85% de biomasa las partes de descarte, posee una gran capacidad de fuente de compuestos que impulsan a la salud como lo es un compuesto proveniente de la fructosa que es la inulina (Llorach, Espín, Tomás-Barberán, & Ferreres, 2002).

2.1.2. Espárrago

2.1.2.1.Generalidades del Espárrago

El espárrago es una hortaliza que posee una textura carnosa y firme, además de características organolépticas como tener aroma intenso y el sabor ligero dulce. Existen dos tipos de espárragos: el verde que requiere una mayor exposición a la luz solar para obtener el color verdoso y el espárrago blanco que es cultivado bajo tierra en ausencia de luz solar. Es considerado un alimento gourmet por su alto valor adquisitivo en las familias y dietético. El alto contenido de fibra que posee favorece al sistema digestivo. Actualmente hay diversas presentaciones para comercializar el espárrago, como son en: fresco, procesado o merma (Rivera & Rodríguez, 1999).

2.1.2.2.Tipos de espárrago

El espárrago parte del mismo género, solo que la forma en que este sea cultivada marcará en gran manera su apariencia final. Se puede considerar variedades de espárragos de acuerdo con cómo se opte por las especies, variedades y también la forma de su cultivo (Anónimo, 2016)

a) Espárragos trigueros o silvestres

Este tipo de espárragos crecen de manera espontánea en el monte. Sus principales características es que poseen un color verde, con un sabor ligero amargo (De Las Cuevas, 2016).

La temporada de cosecha es bastante corta, con apenas dos meses durante la estación primaveral. Este tipo se puede ser cultivado inclusive en los huertos urbanísticos en márgenes de este.

Figura 2. *Espárrago triguero o silvestre*



Fuente. De las Cuevas, 2016

Para que eso pueda darse es posible de replantarlos de otros que puedan haber sido obtenidos del campo con cuidados para no empobrecer a la planta de su hábitad natural. Puede ser producido de fácil manera por el método de mata.

Este tipo de espárrago no requiere ser enterrado mucho y se suele recolectar las puntas de sus brotes tempranos.

b) Espárrago cultivado grueso y blanco

Este otro tipo de espárrago es el que comúnmente podemos encontrarlos envasado. Para que pueda cultivarse se hacen surcos y luego son puestos bajo tierra por el levantado exagerado de los caballones, así pueda preservarse los tallos de la luz y así pueda conservar su color blanquecino (INFOAGRO, 2010).

En ciertos casos dependiendo de la variedad, se verdea la punta o logra tomar ciertas partes moradas. La producción de este tipo de espárrago es exclusiva dada durante la primavera y su piel presenta característica de ser tersa y brillante.

Cuando se desea recolectar los espárragos es necesario tener cuidado e ir observando cuando quiere emerger los brotes y se va descubriéndolos, apartando la tierra de alrededor y se cortan.

Figura 3. *Espárrago blanco*



Nota. INFOAGRO, 2010

c) Espárragos de jardín o pericos

Este tipo de espárragos son los más gruesos incluso más que los espárragos trigueros y presentan color verde, aunque a veces va adquiriendo tonalidad ligera violeta porque son cultivas sin protección del sol.

Son plantados por caballones, pero no debe ser apocado en exceso, después los tallos van recolectándose como vayan brotando con cuidado evitando que sean muy largos porque se endurecen fácilmente.

La producción de estos espárragos es exclusiva de la estación primaveral.

Figura 4. *Espárrago perico*



Fuente. INFOAGRO, 2010

Para todos los tipos de espárragos es necesario que una vez finalizada su producción, la planta se deje crecer libremente y así pueda adquirir fuerza y lograr que en la próxima cosecha sea prolifera en brotes.

2.1.2.3. Composición del espárrago

Es un alimento bajo en energía y alto en agua. Contiene inulina, un carbohidrato de almacenamiento que se encuentra en muchos vegetales y fructooligosacáridos, un compuesto derivado de la inulina. En cuanto a las vitaminas, los espárragos son fuente de vitamina C (aunque parte se pierde durante la cocción) y vitamina E. Los espárragos verdes son más ricos en minerales que los espárragos blancos, que pueden perder más vitaminas cuando se enlatan. Entre sus componentes, el espárrago verde contiene betacaroteno (provitamina A) y luteína (carotenoides sin actividad de provitamina A), compuestos que tienen efectos antioxidantes. Los espárragos contienen lignanos, un tipo de fitoestrógeno (Fundación Española de la Nutrición, s.f.).

Tabla 2. Composición del espárrago por 100g.

Componente	Cantidad		
	FUNIBER, 2017	Valero, T. & et al., 2018	Herbazest, 2023
Energía	25	18	22
Proteína	2.9	2.7	2.4
Grasa Total (g)	0.6	Trazas	0.22
Colesterol (mg)	0	0	-
Glúcidos	2	1.1	4.11
Fibra (g)	1.7	1.5	2
Calcio (mg)	27.7	22	23
Hierro (mg)	1.3	1.1	0.91

2.2. Inulina

La inulina está constituida por cadenas moleculares de fructosa, con una fórmula química $C_{6n}H_{10n+2}O_{5n+1}$, pertenece a la familia de los Glúcidos Complejos mejor conocidos como polisacáridos. Por ende, es un polímero formado por moléculas de fructosa o fructosano, que se deriva a partir de la síntesis de la sacarosa (Cherbut, 2002).

La inulina está conformada por la unión de moléculas de fructosa, con cadenas lineales de enlaces fructosil-fructosa β (2-1); en los extremos de las cadenas, las unidades de glucosa están presentes a través de enlaces tipo sacarosa, las unidades de glucosa iniciales podrían estar presentes, mas no necesariamente requeridas. (Lara, Lara, Julián, Pérez, & Benites, 2017).

La unidad manométrica de la inulina se le conoce como grado de polimerización que viene hacer una propiedad relevante que predomina en las funciones de la mayor cantidad de derivados de la inulina. Cuando hablamos de vegetales quien cuenta con el más alto grado de polimerización es la Alcachofa Globo se encuentra por encima de los 200 grados (Lara, Lara, Julián, Pérez, & Benites, 2017).

Los fructooligosacáridos son derivados de la inulina obtenidos por hidrólisis enzimática de la inulina. Esta reacción produce jarabes de fructosa y oligofructanos con un porcentaje del 75%, y de glucosa de 5-6%.

La Fructosa es uno de los edulcorantes con mayor demanda en la industria alimentaria, dado que hoy en día la población busca productos bajos en azúcares y especiales para personas que padecen de enfermedades como la diabetes, la fructosa cuenta con bajo nivel de calorías, y tiene un poder endulzante 1.8 veces más que la sacarosa (Flores, Contreras, Morlett-Chávez, & Aguilar, 2015).

Cerca de 36 000 tipos de vegetales cuentan con un porcentaje de inulina en su composición. Las más específicas son del grupo Liliaceae donde se encuentra el ajo, cebolla, esparrago, ajo porro entre otras y del Grupo Compositae donde se encuentra la Achicoria, pataca y yacón. Los vegetales que crecen bajo tierra como el esparrago almacenan mayor cantidad de inulina (Lara, Lara, Julián, Pérez, & Benites, 2017).

2.2.1. Principales materias primas con contenido de inulina

La inulina se encuentra contenida en más de 36 000 plantas de diferentes géneros, está presente en la cebolla, en el ajo, en el plátano y en la raíz de achicoria principalmente. En la Tabla 3 se presenta el contenido de inulina en diferentes vegetales.

Muchos de los alimentos contenidos en la tabla en mención se consumen directamente (cebolla, ajo, diente de león), aunque en baja cantidad; otros sirven para extraer la

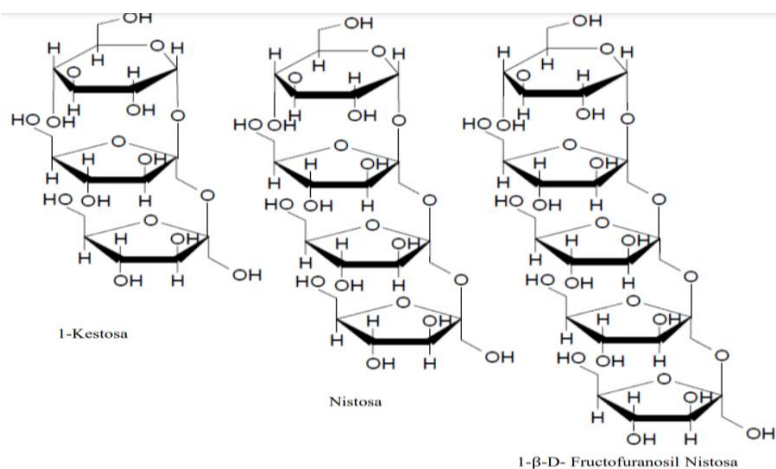
inulina e incorporarla como ingrediente en productos alimenticios. Debido al alto contenido de la misma (>10 %), la raíz de achicoria representa la fuente más importante usada en la producción industrial de inulina.

Tabla 3. Materias primas fuente de inulina

Fuente de inulina	Parte de la planta	Contenido de inulina (g/100g)	
		Madrigal & Sangronis, 2007	Quitral, 2018
Yacon	Raíz	27	35
Ajo	Bulbo	29	14 - 23
Cebada	Grano		18 - 20
Achicoria	Raíz	79	11 - 20
Topinambur	Tubérculo		12 - 19
Espárrago	Raíz	4	15
Agave	Tallo		12 - 15
Achicoria amarga o diente de león	Raíz	79	12 - 15
Dalia	Tubérculo	59	10 - 12
Gingseng Brasileiro	Raíz	48	11.45
Cebolla	Bulbo		5 - 9

Químicamente, los FOS están formados por oligómeros de fructosa que se componen de 1-cetosa, nistosa y fructofuranosil nistosa en los que las unidades de fructosilo están unidas en la posición β (2-1) de la sacarosa, lo que los distingue de otros oligómeros (YUN, 1996). Este tipo de unión confiere al FOS resistencia a la digestión o hidrólisis digestiva.

Figura 5
Estructura química de los principales FOS.



Fuente. Quitral, 2018.

La síntesis de fructooligosacáridos en las plantas parte de la transferencia de una unidad de fructosa entre dos moléculas de sacarosa, por lo que algunos FOS tienen al término de la cadena, una molécula de glucosa (Chacón, 2006).

Grado de polimerización (GP), determinado por la cantidad de unidades de monosacárido, se utiliza para definir y clasificar las moléculas de FOS e inulina, teniendo FOS GP < 10 y GP de inulina de 2 a 60. (Chacón, 2006).

En la Tabla 4, se presenta una comparación entre los tres fructanos.

Tabla 4. *Tabla comparativa de fructanos*

Origen	Extracción a partir de vegetal (Achicoria)	Oligofruktosa Hidrólisis enzimática de la inulina	FOS Transfructosilación
Rango GP	2 - 60	2 - 9	2 - 4
GP prom.	10 - 12	4- 5	3 - 7
Estructura química	Lineal (1-2% de ramificación)	Lineal	Lineal

Fuente. Biedrzycka y Bielecka, 2004

2.3.Fructooligosacaridos (FOS)

2.3.1. Definición

FOS es un carbohidrato no digerible que representa uno de los principales oligosacáridos bifidogénicos, es el nombre común de los oligómeros de fructosa, compuestos químicamente principalmente de cadenas de unidades de fructosa con glucosa terminal unidad molecular unida por puentes glucosídicos β -(2-1) (ChacónVillalobos, 2006; Monsan & Ouarne', 2009; Sabater-Molina et al., 2009). También se conocen como fructanos, oligofruktanos, glucofructanos, inulinas u oligosacáridos, donde su consiste en enlaces repetidos de disacáridos como la sacarosa, inulobiosis y levanobiosis (Chaco'n-Villalobos, 2006).

FOS es un fitoquímico de almacenamiento que se encuentra en muchas plantas y vegetales como carbohidrato de almacenamiento, como la alcachofa de Jerusalén, la cebolla, los espárragos, la achicoria, el puerro, el ajo, el trigo, el yacón, los tomates, el plátano y la miel (Monsan & Ouarne', 2009; Mussatto et al., 2009a).

Según su estructura diferencias, hay cuatro grupos importantes de FOS: inulina, leván, leván mixto y neo-FOS (Monsan & Ouarne', 2009).

Los FOS son prebióticos efectivos ya que favorecen el equilibrio del microbiota intestinal y esto trae como consecuencia otros beneficios en el metabolismo humano como la disminución de la concentración de triglicéridos (PASSOS; PARK, 2003; DELZENNE et al., 2002), reducción del riesgo de enfermedades cardiovasculares y cáncer de colon además de estimular el sistema inmunológico.

Los FOS se encuentran entre los prebióticos más estudiados y mejor establecidos en la actualidad y, debido a esto, se están utilizando cada vez más en nuevos productos alimenticios, como bebidas, yogures, galletas (KOLIDA; TUOHY; GIBSON, 2002; GIBSON et al., 2004), alimentos dietéticos, productos de panadería, barras de cereales, confitería y salsas.

2.4.Fermentación

2.4.1. Concepto

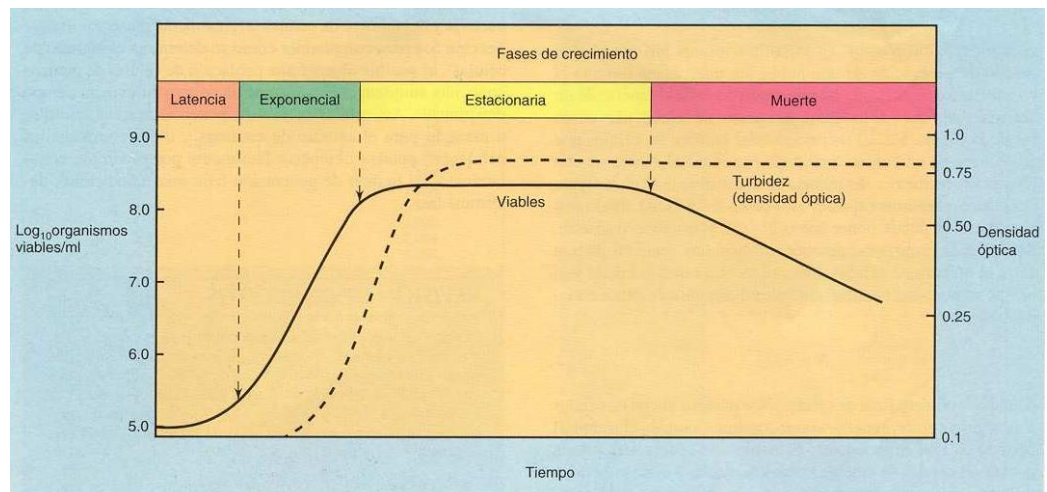
La fermentación es la transformación biológica de la materia Orgánica en sustancias químicas que se les conoce como metabolitos, por acción de células ya sea de animales o microorganismos, con restricciones ambientales y con un adecuado equipo ya sea un fermentador o biorreactor. Las sustancias químicas reaccionan con acción de las células vivas con respecto al tiempo de reacción (Huaraz & Reyes, 2014).

2.4.1.1.Cultivo por Lotes

Es un modo de cultivo por lote, donde ocurre una fermentación microbiana, en el que un microorganismo y sus fuentes de nutrientes se introducen al biorreactor desde el comienzo, y seguido a ello no hay ni entrada ni salida tanto de nutrientes como del producto. Solo el aire que ingresa y los gases que se liberan a la salida del proceso de fermentación. El biorreactor en el que se lleva a cabo la fermentación podría ser un matraz Erlenmeyer o un tanque con agitadores, dispositivos equipados con automatización que controlan sus parámetros. (Huaraz & Reyes, 2014).

Un cultivo pasa por las diversas fases según figura 6:

Figura 6. Fases de un cultivo por lote



Fuente: Massaguer 2009.

2.4.1.2. Producción de enzimas microbianas

2.4.1.2.1. Tiempo de producción Enzimática

En una producción enzimática la etapa de desarrollo va a la par con la producción. Cuando se alcanza un máximo punto de producción frecuentemente el tiempo de crecimiento se encuentra en un punto máximo; cabe mencionar que por parte de las sustancias inductoras no debe haber deficiencia de éstas, dado que son de gran relevancia para la síntesis enzimática, sin embargo, no lo son para su desarrollo.

Al llegar el microorganismo a la fase estacionaria, esta puede aumentar, disminuir o mantenerse en ese estado; puede presentar una disminución debido a que presentan proteasas en el medio que han sido producidas y segregadas como enzimas extracelulares o bien desencadenadas a causa de la autólisis de las células.

2.4.1.2.2. Efecto de agitación

El grado de agitación, cambia referente a un microorganismo y su enzima.

En el medio de Cultivo la agitación es favorable cuando se diluyen el oxígeno con la fuente de nutrientes; cabe mencionar que podemos encontrar enzimas capaces de producir una desnaturalización en la interfase del gas con el agua en donde se produce un incremento de agitación vigorosa o gasificación. Esta desnaturalización puede dar lugar a que se requiera una aireación óptima la lograr formar la enzima (Huaraz & Reyes, 2014).

2.5.Enzimas

2.5.1. Definición

Una enzima es una proteína globular que actúa de manera biológica como un catalizador, en donde se permite que las reacciones metabólicas se desarrollen bajo condiciones de compatibilidad con la vida y a una mayor velocidad (Ramirez & Ayala, 2014).

2.5.2. Actividad Enzimática

La unidad de actividad enzimática más ampliamente usada se define como la cantidad que causa la transformación de 1.0 umol de sustrato por minuto, en condiciones óptimas. La actividad específica es el número de unidades de enzima por miligramo de proteína (Huaraz & Reyes, 2014).

2.5.3. Cinética Enzimática

En la catálisis enzimática por reacciones químicas, se ve evaluada y analizada la velocidad de la enzima, este análisis nos muestra el poder catalítico de la enzima a tratar, su metabolización, el control de actividad en célula, y como detener su actividad mediante alguna fármacos prohibidos o venenos.

2.5.4. Inulinasa

La Inulinasa es una enzima catalizadora que aumenta el ritmo de aceleración de la inulina, lleva como nomenclatura química 2,1-β-D-fructano fructanohidrolasas, produce glucosa, fructosa, derivados de fructosa, inulooligosacáridos (Diestro, Margarito, Vega, & Castillo, 2015).

En el mercado industrial resalta por la producción de jarabes de fructosa, obtención de etanol, aceite proteína unicelular; la producción de ácido cítrico, alcoholes, ácido láctico. (Castillo & Contreras, 2012).

Las inulinasas se utilizan ampliamente para la producción de jarabe de fructosa ultra alta (Lima et al. 2011), fructosa (Ricca et al. 2009), etanol (Ge y Zhang 2005), ácido láctico (Petrova et al. 2015), ácido cítrico (Yan Liu et al. 2010) y aceite unicelular (Zhao et al. 2010).

2.5.5. Microorganismo productor de la Enzima Inulinasa: *Kluyveromyces Marxianus*

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

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Método de estudio

La presente investigación es de tipo aplicativo.

3.2. Localización del experimento

El presente trabajo de investigación fue realizado en los siguientes laboratorios de la Universidad Nacional del Santa:

- Laboratorio de química orgánica
- Instituto de investigación agroindustrial

3.3. Material de estudio

3.3.1. Biológico

Cepa en agar de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 fue donada por United States Department of Agriculture - Agricultural Research Service.

3.3.2. Materia Prima

Para este trabajo de investigación se utilizó brácteas de alcachofa (*Cynara Scolymus*) y espárrago (*Asparagus officinalis*) provenientes de los cultivos de las ciudades de Yaután y Virú en la Región Ancash y la Libertad.

Figura 7. *Materias primas*



3.4. Materiales e instrumentos

3.4.1. Reactivos

- Acido 3-5 dinitrosalicílico (DNS). Fabricante: Sigma Chemical. Peso neto: 25 gramos (Alemania).
- Ácido cítrico monohidratado ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$). Fabricante: Sigma Chemical. Peso neto: 500 gramos (Alemania).
- Agar Agar. Fabricante: Sigma Chemical. Peso neto: 50 gramos.
- Agua destilada.

- Azul de coomassie G-250 ($C_{47}H_{49}N_3NaO_7S_2$). Fabricante: Merck. Peso neto: 25 gramos (Alemania).
- Dihidrogenofosfato de potasio (KH_2PO_4). Fabricante: Merck. Peso neto: 250 gramos (Alemania).
- Extracto de levadura granulado, fabricante: Merck, peso neto: 500 gramos (Alemania).
- Fosfato de sodio dibasico ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$), fabricante: Merck, peso neto: 250 gramos (Alemania).
- Glucosa ($C_6H_{12}O_6$), fabricante: Loba Chemie, peso neto: 500 gramos (India).
- Inulina dalia, fabricante: Sigma Chemical, peso neto: 5 gramos (Alemania).
- Peptona bacteriologica Z, fabricante: Biocen, peso neto 500 gramos (Cuba).
- Sacarosa ($C_{12}H_{22}O_{11}$), fabricante: Loba Chemie, peso neto: 1 Kgr (India).
- Sulfato de amonio granulado ($(NH_4)_2SO_4$), fabricante: Mallinckrodt, peso neto: 1 kgr (Francia).
- Sulfato de magnesio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), fabricante: Sigma Chemical, peso neto: 500 gramos (Alemania).

3.4.2. Materiales

- Algodón y gasas
- Cajas de fósforos
- Campanas desecadoras.
- Crisol
- Espátulas
- Fiola marca Pirex de 10, 50, 100 mL.
- Gradilla de tubos
- Guantes
- Matraces marca Pirex de 50, 125, 250, 500 y 1000 mL.
- Mechero
- Papel aluminio

- Pera succionadora
- Pipetas de 1, 2, 5, 10 mL.
- Pipeteros
- Placas Petri.
- Probetas marca Pirex de 50, 100 mL.
- Tapaboca
- Tubos de ensayo
- Tubos tapa rosca
- Vasos de 50, 100, 250 y 500 mL.

3.4.3. Equipos e instrumentos

- Agitador de tubos Maxi Mix. Marca: Thermolyne. Modelo: N° M-37615. Perú.
- Agitador orbital Shaker. Marca: Lab Line. Modelo 4628-1. Perú.
- Balanza analítica. Marca: Precisa Gravimetrics AG. Modelo: LX 320. Suiza.
- Centrifuga. Marca: Sartorius AG. Model: Sigma 2 -16 pk. Suiza
- Destilador, marca VELT SCIENTIFICA, modelo UDK126A, Alemania.
- Equipo de Baño maria. Marca: Biotron. Modelo: Electronic Thermostat Btr-65. Alemania.
- Espectrofotómetro UV-VIS-NIR. Marca: Unico. Modelo: 2800E, U.S.A.
- Estufa. Marca P - Selecta. Modelo: 209. España.
- Incubadora. Marca: P – Selecta. Modelo: 206. España.
- Micropipetas de 200 – 1000 µl. Marca: Brand. Modelo: Tranferpette®. España.
- Molino Universal M-20. Marca: IKA Molinos. Potencia:450W. Velocidad Maxima:20000 rpm, Alemania. Perú.
- pH-metro. Marca: Record. Capacidad: 7.5 litros. Perú.

- Refractómetro de marca RUDOLF RESEARCH ANALYTICAL, U.S.A.
- Refrigerador. Marca: Phillips. Volumen 12 pies³, Perú.

3.4.4. Otros

- Olla a presión. Marca: Record. Capacidad: 7.5 litros.
- Licuadora. Marca: Oster clásica. Modelo: 450 – 2.
- Cocina a gas. Marca: Kero. Modelo 102.

3.5. Metodología

3.5.1. Obtención y procesamiento de las materias primas

3.5.1.1. Preparación del extracto de Alcachofa

✓ Recepción de Materia Prima

La Alcachofa (*Cynara Scolymus*) se obtuvo del mercado mayorista La Perla procedente de la sierra de Ancash.

✓ Proceso de Selección

El proceso consistió en seleccionar las hojas externas o brácteas de la Alcachofa, éstas deben presentar buena calidad; asimismo se separó las que se encontraron con daños físicos, mecánicos y microbiológicos en su estructura.

✓ Proceso de Lavado

Las hojas externas o brácteas luego de su selección, se lavó con agua potable para así eliminar todo tipo de impurezas y restos de tierra que quedaron al momento de la cosecha.

✓ Desinfección

En la desinfección se trata de eliminar todo tipo de bacterias, se realizó midiendo 40 ml. de cloro en 10 L de agua y se forma una solución clorada, se somete las brácteas por un lapso de 10 min en la solución.

✓ Escaldado

Las brácteas o hojas externas de la alcachofa, se sometió a un proceso de escaldado a 80°C por un lapso de 30 segundos para facilitar el proceso de extracción y fijar su color.

✓ Extractor

Para este proceso fue necesario trocear las brácteas de tamaño pequeño y luego pasarlo por una extractora.

✓ Filtrado

La solución acuosa se filtra empleando un paño de seda (muselina), en donde se separa de manera homogénea el sólido (Torta) del fluido.

✓ **Centrifugado**

Para obtener un extracto homogéneo y facilitar su uso se procedió a centrifugar logrando que no se formen geles.

✓ **Envasado**

El líquido centrifugado se procedió a envasar en envases de igual capacidad.

✓ **Esterilizado**

Luego se procedió a la esterilización, para ello primero se debió ajustar a pH 4, luego se esterilizó a una temperatura de 121°C por 20 minutos, y finalmente se dejó enfriar.

✓ **Almacenamiento**

La muestra de extracto se almacenó bajo condiciones de temperatura de 5°C.

3.5.1.2. Preparación del extracto de Espárrago

✓ **Recepción de Materia Prima**

El Espárrago Blanco (*Asparagus officinalis*) se obtuvo directamente de la ciudad de Virú.

✓ **Proceso de Selección**

Se seleccionó los tubérculos radiculares que presenten una mejor calidad para el proceso, la parte que se empleó del espárrago será su raíz, por ello fue necesario que al momento de la cosecha el espárrago cuente con su raíz.

✓ **Proceso de Lavado**

Estos tubérculos radiculares, fueron lavados con agua Caliente para así eliminar todo tipo de impurezas y restos de tierra que quedaron al momento de la cosecha, del cual garantizó un proceso inocuo.

✓ **Desinfección**

En la desinfección se trató de eliminar todo tipo de bacterias, se realizó midiendo 0.04 L de cloro en 10 L de agua en donde forma una solución clorada, se sometió el espárrago por un lapso de 10 min en la solución.

✓ **Corte**

La Raíz del Espárrago se cortó en trozos pequeños

✓ **Secado**

S secó en estufa a 80°C por un lapso de 20 Horas.

✓ **Molido**

Los trozos se molieron en un mortero, hasta resultar polvo.

✓ **Mezcla**

Se mezcló 26.6 g de polvo de Espárrago en 200 ml de agua destilada caliente.

✓ **Agitación**

La mezcla se agitó por un lapso de 10 minutos.

✓ **Filtrado**

La solución acuosa se filtró con una tela doble de seda (muselina) acodada, aquí se separó de manera homogénea el sólido (Torta) del fluido, se dejó enfriar.

✓ **Esterilizado**

Luego se procedió a la esterilización, para ello primero se debió llevar el extracto hasta un pH 4, luego esterilizar a una temperatura de 121°C por 10 min, y finalmente se dejó enfriar.

✓ **Almacenamiento**

La muestra de extracto será almacenó1 en botellas de vidrio bajo condiciones de refrigeración a 5°C.

3.5.2. Métodos de análisis

3.5.2.1. Análisis químico proximal de las materias primas

Humedad

La humedad se determina por la Norma Técnica ITINTEC 205.037 (1974), con denominación del “Método de desecación por estufa”.

a. Proteína

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

b. Cenizas

El porcentaje de cenizas, es decir, el porcentaje de sólidos y minerales en el producto, se determina siguiendo el procedimiento especificado en la norma técnica IINTEC 205.038 (1974) denominado “Método De Incineración”.

c. Grasa

Método de Soxhelet, AOAC (1989)

d. Fibra cruda

Método AOAC (1950)

f. Carbohidratos totales

Se determina por diferencia:

$$Ct = 100\% - (\text{Humedad} + \text{Proteínas} + \text{Grasas} + \text{Fibra})$$

3.5.2.2. Caracterización fisicoquímica de los extractos de Alcachofa y de Espárrago

- Determinación de pH

Se determina por el método potenciómetro propuesto por AOAC (1995)

- Determinación de acidez

Se determina por titulación potenciométrica usando la metodología AOAC (1995).

- **Determinación de °Brix**
Se determina mediante método refractométrico recomendado por AOAC, 995.
- **Determinación de azúcares reductores**
Los azúcares reductores se determinan mediante DNS (Miller, 1972).
- **Determinación de proteínas**
Se cuantifica por el método de Bradford.
- **Determinación de Glucosa**
Método de Kit God Pod.

3.5.3. Diseño y preparación del medio de cultivo

Para la fermentación se preparó suficiente inóculo inicial en matraces Erlenmeyer de 125 ml conteniendo cada uno 50 ml aproximadamente de medio de activación celular. El medio se inoculó con una azada de células mantenidas en un agar inclinado, previamente activadas, se dejará cultivar en un agitador orbital shaker con una temperatura de 30 °C y agitación de 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 5% (v/v) de inóculo, incubados a 30 °C, pH inicial 4.0 y agitados en shaker a 150 rpm por 30 horas, tomándose muestras de 5ml. Para la preparación de los medios de cultivo se siguió la metodología de Castillo A. (2013) según la tabla 5.

Tabla 5. Composición de medios para la fermentación de *kluuyveromyces marxianus*.

MEDIO	NUTRIENTE	CONCENTRACIÓN (g/L)
Sólido de mantención	Extracto de levadura	3
	Peptona	5
	Glucosa	10
	Agar	20
	Extracto de malta	3
Activación	Sacarosa	10
	Extracto de levadura	3
	Peptona	5
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0.65
	pH=6	
Fermentación	Extracto de alcachofa / espárrago	(20-50)% v/v
	Extracto de levadura	10
	KH ₂ PO ₄	1
	(NH ₄) ₂ SO ₄	5
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0.386
	pH=4	

3.5.3.1.Preparación de medio de activación

Los componentes según la Tabla 5 se añadieron en un matraz Erlenmeyer y se mezclaron con agua destilada para 50ml. Calentando la mezcla hasta ebullición manteniendo agitación constante. Luego se deja hervir por 2 minutos hasta disolver completamente el agar. Por último, se procedió a verter las mezclas en tubos de ensayo con tapa inclinados

2.8.3.1. Obtención de Caldo Crudo Enzimático

Se centrifugó el extracto enzimático obtenido durante la etapa de fermentación a 2800 RPM por 30 minutos a 5°C. El objetivo fue lograr eliminar las partículas presentes en el caldo de fermentación.

3.5.4. Optimización de la concentración de sustrato y agitación del medio de fermentación.

Se optimizó los valores de concentración y agitación sobre el medio de fermentación para determinar la actividad de la inulinasa para los respectivos sustratos (inulina).

3.5.5. Determinación de la actividad enzimática.

Se determinó la actividad enzimática siguiendo la metodología de Castillo A. (2011) a detalle según la Tabla 6.

Tabla 6. *Medición de la actividad enzimática*

Tubo	Volumen Solución Estándar (mL)	Volumen Solución Enzima (mL)	Volumen Solución Tampón(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	0.25

La Actividad Enzimática se realizó a base de una solución estándar de Inulina de 10 g/L, trabajo en un pH de 5 y solución tampón citrato fosfato 0,05 M.

Del cual se tomó una muestra de enzima y se diluyó con una solución tampón citrato Fosfato a 0.05 M pH 5 trabajando a una temperatura de 55°C.

Y se realizó la metodología para medición de actividad siguiendo la tabla 6:

- **I:** Al primer tubo se adicionó 2500 ul de Inulina (10g/L) más 250ul de Enzima.
- **II:** Al segundo tubo se adicionó 2500 ul de Inulina (10g/L) más 250ul de Enzima.
- **Bs (Blanco Sustrato):** se adicionó 2500 ul de Inulina (10g/L) más 250ul de Solución Tampón.
- **BE (Blanco Enzima):** se adicionó 2500 ul de Solución Tampón (10g/L) más 250ul de Enzima.

Debe tenerse en cuenta el control minucioso del tiempo para efectuar el procedimiento de manera correcta.

Para finalizar a cada tubo se lee la absorbancia a 540 nm en el espectrofotómetro, tomando como blanco: agua más enzima.

3.5.5.1. Determinación de Azúcares Reductores por Método DNS

A. Curva de calibrado DNS

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

Tabla 7. *Detalle de técnica para curva de calibrado DNS*

Nº	Solución estándar (ul)	Agua (ul)	Azúcares Reductores (g/L)
1	500	0	2.0
2	400	100	1.6
3	300	200	1.2
4	200	300	0.8
5	100	400	0.4
6	50	450	0.2
7	0	500	0.0

B. Procedimiento para su determinación

Se realizó el procedimiento que consiste primero en llevar a cabo una hidrólisis, con la finalidad de obtener azúcares reductores.

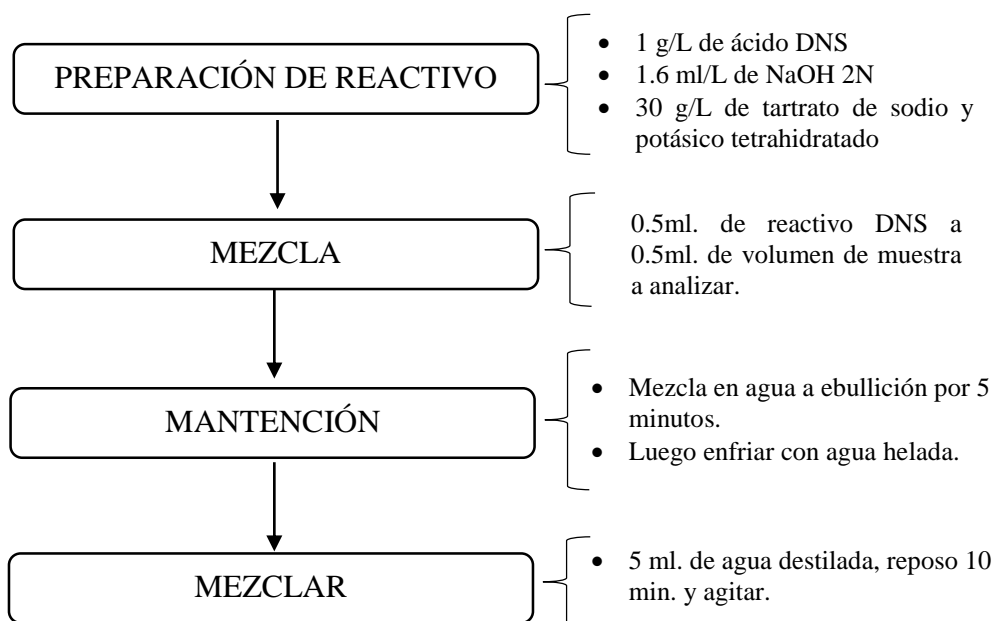
Se precisó realizar los siguientes pasos para el análisis de la muestra:

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

- La concentración se obtuvo interceptando la medida de absorbancia en la curva de calibrado.

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

Figura 8. Determinación de azúcares reductores por el método de DNS



3.5.6. Determinación de Glucosa por Kit God Pop

Para la Determinación de Glucosa presente en la Enzima Inulinasa se realizó una curva de Calibrado por el Método de KIT GOD POD. Para ello se preparó una Solución Estándar de Glucosa de 2g/L.

De la solución estándar se tomó 7 tubos (6 de muestra y un blanco de Agua) adicionando con agua destilada, luego de la dilución se tomó 30 ul de muestra y se añadió 3 mL de Reactivo de Glucosa.

Seguido a ello colocó a Baño María a 37°C durante 1º min, luego se cortó la reacción colocando los experimentos sobre agua helada y se procedió a dar lectura en el Espectrofotómetro a 505 nm.

3.5.7. Análisis Estadístico de Curva de Calibrado DNS

Esta metodología es fundamentada en base a que el 3,5 dinitrosalicílico pasa a actuar como agente oxidante en la presencia del grupo reductor (aldehído) del azúcar, en un medio alcalino (NaOH), y ésta a su vez le da al medio la reacción redox y el tartrato de sodio-potasio impide la disolución del oxígeno en esta 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. (Diestro, Margarito, Vega, & Castillo, 2015).

El resultado de la reacción da un compuesto coloreado (marrón) y la ley de Lambert Beer afirma que la intensidad del éste color será proporcional a la concentración de azúcares presentes.

Se utiliza los siguientes reactivos:

- 1 g/L de Acido DNS
- 1.6 ml/L de NaOH 2N
- 30 g/L de tartrato de Sodio y Potasio tetrahidratado

Para preparar el reactivo, se disolvió el tartrato en aproximadamente 15ml de agua destilada junto al hidróxido de sodio y luego se agregó a los 50ml de agua destilada permanentemente agitado, a continuación, al calentar la mezcla se agregó el DNS lentamente en constante agitación. Luego se le vertió al matraz y aforó a 100 ml con agua destilada, se agitó y se vertió en un recipiente de vidrio cubierto velozmente con papel aluminio, para que el reactivo no reaccione con la luz. (Diestra & Margarito, 2015).

El número de puntos para la curva de calibrado será de seis para que la variabilidad sea mínima y el intervalo lineal sea suficiente. La curva de calibración tendrá un intervalo de confianza del 95 %. Además, se empleará la Herramienta de Análisis Estadístico “SPSS Statistics Standard Edition 22” para el análisis de datos.

3.5.8. Determinación de valores de parámetros cinéticos K_m y V_{max} , en la fermentación de *kluveromyces marxianus*, para producción de la enzima inulinasa.

Se preparan 5 soluciones estándar de Inulina (rango de 2-10 g/L) y Sacarosa (rango de 3-20 g/L) en Tampón Citrato Fosfato 0,05 M a un pH 5 para cada sustrato.

Se toma una cantidad fija de extracto crudo enzimático producido por la fermentación en Extractos de Alcachofa y Extracto de Espárrago, bajo las condiciones de:

- Concentración de extracto: 50% (v/v)
- Agitación: 200 rpm
- Tiempo de fermentación: 30 horas

Se mide la velocidad inicial de reacción para cada ensayo agregando una solución estándar dentro del rango establecido. A una temperatura óptima de 55°.

La velocidad de reacción se determina, mediante el gráfico y ecuación de Michaelis-Menten, y la linealización de Lineweaver-Burk, para así determinar los Parámetros Cinéticos K_m y V_{max} .

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max}} \left(\frac{1}{S} \right) + \frac{1}{V_{maz}}$$

3.6. Diseño experimental

Se utilizó dos Diseños factoriales Centrales Compuestos cada uno con dos variables independientes: Concentración de Extracto (% v/v) y Agitación (rpm); en respuesta a dos variables dependientes: la Actividad Enzimática (UI/mL) y la

actividad específica (g/g). En la Tabla 8 se detallan los valores mínimos y máximos de las variables independientes que se utilizaron en el experimento.

Tabla 8. *Matriz de variables independientes utilizadas en el modelo*

Variables		Rangos				
		Punto Axial (- α)	Punto Factorial -1	Punto Central 0	Punto Factorial +1	Punto Axial (+ α)
		-1.4142	-1	0	+1	+1.4142
X1	Concentración de extracto (% v/v)	14	20	35	50	56
X2	Agitación (rpm)	140	150	175	200	210

$\pm\alpha=1.4142$

Los experimentos fueron llevados a cabo mediante el plan experimental establecido en la Tabla 09 y 10. Realizándose un planeamiento 2^2 , incluidos 4 axiales, 4 puntos factoriales, y 3 puntos centrales para cada extracto, se obtuvo un total de 11 unidades experimentales empleando extracto de alcachofa y 11 unidades experimentales con el extracto de esparrago que fueron llevadas a cabo por duplicado.

Tabla 9. *Diseño experimental según DCCR para las variables concentración de extracto y agitación del medio con extracto de alcachofa*

Corridas	Variables Codificadas		Variables reales		Variables Respuestas	
	X1	X2	X1	X2	Actividad Enzimática (UI/mL)	Actividad específica (g/g)
	Concentración (% v/v)	Agitación (rpm)	Concentración (% v/v)	Agitación (rpm)		
1	-1	-1	20	150
2	-1	1	20	200
3	1	-1	50	150
4	1	1	50	200
5	-1.4142	0	14	175
6	1.4142	0	56	175
7	0	- 1.4142	35	140
8	0	1.4142 1	35	210
9	0	0	35	175
10	0	0	35	175
11	0	0	35	175

Tabla 10. *Diseño experimental según DCCR para las variables concentración de extracto y agitación del medio con extracto de espárrago*

Corridas	Variables Codificadas		Variables reales		Variables Respuestas	
	X1	X2	X1	X2	Actividad Enzimática (UI/mL)	Act. Específica (g/g)
	Concentración (% v/v)	Agitación (rpm)	Concentración (% v/v)	Agitación (rpm)		
1	-1	-1	20	150
2	-1	1	20	200
3	1	-1	50	150
4	1	1	50	200
5	-1.4142	0	14	175
6	1.4142	0	56	175
7	0	-1.4142	35	140
8	0	1.4142	35	210
9	0	0	35	175
10	0	0	35	175
11	0	0	35	175

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Determinación de la composición fisicoquímica de las materias primas

Con el conocimiento de la composición fisicoquímica de los alimentos se puede determinar la composición de la alcachofa y del espárrago.

4.1.1. Caracterización de brácteas de alcachofa

La siguiente Tabla 11 presenta la composición química de la alcachofa en base seca.

Tabla 11. *Composición química de las brácteas de alcachofa en base seca*

Componente	%BS (base seca)
Humedad	83.19±0.13
Proteína	3.51±0.15
Cenizas	0.67±0.08
Grasa	0.43±0.04
Fibra cruda	1.26±0.40
Carbohidratos totales	6.11±1.90

La composición porcentual de la materia prima alcachofa mostró como mayor constituyente a la humedad con un 83.19%, valor similar que se muestra en Bedca,2007; donde presentó 83.33% de contenido de humedad al analizar la composición de esta hortaliza.

Por otro lado, se sabe que el componente más importante para esta investigación es la inulina como nuestra base de los sustratos empleados como fuente de carbono para la producción de la enzima inulinasa.

La inulina según Altavilla & Prats, 2020; forma parte de la fibra dietética, los resultados según la tabla 11, la alcachofa resultó tener un 1.26% de fibra cruda presente en su composición siendo resultados cercanos a lo expuesto por Pimentel,2015; donde mostró cantidades de 1.4% de fibra cruda.

Para el caso del porcentaje de cenizas según Centro Nacional de Alimentación y Nutrición, 2009, en sus tablas de composición muestra que en el caso de la alcachofa es de 1.2% para la parte comestible, este valor no coincide al hallado en este trabajo y esto debido a que la determinación solo se realizó a las brácteas de alcachofa.

Estudios muestran que el proceso de maduración posterior al corte de la cabeza en las alcachofas reduce la cantidad de inulina. Por ello es necesario consumir la alcachofa fresca para poder utilizar la inulina. (Altavilla & Prats,

2020). Entonces con ello el grado de maduración en esta materia prima es directamente proporcional al contenido de inulina.

4.1.2. Caracterización química del espárrago

La siguiente Tabla 12 presenta la composición química del espárrago en base seca.

Tabla 12. *Composición química del espárrago en base seca*

Componente	%BS (base seca)
Humedad	93.69±0.42
Proteína	2.38±0.13
Cenizas	0.77±0.09
Grasa	0.2±0.01
Fibra cruda	1.82±0.01
Carbohidratos totales	1.91±0.06

Los espárragos contienen más del 90% de agua y sus principales carbohidratos son la fructosa y la glucosa con (15-25 mg/g de peso fresco) según afirma Bhowmik, Matsui y Kawada, 2000, además de presentar valores muy semejantes a lo expuesto por Chitrakar et al., 2019; en los bajos contenidos de grasa de apenas 0.2%. Esta información es confirmada con los hallazgos obtenidos en la tabla 12.

Por otro lado, la proteína del espárrago es considerada proteína de alta calidad debido a la abundancia de la mayoría de los aminoácidos esenciales (que comprenden 40–43% de los aminoácidos totales), con ácido glutámico y ácido aspártico como los aminoácidos dominantes, mientras que la metionina, la cistina y la leucina como aminoácidos limitantes (Słupski, Korus, Lisiewska, & Kmiecik, 2010).

Según Funiber, 2017; el 2.9% de proteína valor mayor al obtenido y que pudo haberse visto afectado este y otros nutrientes durante el transporte, almacenamiento de esta materia prima (Carbajal, 2018).

Otro de los componentes analizados es la fibra presentando un 1.82% como resultado de fibra cruda, siendo un gran colaborador del bienestar digestivo al ejercer un efecto estimulante del peristaltismo, que previenen el estreñimiento, y ayudan a reducir el colesterol (González y Pozo, 1999).

El espárrago aporta y contribuye en la calidad nutricional del medio de fermentación para brindar las condiciones adecuadas de crecimiento.

4.1.3. Composición fisicoquímica del extracto de brácteas de alcachofa

En la Tabla 13 se presenta la composición química del extracto de alcachofa en base seca.

Tabla 13. *Composición Fisicoquímica del extracto de brácteas de alcachofa en porcentual en base seca*

Componente	%BS (base seca)
pH	6.04±0.04
Ácidoz	0.128±0.01
°Brix	5.69±0.06
Azúcares Reductores (g/L)	13.18±0.22
Glucosa (g/L)	1.39±0.01
Proteína (mg/L)	0.47±0.06

4.1.1. Composición fisicoquímica del extracto de espárrago

En la Tabla 14 se presenta la composición química del extracto de espárrago en base seca.

Tabla 14. *Composición Fisicoquímica del extracto de espárrago en porcentual en base seca.*

Componente	%BS (base seca)
pH	4.97±0.02
Ácidoz	0.256±0.01
°Brix	9.16±0.04
Azúcares Reductores (g/L)	39.29±0.28
Glucosa (g/L)	0.96±0.01
Proteína (mg/L)	1.06±0.03

Según diversos estudios Apolinário y Col, 2014, durante la extracción la inulina a elevadas temperaturas se puede degradar cuando el pH es inferior a 5. Para evitar esta degradación se emplea tampón fosfato sódico (0,05 M, pH

6,5). Según los resultados obtenidos se logra ver que en ambos extractos el pH no baja de los 5°Brix, lo cual es positivo por lo anteriormente mencionado.

Huaraz & Reyes, 2014; determinaron que el pH en el extracto de alcachofa es de 6.34, valor lejano al encontrado en nuestra investigación, pero que de igual manera es estable para poder usarlo como sustrato en el medio de fermentación.

García, et al; 2006, demostró que: los grados Brix de los bananos tienen una relación significativa en el comportamiento de la actividad enzimática a lo largo del tiempo. Al aumentar los grados Brix se da una disminución en la actividad enzimática. Por ellos es necesario considerar valores de grados brix menores a 10. También se puede emplear un mejor método de separación de la parte líquida en el extracto mediante el uso de un microfiltro y así disminuir la cantidad de solidos disueltos en el extracto.

En la determinación de los azúcares reductores, componente importante que brinda en enriquecimiento para el medio de fermentación, se mostró que el espárrago presenta el triple de cantidad de azúcares en comparación al extracto de brácteas de alcachofa siendo esto favorable para el medio de fermentación.

4.2.Obtención de los extractos

A) Extracto de alcachofa

Se obtuvo el extracto de las brácteas de Alcachofa mediante el uso de una extractora de vegetales, se filtró y se centrifugó con ayuda de una centrifuga refrigerada para disminuir la cantidad de solidos disueltos presentes en la solución, empleando las condiciones de 5°C, 5000 RPM por un tiempo de 20 minutos.

Se dejó enfriar, se envaso en un matraz de vidrio y se guardó en refrigeración. En los tejidos de la unión de las brácteas con el corazón se concentra la mayor parte de componentes responsables del pardeamiento, por eso durante las operaciones de corte de los tejidos provoca la descompartimentacion celular, por lo que se hizo necesario darle los pretratamientos con el fin de minimizar el pardeamiento.

El extracto se utiliza como sustrato para el medio de fermentación ya que es una rica fuente de inulina. Puesto que la inulina es el componente base de un

sustrato empleado como fuente de carbono para la producción microbiana de inulinasa, sea como inulina pura o como extracto de vegetales.

B) Extracto de espárrago

Para el caso del espárrago se trabajó en forma de polvo, realizando el secado en estufa y finalmente se molió. Con ello se procedió a realizar una solución hasta que se logró su punto de solubilidad aplicando temperatura de 80°C a baño maría por un periodo de tiempo, luego se filtró, centrifugo, esterilizo y reservó en envases de vidrio debidamente rotulados.

4.2.1. Rendimientos

Se presenta la siguiente Tabla 15 donde muestra el rendimiento de las materias primas alcachofa y espárrago para la preparación del medio de fermentación.

Tabla 15. *Rendimiento para los extractos*

	Alcachofa	Espárrago
Peso inicial M.P. (g)	349.93	542.72
Peso final extracto (g)	72.81	176.86
Rendimiento (%)	20.81	32.59

Huaraz & Reyes, 2014; determinaron 11.6% de rendimiento para el extracto de brácteas de alcachofa en comparación al hallado se mostró un mayor rendimiento equivalente a 20.81%.

Para el caso del extracto de espárrago se obtuvo un mayor rendimiento debido a que en su composición química presenta mayor porcentaje de humedad tal como se muestra en la tabla 15.

4.2.2. Caracterización del extracto

Tabla 16. *Características fisicoquímicas de los extractos*

EXTRACTO	pH	ACIDEZ (%ácido cítrico)	BRIX
Alcachofa	5.6	0.128	5.03
Espárrago	5.97	0.256	8.68

Según diversos estudios Apolinário y Col, 2014, durante la extracción la inulina a elevadas temperaturas se puede degradar cuando el pH es inferior a 5. Para evitar esta degradación se emplea tampón fosfato sódico (0,05 M, pH 6,5). Según los resultados obtenidos se logra ver que en ambos extractos el pH no baja de los 5°Brix, lo cual es positivo por lo anteriormente mencionado.

Huaraz & Reyes, 2014; determinaron que el pH en el extracto de alcachofa es de 6.34, valor lejano al encontrado en nuestra investigación, pero que de igual manera es estable para poder usarlo como sustrato en el medio de fermentación.

García, et al; 2006, demostró que los grados Brix tienen una relación significativa en el comportamiento de la actividad enzimática a lo largo del tiempo. Al aumentar los grados Brix se da una disminución en la actividad enzimática.

Por ellos es necesario considerar valores de grados brix no menores de 5 a 6, entonces comparado a los grados brix hallado en el caso del espárrago esta adecuado con el valor que asciende a los 8°Brix, contrario a lo que sucede en el caso del extracto de alcachofa que mostró 5.6°Brix, este valor es aceptable, pero se puede emplear un mejor método de separación de la parte líquida en el extracto mediante el uso de un microfiltro y así disminuir la cantidad de solidos disueltos en el extracto.

Tabla 17. *Determinación de Proteínas*

TUBO	ABSORBANCIA (505 nm)	[] DE PROTEÍNAS (g/L)	CONVERSIÓN (mg/ml)
1	0.029	0.085866037	1.2
2	0.033	0.097668929	1.32
	PROMEDIO		1.26

Se dio lectura la absorbancia en el espectrofotómetro, con un Blanco de agua más Reactivo de Bradford previamente preparado.

Nos dio resultado 1.26 mg/ml de Proteína en la Enzima lo que resulta bajo según lo dicho por Kushi et al. (2000), determinó los valores de la Actividad Específica de la inulinasa purificada por HPLC de *Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus* ATCC 16045 en presencia de inulina siendo 4.58 mg/ml de proteína a 55 °C y pH 4.4 óptimos, respectivamente.

Esto se debió a que la Enzima no se encontraba en buenas condiciones de calidad, o algunos de los parámetros afectaron la productividad en proteína.

4.3.Determinación de valores de parámetros cinéticos Km y Vmax, en la fermentación de *kluveromyces marxianus*, para producción de la enzima inulinasa.

La producción de la enzima Inulinasa por *kluveromyces marxianus*, siguió la cinética de Michaelis – Menten, y cada valor experimental se ajustó al modelo de Lineweaver-Burk donde se determinaron los parámetros cinéticos Km y Vmax.(Goldbeter, 2013).

Los parámetros Vmax y Km describen de forma cinética a las enzimas denominadas michaelianas.

El valor de Km nos indica la relación de afinidad de la enzima por el sustrato que será tanto más alta cuanto más baja sea la constante de Michaelis.

Para este análisis según los resultados de la Tabla., se muestra una mayor afinidad en la producción de la enzima inulinasa por fermentación en extracto de espárrago con respecto a la Sacarosa, con un valor de Km de 3.58 g/L, lo que nos indica que la enzima se une con mayor fuerza al sustrato, siendo saturado de forma rápida el catalizador en pequeñas cantidades de sustrato. El valor de Vmax indica la velocidad de catálisis cuando la enzima se encuentra saturada de sustrato (Goldbeter, 2013).

Tabla 18

Parámetros cinéticos Km y Vmax en la fermentación de kluveromyces marxianus, para Producción de la Enzima Inulinasa, con respecto a dos sustratos (inulina y sacarosa)

Fuente / Parámetro	INULINA		SACAROSA	
	Espárrago	Alcachofa	Espárrago	Alcachofa
Vmax (UI/mL)	36.9	26.17	135.135	98.03
Km (g/L)	12.78	14.109	3.58	5.66

4.4. Análisis preliminar del contenido de sólidos disueltos (°Brix) en el extracto de espárrago y extracto de Alcachofa

Brix (símbolo °Bx) es una unidad cuantitativa utilizada para medir la cantidad de sólidos o sólidos totales disueltos en un líquido definido (Fuchs, 2020).

Según (Fuchs, 2020) 1° Brix (°Bx) corresponde a 1 gramo de sacarosa en 100 gramos de solución. La sacarosa es un carbohidrato simple, un disacárido consiste en dos monosacáridos, fructosa y glucosa, de origen natural en frutas y verduras. La sacarosa también se llama azúcar de mesa.

$$1^{\circ}Brix = 10 \text{ g/L sacarosa}$$

Bajo este concepto, se realiza un análisis preliminar para validar lo dicho por (Fuchs, 2020) es por ello que se prepararon soluciones de glucosa, fructosa, sacarosa, inulina y una mezcla de las tres soluciones, y se procedió a medir el contenido de sólidos disueltos con el Refractómetro Digital .

Tabla 19. Análisis de Grado °Brix de soluciones.

	SOLUCIÓN (g/L)	° BRIX
Glucosa	2	0.22
Fructosa	2	0.21
Sacarosa	3	0.36
Mezcla de las 3 soluciones	3	0.36
Inulina	10	0.98

Se obtiene una correlación según lo dicho por (Fuchs, 2020) se muestra una relación de $1^{\circ}Brix$ equivale a 10 g/L sacarosa. Con respecto a ello se realizó un análisis equivalente del contenido de sólidos disueltos del extracto de espárrago entre el extracto de alcachofa, del cual tuvo como resultado:

$$\frac{^{\circ}Brix \text{ Extrac. Espárrago}}{^{\circ}Brix \text{ Extrac. Alcachofa}} = \frac{9.16}{5.69} = 1,6$$

$$^{\circ}Brix \text{ Extrac. Espárrago} = 1,6 \text{ Extrac. Alcachofa}$$

Obteniendo una relación de 1:1.6 de factor de dilución con respecto al Extracto de espárrago. En donde la dilución del extracto de espárrago, se va realizar en todo el proceso de fermentación, como fuente de sustrato.

4.5.Optimización de la actividad enzimática en la producción de caldo crudo enzimático de inulinasa a partir de un cultivo en matraces de *kluvermyces marxianus*, en un medio que contiene extracto de alcachofa y otro de extracto de espárrago como fuente de carbono y energía

En el presente estudio se realizó una estrategia experimental y de análisis, medida por la Metodología Superficie de Respuesta (MSR), con un diseño compuesto central rotacional (DCCR), empleando para identificar las condiciones óptimas utilizando dos variables, agitación (rpm) y concentración de extracto (%v/v), en respuesta a la actividad inulinasa (UI/mL), como variable respuesta. En la actualidad el DCCR, es un diseño empleado en la optimización de procesos.

La Metodología superficie de respuesta presenta, métodos y estadísticas que se utilizan para modelar y analizar problemas, en donde una variable se verá influida por otras variables, con el fin de optimizar las variables de interés (Francisco et al., 2013).

El diseño Compuesto central rotacional se encuentra basado en la metodología superficie de respuesta (MSR), en el cual se determina un análisis de ANOVA y de regresión múltiple (Mota et al., 2016).

En la Tabla 20 y 25, se muestra la matriz con los datos del DCCR con valores reales y codificados de agitación (rpm) y concentración de extracto (v/v); y el resultado de la actividad enzimática para la condición de fermentación por corridas de muestra expresadas en Unidades Internacionales por mililitro, de actividad Inulinasa obtenida de la fermentación de *kluveromyces marxianus* utilizando extractos de alcachofa y espárrago.

Cada resultado experimental, se utilizó para evaluar los efectos lineales, cuadráticos y de interacción entre variables mediante el programa estadístico STATICTICA v10.0

4.5.1. Optimización de la actividad enzimática en la producción de caldo crudo enzimático de inulinasa a partir de un cultivo en matraces de *kluvermyces marxianus*, en un medio que contiene extracto de espárrago como fuente de carbono y energía

Tabla 20. *Diseño experimental según DCCR para las variables de concentración de extracto de espárrago y agitación – valores codificados y reales.*

Ensayo	VALORES CODIFICADOS		VALORES REALES		RESPUESTAS				
	X1	X2	A: Concentración de extracto (% v/v)	B: Agitación (rpm)	Act. Inu. Esparr. (U/mL)	Act. Invertasa. Esparr. (U/mL)	Espárrago proteínas mg/ml	Act. Específica. Inu. Esparr. (U/mg)	Act. Específica. Sac. Esparr. (U/mg)
1	-1.000	-1.000	20	150	3.53	51.21	0.16	22.63	328.27
2	-1.000	1.000	20	200	2.75	41.96	0.16	16.77	255.86
3	1.000	-1.000	50	150	11.66	102.37	0.31	37.73	331.29
4	1.000	1.000	50	200	6.46	81.02	0.25	25.43	318.96
5	-1.4142	0.000	14	175	3.43	39.32	0.18	19.27	220.90
6	1.4142	0.000	56	175	10.50	126.25	0.34	30.79	370.23
7	0.000	-1.4142	35	140	5.43	71.81	0.18	29.84	394.56
8	0.000	1.4142	35	210	2.87	40.40	0.13	21.74	306.06
9	0.000	0.000	35	175	4.96	85.67	0.21	23.16	400.33
10	0.000	0.000	35	175	5.05	84.45	0.23	22.25	372.03
11	0.000	0.000	35	175	5.01	85.72	0.22	22.98	393.21

A. Actividad enzimática de inulinasa con extractos de espárrago sobre inulina

Se llevó a cabo un análisis ANOVA de la actividad enzimática de inulinasa con extracto de espárrago sobre inulina, como se indica en la Tabla 21.

Se observa el resultado de los factores de concentración (%v/v) y agitación (rpm), y la interacción de ambos de manera significativa, con un p-valor menor a 0.05.

El coeficiente de determinación (R^2) en el modelo tuvo como resultado 0,9803 para la actividad enzimática, indicando un 98,03% de variación en los datos obtenidos para la actividad, y demostrando un modelo fiable.

Tabla 21. Análisis de varianza (ANOVA) de la actividad enzimática de inulinasa con extracto de espárrago sobre inulina

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	5	85,4223	17,0845	49,87	0,000
Lineal	2	71,1359	35,5679	103,83	0,000
Concentración (% v/v)	1	59,6150	59,6150	174,02	0,000
Agitación (rpm)	1	11,5209	11,5209	33,63	0,002
Cuadrado	2	9,4023	4,7012	13,72	0,009
Concentración (% v/v)*Concentración (% v/v)	1	7,0242	7,0242	20,50	0,006
Agitación (rpm)*Agitación (rpm)	1	0,4822	0,4822	1,41	0,289
Interacción de 2 factores	1	4,8841	4,8841	14,26	0,013
Concentración (% v/v)*Agitación (rpm)	1	4,8841	4,8841	14,26	0,013
Error	5	1,7128	0,3426		
Total	10	87,1351			

$R^2 = 0.9803$ y R^2 ajustado = 0.96069

SC: Suma de cuadrados; GL: grados de libertad; MC: cuadrado medio

Significancia en $p < 0.05$

Se obtiene una ecuación de regresión para la actividad enzimática de inulinasa con extracto de espárrago sobre inulina, donde es posible modelar la relación entre las variables:

$$\begin{aligned}
 \text{Act. Inu. Esparr. (U/mL)} &= 5,006 + 2,730 \text{ Concentración (\% v/v)} - 1,200 \text{ Agitación (rpm)} \\
 &+ 1,115 \text{ Concentración (\% v/v)*Concentración (\% v/v)} \\
 &- 0,292 \text{ Agitación (rpm)*Agitación (rpm)} \\
 &- 1,105 \text{ Concentración (\% v/v)*Agitación (rpm)}
 \end{aligned}$$

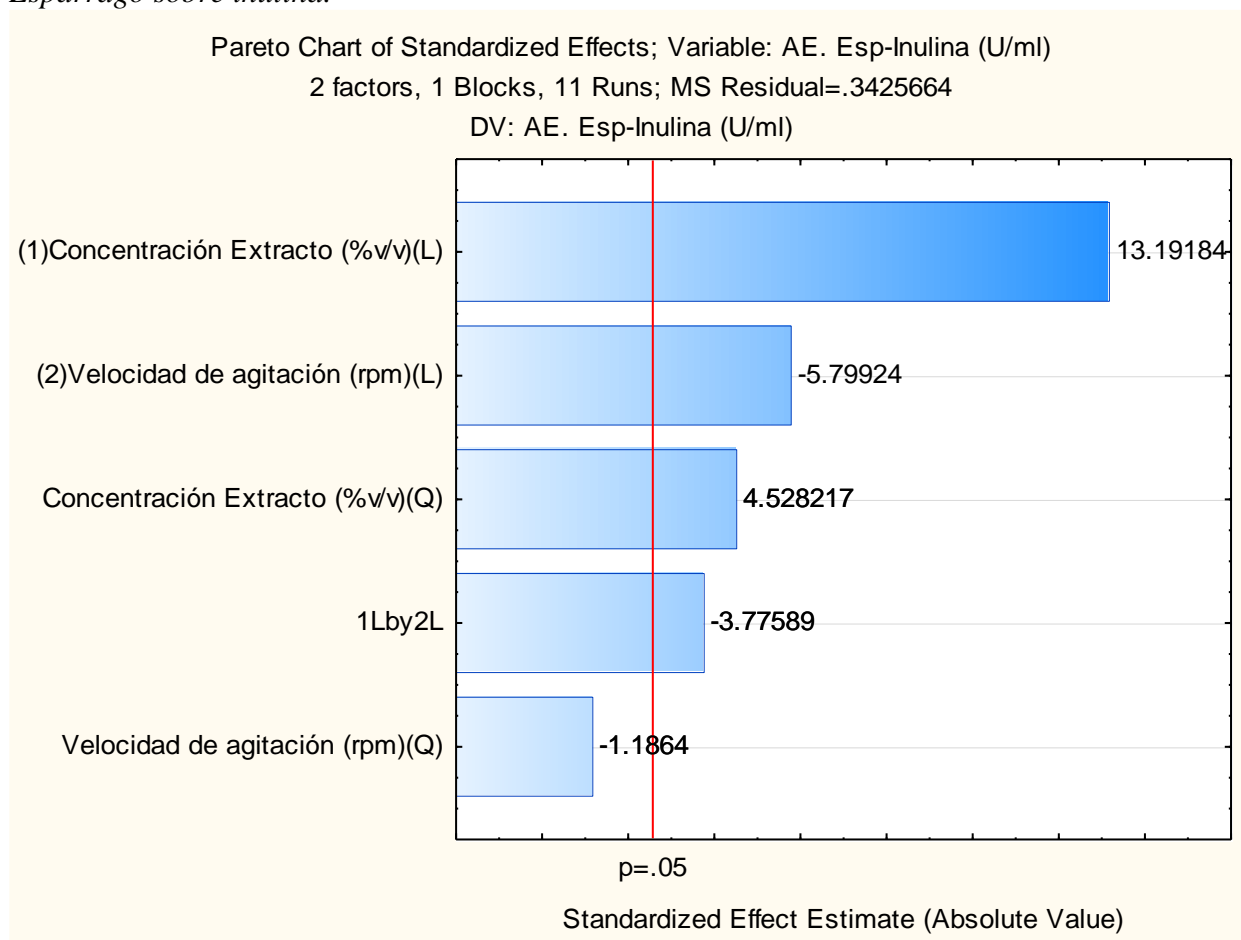
El diagrama de Pareto que se muestra en la figura 9, presenta un efecto lineal significativo en la concentración (% v/v) y agitación (rpm), donde el primero influye de manera positiva y el segundo negativa, respecto a la actividad enzimática (UI/mL), se infiere de ello, que no es ideal aumentar los valores de agitación (rpm) mostrando un efecto decreciente, caso contrario de la concentración (% v/v) al incrementar los valores muestra un aumento en la actividad enzimática del extracto de espárrago sobre inulina (UI/mL) respectivamente.

Tal efecto se demuestra en la Tabla 14 de Caracterización Físicoquímica del extracto espárrago, con un valor elevado de azúcares reductores en su composición de 39,29 g/L, resultando ser una buena fuente de sustrato vegetal de carbono y energía, en el proceso de fermentación.

Una hierba perenne como el espárrago, contiene en sus raíces en promedio del 15% de inulina (Chi et al., 2011).

Se mostró el efecto de la velocidad de agitación presente en el proceso de fermentación, alterando la morfología de las levaduras, de tal forma que reducen las ramificaciones y el alargamiento de las células, inhibiendo la secreción de las enzimas (Ahamed & Vermette, 2010).

Figura 9. Diagrama de Pareto para la actividad Enzimática Inulinasa - Extracto De Espárrago sobre inulina.



Para investigar la interacción de las variables independientes, se construyeron las gráficas de superficie de respuesta tridimensional y gráficas de contorno, que se muestran en la Figura 10 y 11, respectivamente. Del cual valida lo demostrado en el diagrama de Pareto, determinando la influencia significativa que actúa positivamente en el caso de la concentración (%v/v), sin embargo, la agitación (rpm) continúa presentando un efecto negativo.

En base a ello, se demuestra que, al aumentar la velocidad de agitación, conduce a un aumento en el número de burbujas formadas, que posterior a ello estallan en la superficie del fluido agitado, lo que resulta en un aumento de corte, afectando la secreción enzimática (Buffo et al., 2016)

Se muestra según el diseño elaborado, que a una agitación de 150 rpm y a una concentración del 50 %, se obtiene una mejor actividad enzimática de 11,66 UI/mL.

Figura 10. Superficie de respuesta de actividad inulinasa de extracto de espárrago – inulina.

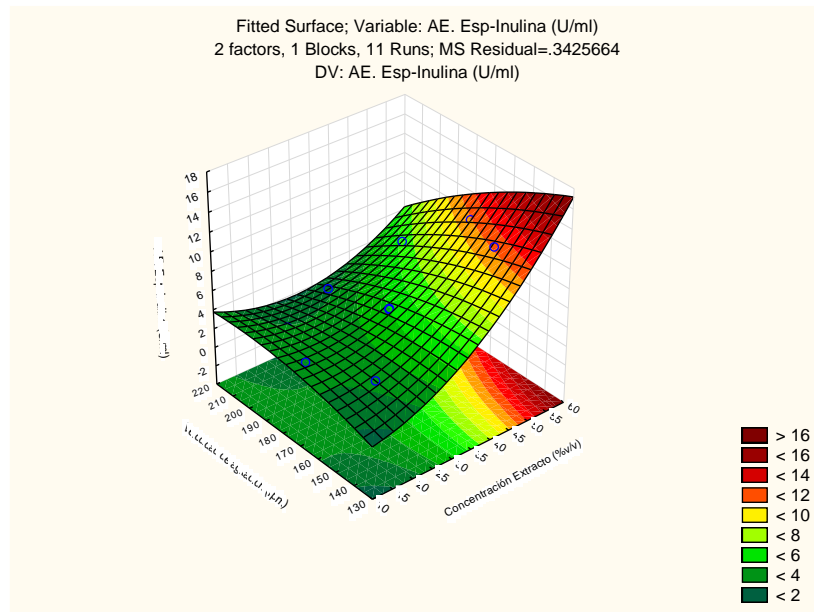
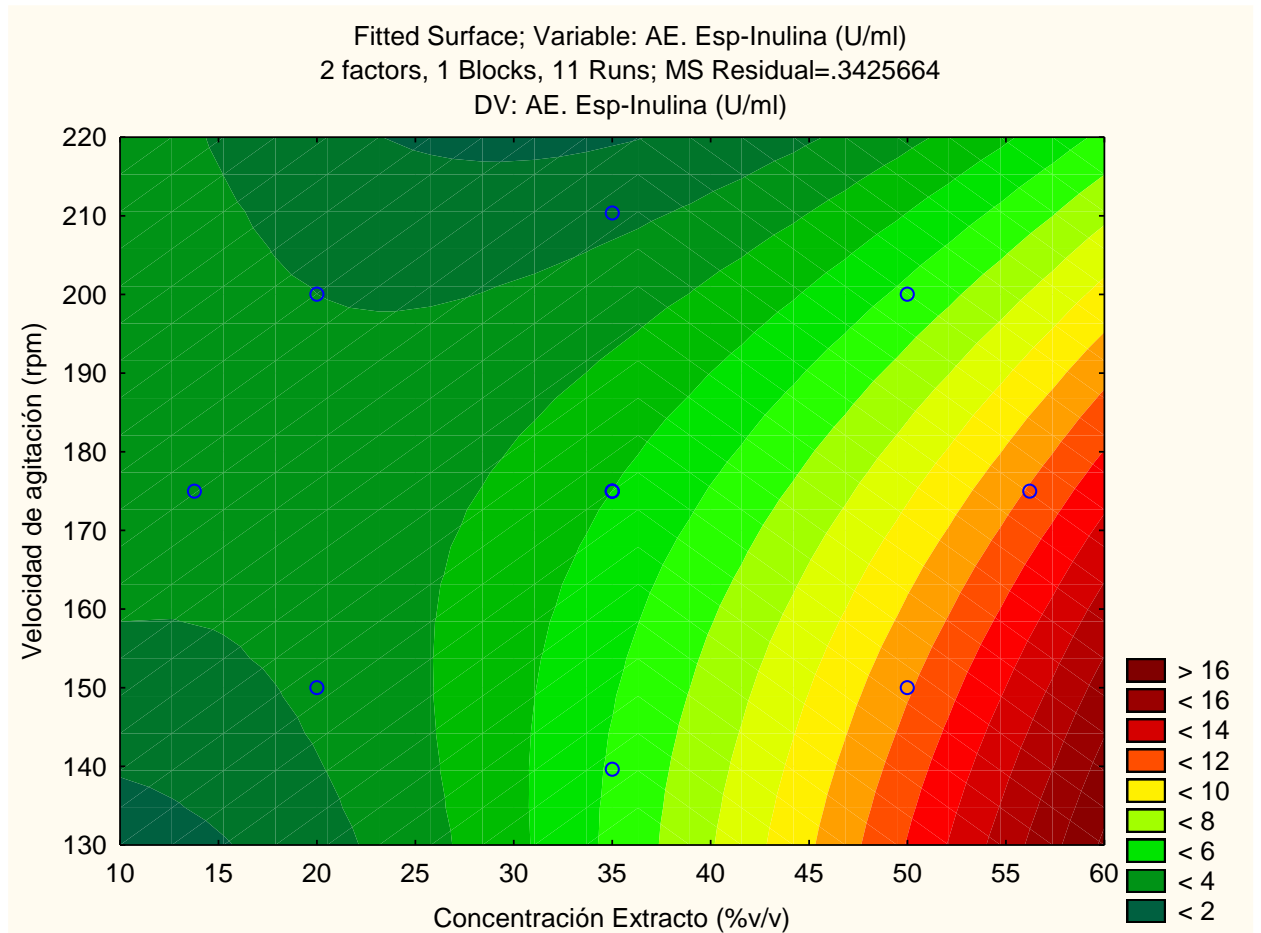


Figura 11. Gráfica de contorno de actividad Inulinasa de extracto de espárrago – inulina.



B. Actividad enzimática de inulinasa con extracto de espárrago sobre sacarosa.

Los resultados experimentales del estudio de la actividad enzimática de inulinasa con extracto de espárrago sobre sacarosa, se ilustran en la Tabla 22.

Se evidencian efectos significativos de un valor p-valor menor a 0.05, de manera individual entre ambos factores. Demostrando que la interacción entre ellos presenta un efecto significativo negativo sobre la variable respuesta.

Tabla 22. Análisis de Varianza (ANOVA) de la actividad enzimática de inulinasa con extracto de espárrago sobre sacarosa

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	5	7689,03	1537,81	48,38	0,000
Lineal	2	6382,86	3191,43	100,41	0,000
Concentración (% v/v)	1	5679,25	5679,25	178,68	0,000
Agitación (rpm)	1	703,60	703,60	22,14	0,005
Cuadrado	2	1269,54	634,77	19,97	0,004
Concentración (% v/v)*Concentración (% v/v)	1	9,90	9,90	0,31	0,601
Agitación (rpm)*Agitación (rpm)	1	1214,31	1214,31	38,20	0,002
Interacción de 2 factores	1	36,63	36,63	1,15	0,332
Concentración (% v/v)*Agitación (rpm)	1	36,63	36,63	1,15	0,332
Error	5	158,93	31,79		
Total	10	7847,95			

$R^2 = 0.97975$ y R^2 ajustado = 0.9595

SS: Suma de cuadrados; GL: grados de libertad; MC: cuadrado medio

Significancia en $p < 0.05$

Se obtiene una ecuación de regresión para la actividad enzimática de inulinasa con extracto de espárrago sobre Sacarosa, donde es posible modelar la relación entre las variables:

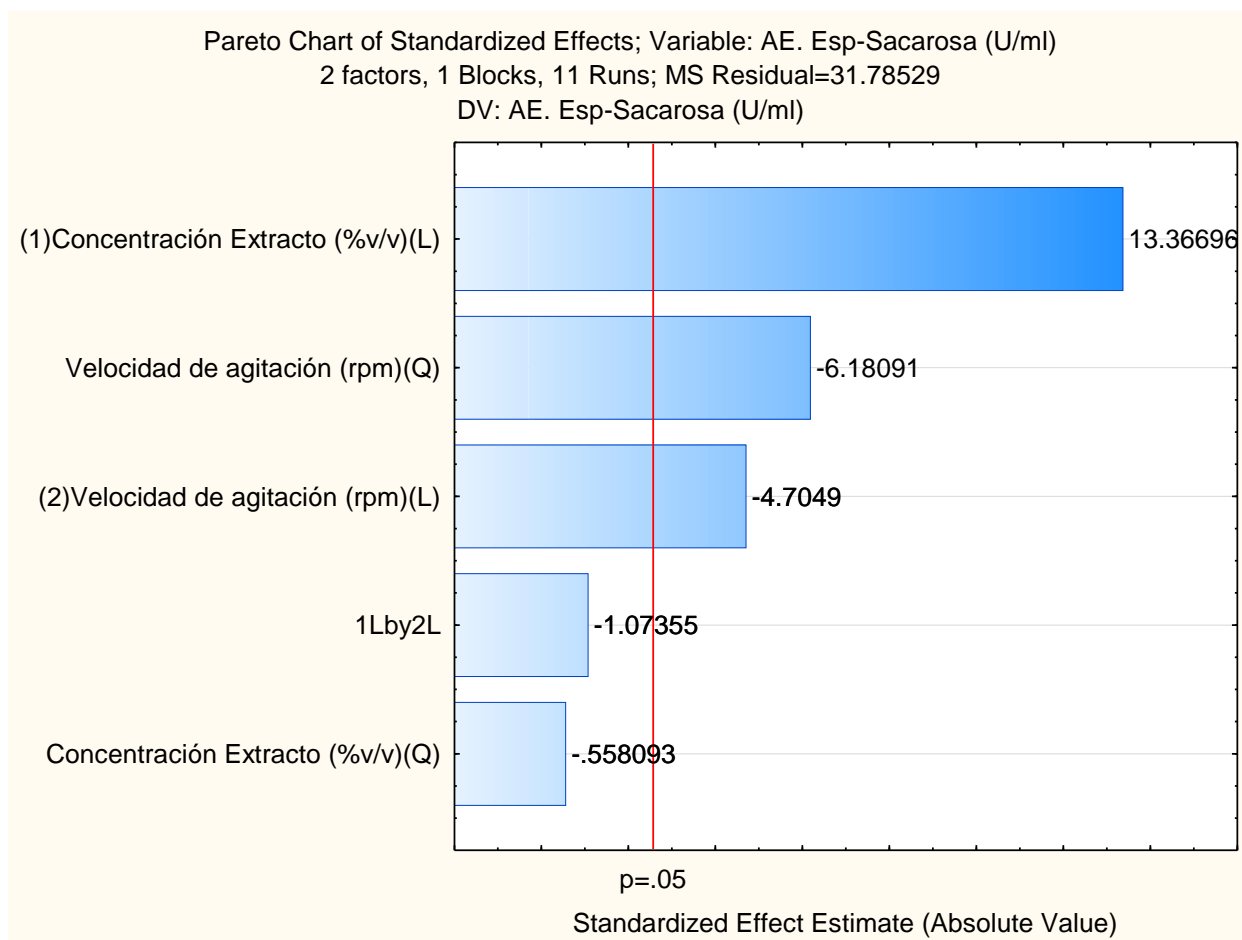
$$\begin{aligned} \text{Act. Sac. Esparr (U/mL)} &= 85,28 + 26,64 \text{ Concentración (\% v/v)} - 9,38 \text{ Agitación (rpm)} \\ &- 1,32 \text{ Concentración (\% v/v)*Concentración (\% v/v)} \\ &- 14,66 \text{ Agitación (rpm)*Agitación (rpm)} \\ &- 3,03 \text{ Concentración (\% v/v)*Agitación (rpm)} \end{aligned}$$

En la Figura 13 se muestra el diagrama de Pareto de efectos estandarizados, donde se evaluó los factores de concentración de extracto de espárrago (%v/v) y agitación (rpm) respecto a la sacarosa, en el proceso de fermentación. Donde ambos factores resultan ser significativos.

En el diagrama se muestra un efecto positivo de la concentración de extracto de espárrago (%v/v) ello se corrobora en el análisis comparativo previo de parámetros cinéticos K_m y V_{max} de la Tabla 18, realizado con la finalidad de evaluar la afinidad enzima- sustrato, donde el K_m será tanto más alta cuanto más baja sea la constante de Michaelis (K_m), el resultado muestra que extracto de espárrago con respecto a la Sacarosa presenta una mayor afinidad, con un valor de K_m de 3.58 g/L. Mientras que respecto a la inulina presenta un valor de K_m de 12.78 g/L.

Ricca et al, 2007, nos dice que, las exoinulinasas ejercen una actividad catalítica sobre la sacarosa, dividiendo la glucosa y fructosa, demostrando su actividad invertasa. Se comprueba que en su mayoría las enzimas que se producen a partir de mohos, presenta una mayor actividad invertasa.

Figura 12. Diagrama de Pareto para la actividad enzimática inulinasa – extracto de espárrago sobre sacarosa



Se observa en la figura 13 y 14, de superficie respuesta y de contorno de la actividad inulinasa de extracto espárrago con respecto a la sacarosa, un efecto positivo de la concentración (%) en la producción de la enzima, mientras que al aumentar los valores de agitación (rpm) se muestran efectos decrecientes.

Melina & Carlos, s. f., nos mencionan que, la agitación del medio de cultivo favorece la disolución del oxígeno y los nutrientes en suspensión; sin embargo, algunas enzimas, son susceptibles a desnaturalización cuando la interfase gas-agua se incrementa tal como en una agitación vigorosa.

Se muestra según el diseño planteado, que a una agitación de 175 rpm y a una concentración del 56 %, se obtiene una mejor actividad enzimática de 126,25 UI/mL.

Figura 13. Superficie de Respuesta de actividad inulinasa de extracto espárrago – sacarosa.

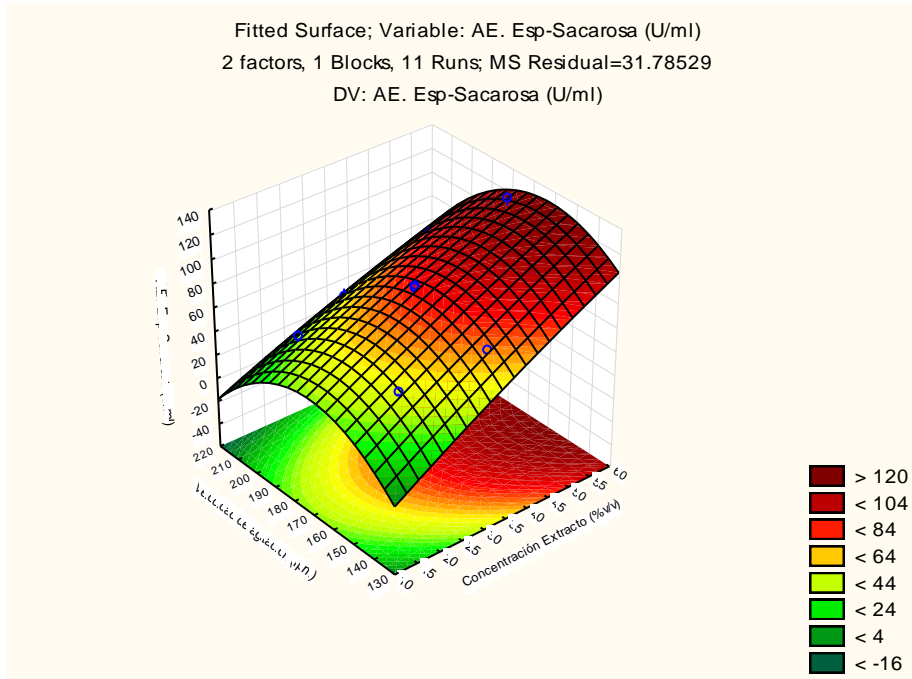
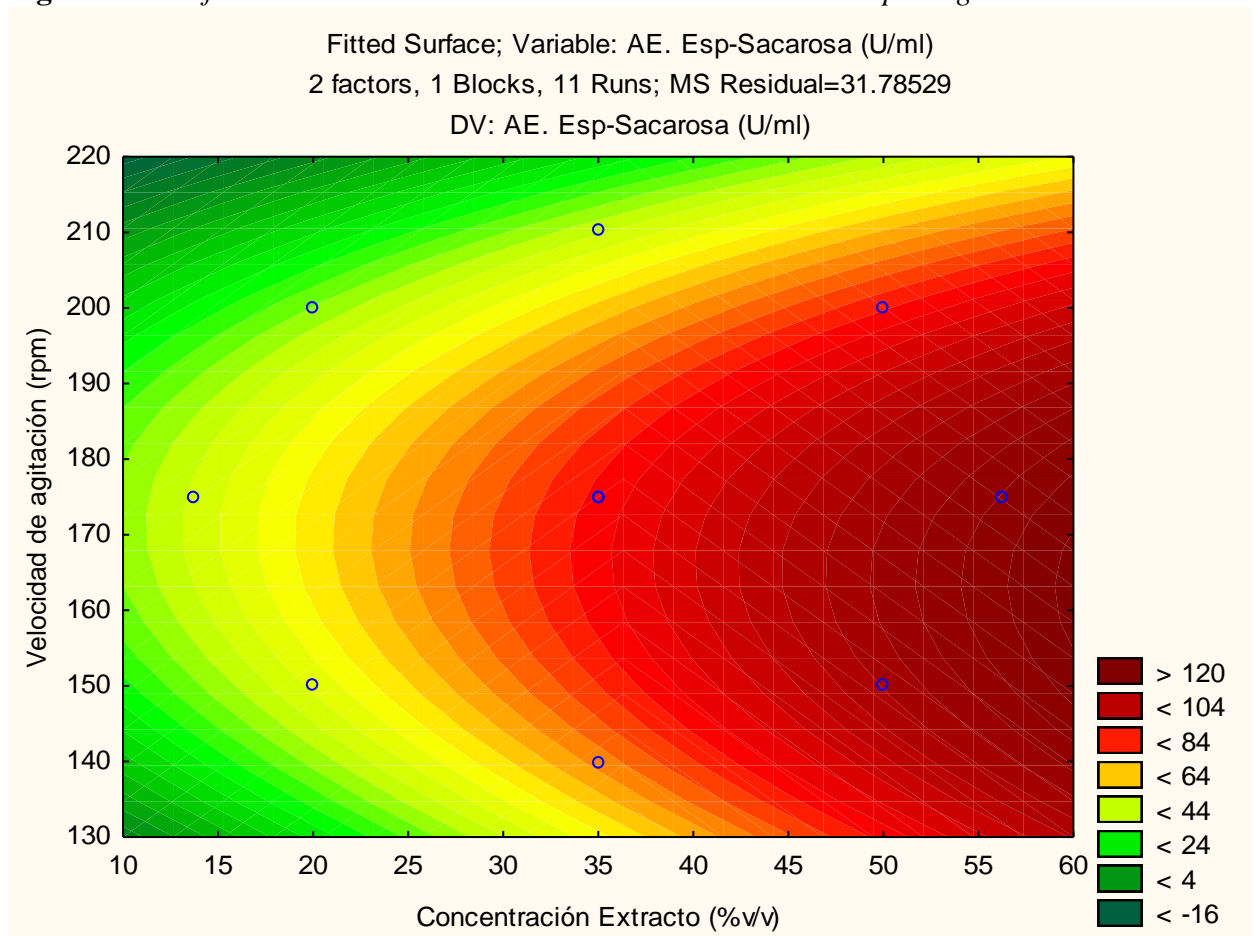


Figura 14. Gráfica de contorno de actividad inulinasa de extracto espárrago – sacarosa.



C. Optimización del proceso de actividad enzimática de extracto de espárrago

Se realizó la optimización del proceso de actividad enzimática en extracto de espárrago, evaluando el perfil de deseabilidad para maximizar el valor del grado de actividad.

Según la Tabla 23, nos muestra valores deseables de concentración del 56% y agitación de 163 rpm, del cual se obtendrá una actividad significativa de espárrago sobre sacarosa e inulina. Para corroborar el método, se realizaron 3 análisis a partir de un cultivo en matraces de *kluveromyces marxianus*, bajo las condiciones dadas.

Del cual se corrobora en la siguiente tabla 24, que bajo las siguientes condiciones se muestran resultados óptimos de actividad enzimática de espárrago sobre Inulina de 12,344 UI/mL y sobre sacarosa de 124,058 UI/mL. Y una Act. Específica de 34,577 UI/mg sobre inulina y 347,501 UI/mg sobre sacarosa

Tabla 23. Valores deseables para maximizar el valor del grado de actividad enzimática de extracto espárrago

Solución	Concentración (% v/v)	Agitación (rpm)	Act. Sac. Esparr (U/mL) Ajuste	Act. Inu. Esparr. (U/mL) Ajuste	Deseabilidad compuesta
1	56,213	163,21	123,492	12,3342	0,984009

Figura 15. Perfil de deseabilidad para maximizar el valor del grado de actividad enzimática de Extracto de Espárrago

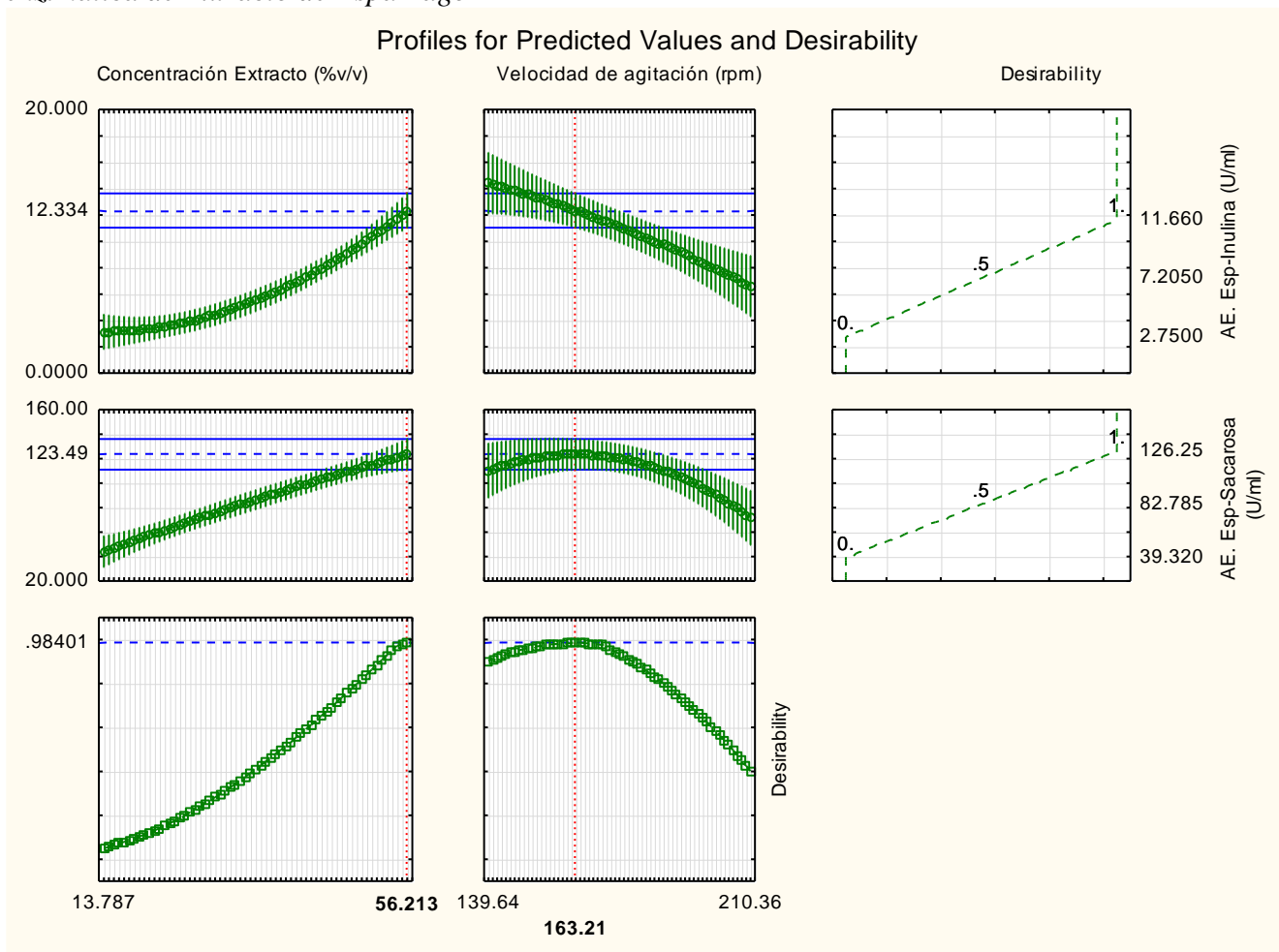


Tabla 24. Valores óptimos de actividad enzimática en extracto de espárrago

Corrida	Concentración (% v/v)	Agitación (rpm)	Act. Sac. Esparr (U/mL) Ajuste	Act. Inu. Esparr. (U/mL) Ajuste	Espárrago proteínas mg/ml
1	56	163	125,572	12,512	0,359
2	56	163	122,101	12,12	0,357
3	56	163	124,501	12,400	0,357
	Promedio		124,058	12,344	0,357

4.5.2. Optimización de la actividad enzimática en la producción de caldo crudo enzimático de inulinasa a partir de un cultivo en matraces de *kluvermyces marxianus*, en un medio que contiene extracto de alcachofa como fuente de carbono y energía

Tabla 25. *Diseño Experimental según DCCR para las variables de concentración de extracto de alcachofa y agitación – Valores Codificados y Reales.*

Ensayo	VALORES CODIFICADOS		VALORES REALES		RESPUESTAS				
	X1	x2	A: Concentración de extracto (% v/v)	B: Agitación (rpm)	Act. Inu. Alcach. (U/mL)	Act. Sac. Alcach (U/mL)	Alcachofa proteínas mg/ml	Act. Específica .Inu.Alcach (U/mg)	Act. Específica.Sac. Alcach. (U/mg)
1	-1	-1	20	150	1.91	69.57	0.28	6.90	251.16
2	-1	1	20	200	1.34	50.65	0.19	7.13	269.42
3	1	-1	50	150	5.93	100.99	0.38	15.77	268.59
4	1	1	50	200	4.16	85.19	0.26	16.44	336.72
5	-1.4142	0	14	175	1.89	60.35	0.29	6.63	211.75
6	1.4142	0	56	175	6.03	106.78	0.41	14.82	262.36
7	0	-1.4142	35	140	2.41	85.00	0.20	12.23	431.47
8	0	1.4142	35	210	1.72	44.00	0.13	13.65	349.21
9	0	0	35	175	4.22	77.89	0.18	23.71	437.58
10	0	0	35	175	4.16	78.58	0.19	22.49	424.76
11	0	0	35	175	4.08	70.67	0.18	22.54	390.44

A. Actividad enzimática de inulinasa con extracto de alcachofa sobre inulina

Se observa en la Tabla 26 el análisis de varianza ANOVA, a un nivel de confianza del 95%, del cual indica que influyen de manera significativa en el proceso de manera individual.

El coeficiente de determinación (R^2) en el modelo tuvo como resultado 0,97968 para la actividad enzimática, indicando un 97,968% de variación en los datos obtenidos para la actividad, y demostrando un modelo fiable.

Tabla 26. Análisis de Varianza (ANOVA) de la actividad enzimática de inulinasa con extracto de alcachofa sobre inulina

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	5	27.5639	5.5128	48.20	0.000
Lineal	2	21.5192	10.7596	94.08	0.000
Concentración (% v/v)	1	20.1449	20.1449	176.15	0.000
Agitación (rpm)	1	1.3743	1.3743	12.02	0.018
Cuadrado	2	5.6847	2.8423	24.85	0.003
Concentración (% v/v)*Concentración (% v/v)	1	0.0015	0.0015	0.01	0.915
Agitación (rpm)*Agitación (rpm)	1	5.2428	5.2428	45.84	0.001
Interacción de 2 factores	1	0.3600	0.3600	3.15	0.136
Concentración (% v/v)*Agitación (rpm)	1	0.3600	0.3600	3.15	0.136
Error	5	0.5718	0.1144		
Total	10	28.1357			

$R^2 = 0.97968$ y R^2 ajustado = 0.95935

SC: Suma de cuadrados; GL: grados de libertad; MC: cuadrado medio

Significancia en $p < 0.05$

Se obtiene una ecuación de regresión para la actividad enzimática de inulinasa con extracto de alcachofa sobre inulina, donde es posible modelar la relación entre las variables:

$$\begin{aligned} \text{Act. Inu. Alcach. (U/mL)} &= 4.153 + 1.587 \text{ Concentración (\% v/v)} - 0.414 \text{ Agitación (rpm)} \\ &- 0.016 \text{ Concentración (\% v/v)*Concentración (\% v/v)} \\ &- 0.964 \text{ Agitación (rpm)*Agitación (rpm)} \\ &- 0.300 \text{ Concentración (\% v/v)*Agitación (rpm)} \end{aligned}$$

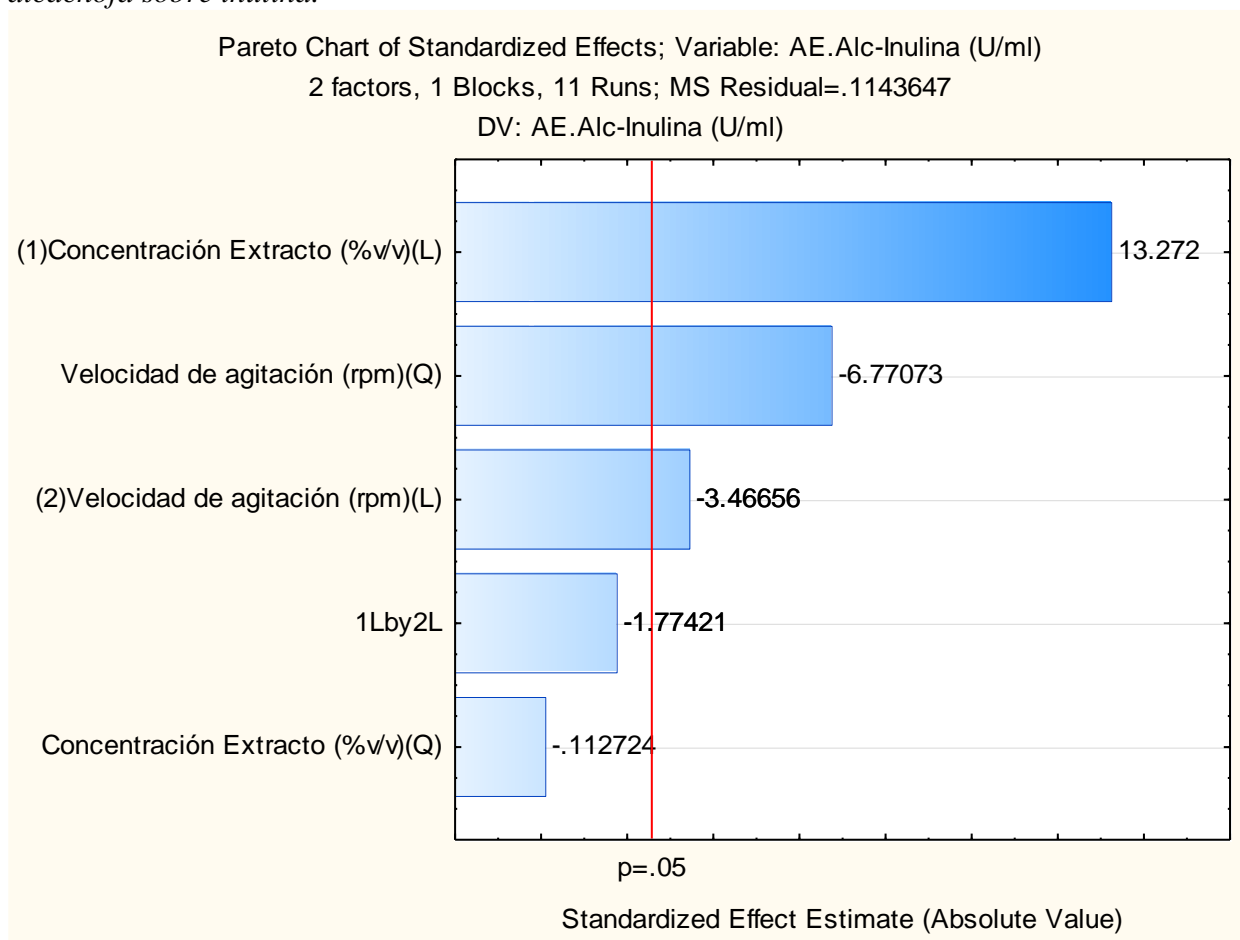
En cuanto de la producción de la enzima inulinasa con respecto a la inulina, se observa en la figura 16, la concentración (%v/v) con un efecto lineal significativo, influyendo de manera positiva a la actividad enzimática (UI/mL), se infiere de ello, que a medida que aumenta la concentración (%v/v) se obtendrá una mayor actividad (UI/mL).

Según lo evaluado, la alcachofa presenta propiedades de crecimiento deseables, en donde se pueden plantar en suelos arenosos, estuarios. Recientemente, la alcachofa se ha convertido en un potencial demandante, como fuente de materia prima, en la obtención industrial de fructosa e inulina. La alcachofa presenta, de 50 a 70 g/kg de su peso húmedo en forma de fructano de tipo inulina (Chi et al., 2011)

Del mismo modo, se observa que la agitación (rpm) con efecto cuadrático es significativo, pero con influencia negativa en la actividad enzimática (UI/mL), se infiere de ello, que no es ideal aumentar los valores de agitación mostrado un efecto decreciente en la actividad (UI/mL).

El estudio realizado de fermentación en matraces con extracto de alcachofa para la producción de enzima inulinasa, por Melina & Carlos, s. f., reporta que la agitación es un factor crítico de la cepa *K. marxianus*, siendo responsable de la viabilidad y producción enzimática. Cabe mencionar que la enzima se muestra susceptible a ser desnaturalizada, al incrementar los valores de agitación vigorosa.

Figura 16. Gráfica de Pareto para la actividad enzimática inulinasa - extracto de alcachofa sobre inulina.



Se observa en la figura 17 y 18, de superficie respuesta y de contorno de la actividad inulinasa de extracto alcachofa – inulina, en función a la concentración (%v/v) y la agitación (rpm), tal como se describe en la gráfica de Pareto, se demuestra que la concentración (%v/v) influye un efecto significativo de forma positiva, ya que a medida que aumenta dicha variable, la actividad aumenta de manera simultánea.

Se puede apreciar de igual manera, que la agitación (rpm), influye significativamente, pero de manera negativa, afectando la actividad de la enzima.

La tendencia negativa que se muestra para los valores elevados de velocidad de agitación, se debe posiblemente al efecto de estrés originado por la fuerza de agitación, que llegan a neutralizar las enzimas y disminuir la conversión de hidrólisis (Roldan-Cruz et al., 2021)

Se muestra según el diseño planteado, que a una agitación de 175 rpm y a una concentración del 56 %, se obtiene una mejor actividad enzimática de 6,03 UI/mL.

Figura 17. Superficie de Respuesta de actividad inulinasa de extracto alcachofa – inulina.

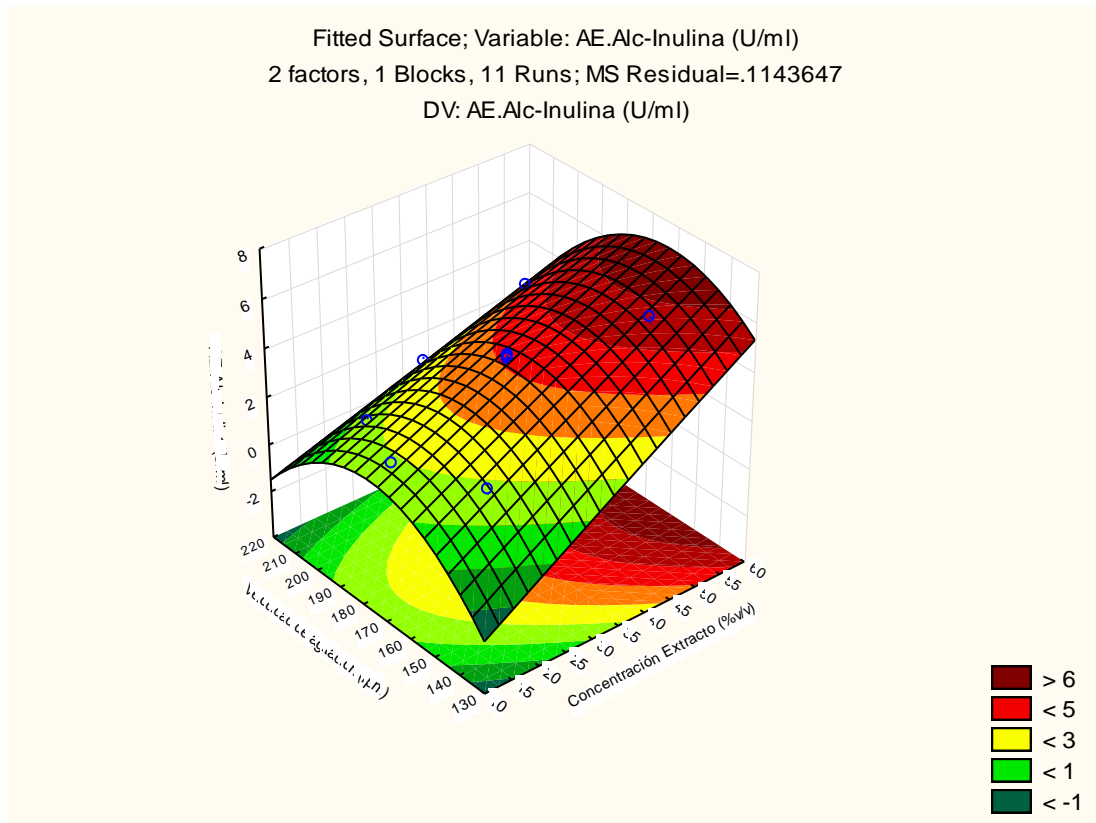
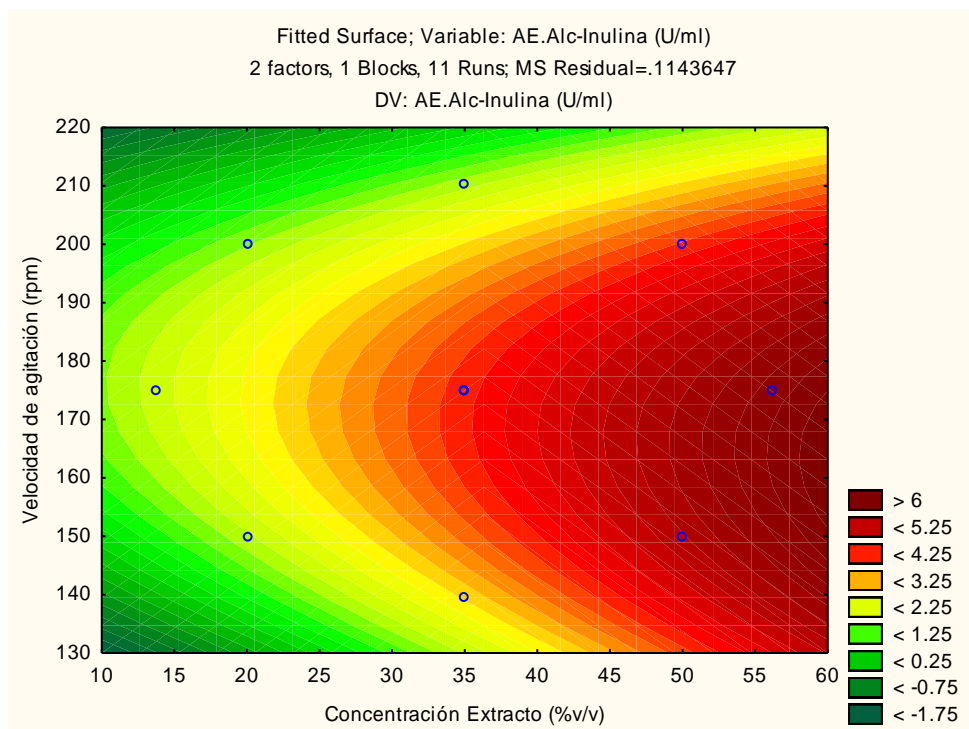


Figura 18. Gráfica de contorno de actividad inulinasa de extracto de alcachofa – inulina.



B. Actividad enzimática de inulinasa con extracto de alcachofa sobre sacarosa

Se realizó un análisis de varianza de los factores de concentración (%v/v) y agitación (rpm) con un valor p-valor menor a 0.05, que se muestra en la Tabla 27 influyendo de manera significativa en el proceso de fermentación. Obteniéndose un coeficiente de determinación (R^2) del 96,799 %, indicando que el modelo tiene valores predictivos.

Tabla 27. Análisis de Varianza (ANOVA) de la actividad enzimática de inulinasa con extracto de alcachofa sobre sacarosa

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	5	3606.02	721.20	30.24	0.001
Lineal	2	3239.77	1619.88	67.93	0.000
Concentración (% v/v)	1	2165.54	2165.54	90.81	0.000
Agitación (rpm)	1	1074.23	1074.23	45.05	0.001
Cuadrado	2	363.82	181.91	7.63	0.030
Concentración (% v/v)*Concentración (% v/v)	1	117.82	117.82	4.94	0.077
Agitación (rpm)*Agitación (rpm)	1	139.20	139.20	5.84	0.060
Interacción de 2 factores	1	2.43	2.43	0.10	0.762
Concentración (% v/v)*Agitación (rpm)	1	2.43	2.43	0.10	0.762
Error	5	119.23	23.85		
Total	10	3725.25			

$R^2 = 0.96799$ y R^2 ajustado = 0.93599

SS: Suma de cuadrados; GL: grados de libertad; MC: cuadrado medio

Significancia en $p < 0.05$

Se obtiene una ecuación de regresión para la actividad enzimática de inulinasa con extracto de alcachofa sobre sacarosa, donde es posible modelar la relación entre las variables:

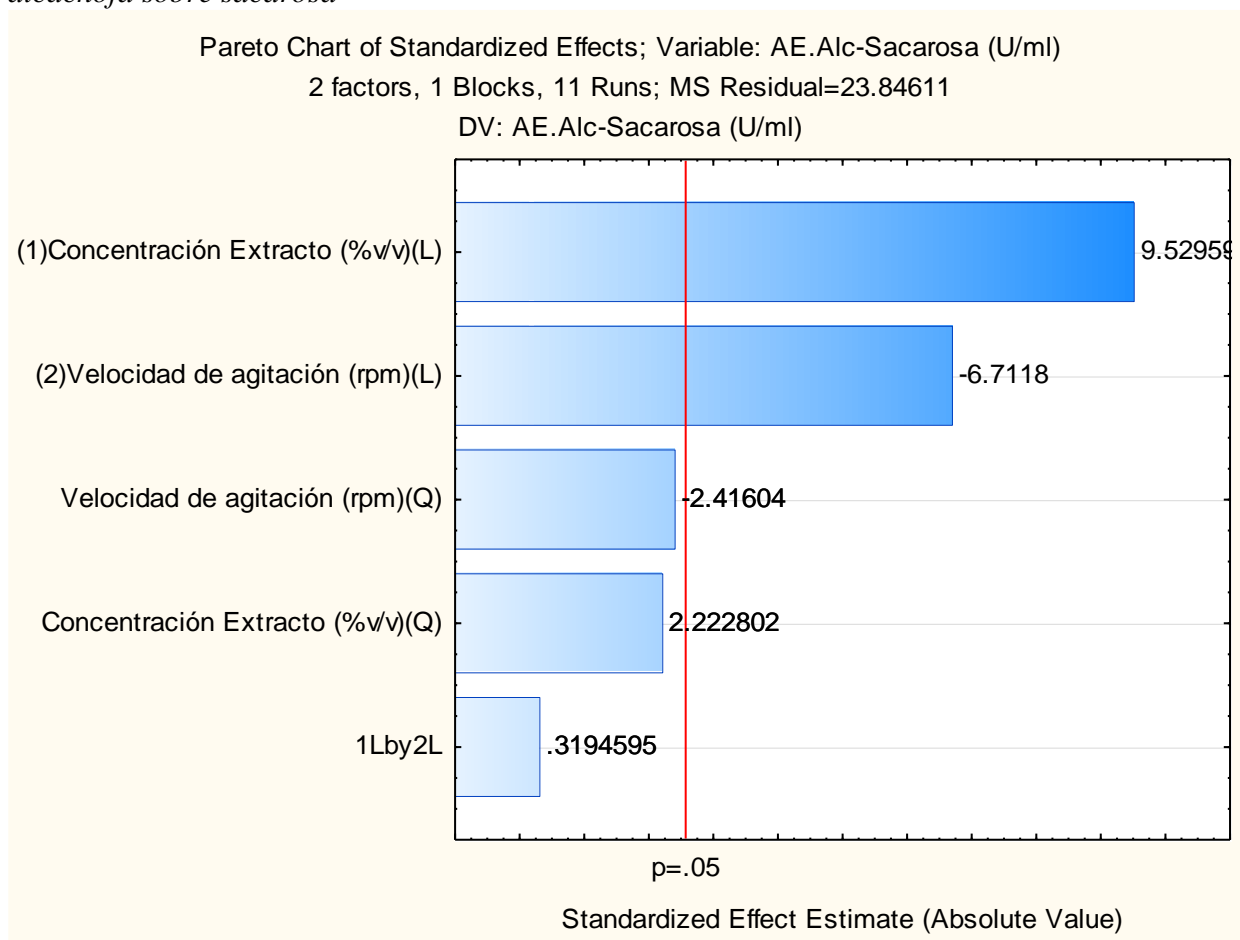
$$\begin{aligned} \text{Act. Sac. Alcach} &= 75.71 + 16.45 \text{ Concentración (\% v/v)} - 11.59 \text{ Agitación (rpm)} \\ \text{(U/mL)} &+ 4.57 \text{ Concentración (\% v/v)*Concentración (\% v/v)} \\ &- 4.96 \text{ Agitación (rpm)*Agitación (rpm)} \\ &+ 0.78 \text{ Concentración (\% v/v)*Agitación (rpm)} \end{aligned}$$

En la Figura 19 se muestra una Gráfica de Pareto de efectos estandarizados en donde se evalúa el predominio de variables independientes como la concentración (%v/v) y la agitación (rpm) en cuanto de la producción de la enzima inulinasa con respecto a la sacarosa, se observa que la concentración (%v/v) con efecto lineal es significativo, influyendo de manera positiva a la actividad enzimática (UI/mL), se infiere de ello, que a medida que aumenta la concentración (%v/v) se obtendrá una mayor actividad (UI/mL).

Mencionar que, la fructosa es un monosacárido que se encuentra presente de forma natural en la alcachofa (Zugasti Murillo et al., 2016)

Se observa el mismo comportamiento negativo de la agitación de los análisis realizados sobre la inulina en la actividad enzimática (UI/mL), se infiere de ello, que no es ideal aumentar los valores de agitación mostrando un efecto decreciente en la actividad (UI/mL).

Figura 19. Gráfica de Pareto para la actividad enzimática inulinasa - extracto de alcachofa sobre sacarosa



Se observa en la figura 20 y 21, de superficie respuesta y de contorno de la actividad inulinasa de extracto alcachofa – sacarosa, en función a la concentración (%v/v) y la agitación (rpm), tal y como se describe en la sección anterior, la concentración (%v/v) influye un efecto significativo de forma positiva, ya que a medida que aumenta dicha variable, la actividad aumenta de manera simultánea. Demostrándose, que la agitación (rpm), influye significativamente, pero de manera negativa, afectando la actividad de la enzima.

Las velocidades de agitación más altas, en lugar de generar una acción enzimática, provocan una reducción del tamaño, lo que atribuye cambios en la estructura secundaria a raíz de la fuerza de agitación (Kadić et al., 2014)

Se muestra según el diseño planteado, que a una agitación de 175 rpm y a una concentración del 56 %, se obtiene una mejor actividad enzimática de 106,78 UI/mL.

Figura 20. Superficie de respuesta de actividad inulinasa de extracto alcachofa – sacarosa.

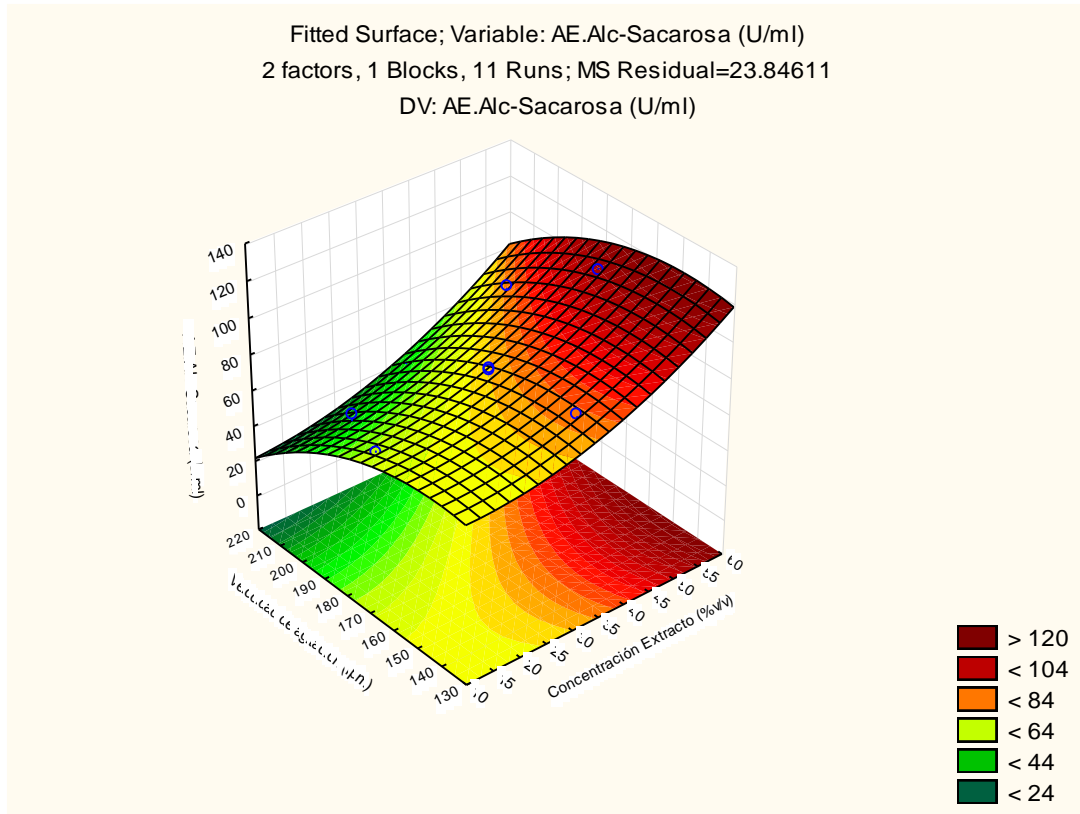
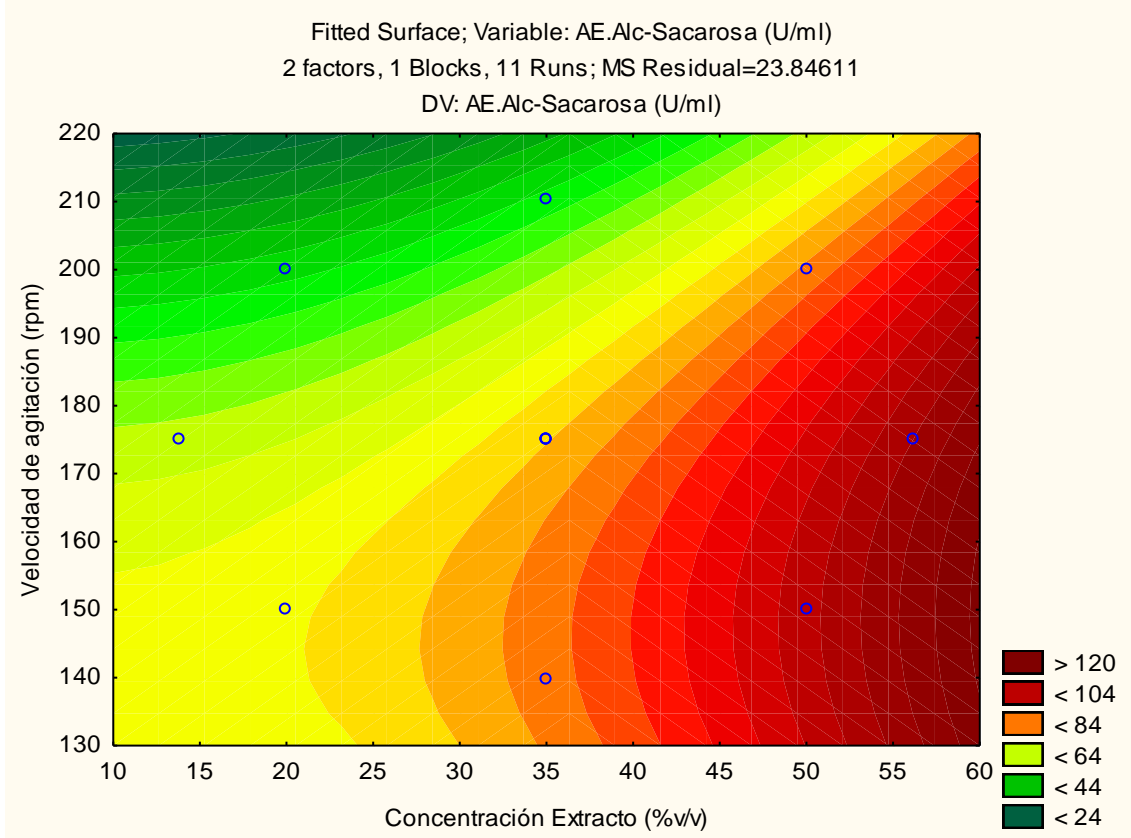


Figura 21. Gráfica de contorno de actividad inulinasa de extracto alcachofa – sacarosa.



C. Optimización del proceso de actividad enzimática de extracto alcachofa

Se realizó la optimización del proceso de actividad enzimática en extracto de alcachofa, evaluando el perfil de deseabilidad para maximizar el valor del grado de actividad.

Según la Tabla 28, nos muestra valores deseables de concentración del 56% y agitación de 177 rpm, del cual se obtendrá una actividad significativa de alcachofa sobre sacarosa e inulina. Para corroborar el método, se realizaron 3 análisis a partir de un cultivo en matraces de *kluveromyces marxianus*, bajo las condiciones dadas.

Del cual se corrobora en la siguiente Tabla 29, que bajo las siguientes condiciones se muestran resultados óptimos de actividad enzimática de alcachofa sobre Inulina de 7,406 UI/mL y sobre sacarosa de 109,48 UI/mL. Y una Act. Específica de 18,377 UI/mg sobre inulina y 271,66 UI/mg sobre sacarosa.

Tabla 28. Valores deseables para maximizar el valor del grado de actividad enzimática de extracto de alcachofa

Solución	Concentración (% v/v)	Agitación (rpm)	Act. Sac. Alcach (U/mL) Ajuste	Act. Inu. Alcach. (U/mL) Ajuste	Deseabilidad compuesta
1	56,21	177,36	107,08	6,28	1

Figura 22. Perfil de deseabilidad para maximizar el valor del grado de actividad enzimática de extracto de Alcachofa

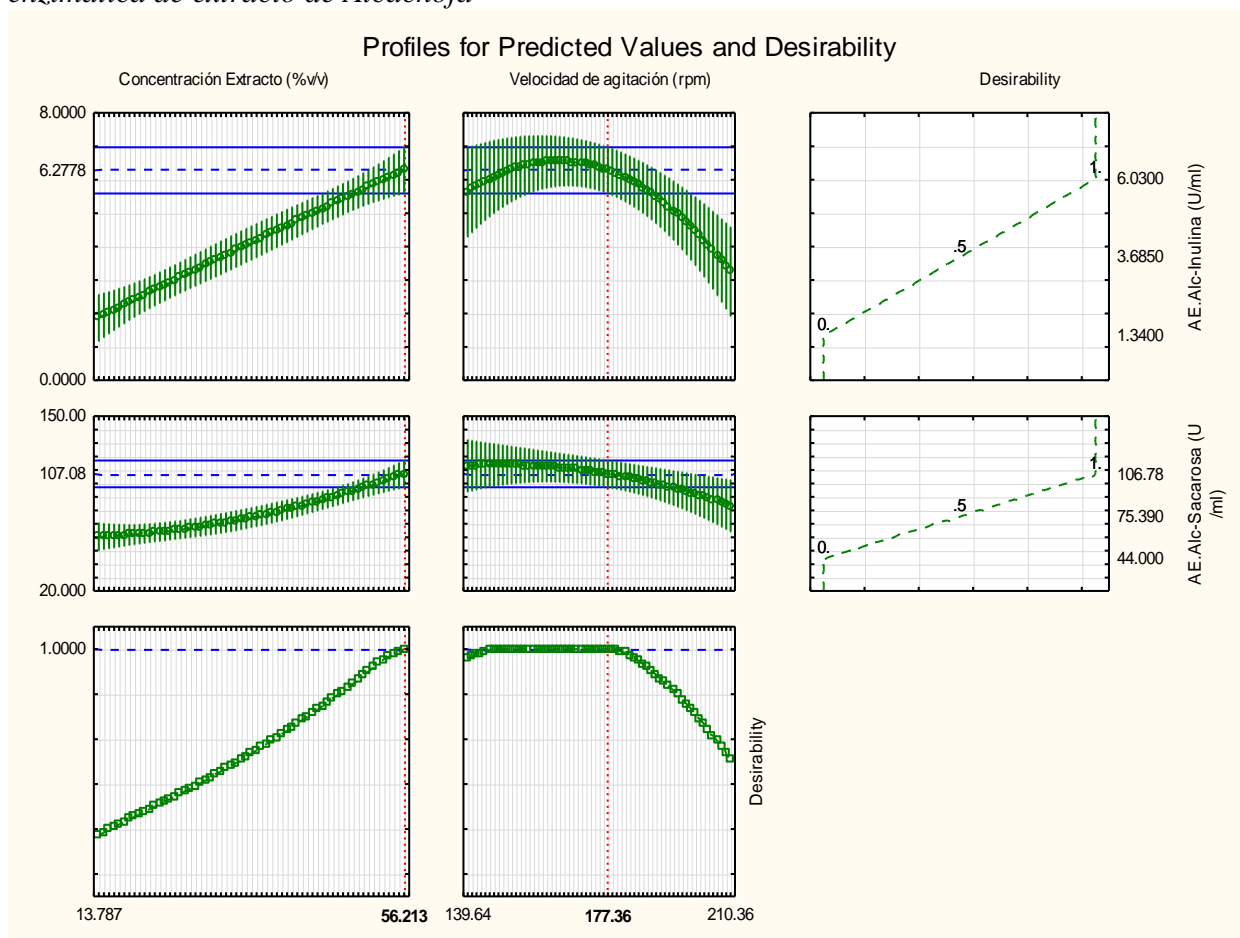


Tabla 29. Valores óptimos de actividad enzimática en extracto de alcachofa

Corrida	Concentración (% v/v)	Agitación (rpm)	Act. Sac. Alcach (U/mL)	Act. Inu. Alcach (U/mL)	Alcachofa proteínas mg/ml
1	56	177	109,14	7,10	0,41
2	56	177	110,90	8,37	0,40
3	56	177	108,41	6,75	0,40
	Promedio		109,48	7,41	0,40

V. CONCLUSIONES

Del trabajo realizado, se puede concluir lo siguiente:

- Las actividades inulinasa e invertasa de la enzima inulinasa producida por fermentación de *K. marxianus* en extracto de espárrago superó en 66.7% y 13.3% respectivamente las actividades de la inulinasa producida por fermentación en extracto de alcachofa.
- La actividad específica de inulinasa e invertasa de la enzima inulinasa producida por fermentación de *K. marxianus* en extracto de espárrago superó en 88.15 % y 27.92% respectivamente las actividades de la inulinasa producida por fermentación en extracto de alcachofa.
- De los valores fisicoquímicos de la alcachofa y del espárrago se concluyó que: la alcachofa presenta mayor cantidad de fibra cruda en comparación al espárrago, siendo esto beneficioso para la producción por fermentación de *K. marxianus* de la inulinasa. Por otro lado, la alcachofa mostró mayor fuente de carbono siendo también beneficioso para la producción de la enzima inulinasa. Se determinaron los parámetros cinéticos K_m y V_{max} , realizados mediante un proceso de fermentación de *kluveromyces marxianus*, en la producción de la enzima inulinasa, donde se demuestra una mayor afinidad por el extracto de espárrago determinándose un K_m equivalente a 3,58 g/L y un V_{max} de 135.135 UI/mL .
- Se determinó en la producción de la enzima inulinasa por fermentación de *K. marxianus*, que a mayor sea la concentración de extracto vegetal (%v/v) de alcachofa o espárrago se expresa una influencia positiva en la actividad, a diferencia de la velocidad de agitación (rpm) que incide una influencia negativa.

V. RECOMENDACIÓN

- Se recomienda realizar próximos estudios de escalamiento en biorreactor, para la producción de enzima inulinasa.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahamed, A., & Vermette, P. (2010). Effect of mechanical agitation on the production of cellulases by *Trichoderma reesei* RUT-C30 in a draft-tube airlift bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, 49(3), 379-387.
- Anónimo. (2016). *Tipos de espárragos*. Recuperado el 3 de junio de 2019, de elhuertourbano.net: <https://www.elhuertourbano.net/hortalizas/tipos-de-esparragos/>
- Buffo, M. M., Corrêa, L. J., Esperança, M. N., Cruz, A. J. G., Farinas, C. S., & Badino, A. C. (2016). Influence of dual-impeller type and configuration on oxygen transfer, power consumption, and shear rate in a stirred tank bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, 114, 130-139. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.07.003>
- Castillo, A., & Rolando, C. (2010). Producción de inulinasa por levaduras de *Kluyveromyces marxianus*. *Scientia Agropecuaria*, 235-245.
- Castillo, C., & Contreras, R. (2012). *Producción de inulinasa por cultivo discontinuo de Kluyveromyces marxianus en extracto de yacón*. Arequipa: XXVI Congreso peruano de química.
- Chacón, A. (2006). PERSPECTIVAS AGROINDUSTRIALES ACTUALES DE LOS FOS. *Agronomía Mesoamericana*, 265-286.
- Cherbut C. 2002. Inulin and oligofructose in the dietary fibre concept. *British Journal of Nutrition* 87(Suppl. 2): S159–S162.
- Chi, Z.-M., Zhang, T., Cao, T.-S., Liu, X.-Y., Cui, W., & Zhao, C.-H. (2011). Biotechnological potential of inulin for bioprocesses. *Bioresource Technology*, 102(6), 4295-4303. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.12.086>
- Colombia, U. N. (2014). Introducción a la Metodología de superficie de respuesta: Diseño experimental para postgrados. *DYNA*, 8.
- De Las Cuevas, M. (6 de febrero de 2016). *Espárragos verdes o trigueros*. Obtenido de www.eldiariomontanes.es: <https://www.eldiariomontanes.es/planes/201602/06/esparragos-verdes-trigueros-20160206000659-v.html>
- Diestra, J., & Margarito, L. (2015). *MODELAMIENTO MATEMÁTICO DE LA ESTABILIDAD TÉRMICA DE LA INULINASA DE Kluyveromyces marxianus FERMENTADO EN EXTRACTO DE YACÓN*. Nuevo Chimbote, Perú: Universidad Nacional del Santa.

- Diestro, J., Margarito, L., Vega, R., & Castillo, A. (2015). Modelación matemática del efecto de la temperatura en la actividad y la estabilidad térmica de la inulinasa de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571. *Scientia Agropecuaria*, 5.
- Dubois, M., Gilles, J., Hamilton, P., & Smith, F. (1956). COLORIMETRIC METHOD FOR DETERMINATION OF SUGARS AND RELATED SUBSTANCES. *ANALYTICAL CHEMISTRY*, 350-356.
- Estrella, M., & Criollo, D. (2013). *Proyecto de Pre - Factibilidad para Producción y Comercialización de Alcachofa; Caso Práctico: Empresa Inaexpo*. Ecuador: Universidad Central del Ecuador .
- Federici, F., Fava, F., Kalogerakis, N., & Mantzavinos. (2009). Valorisation of agroindustrial by-products, effluents and waste: concept, opportunities and the case of olive mill waste waters . *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* , 895-900.
- Flores, A., Contreras, J. C., Morlett-Chávez, J., & Aguilar, R. (2015). Comparative study of fungal strains for thermostable inulinase production. *Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología*, 6.
- Fonnegra, R., & Jimenez, S. (2007). *Plantas medicinales aprobadas en Colombia*. Colombia. Antioquía: Universidad de Antioquia.
- FOSS. (2018). *Data Sheet ST 255 Soxtec™*. Barcelona, España: FOSS IBERIA, S.A. .
- FOSS. (2018). *FT 122 Fibertec™*. Ciudad de México: FOSS IBERIA, S.A.
- Francisco, M.-C., Issam, H., Abdellatif, K., Abdallah, J., & Mohamed, B. (2013). Predicción de rugosidad en maquinado de compuestos con base de Peek usando metodología de superficie de respuesta. *Ingeniería, Investigación y Tecnología*, 14(4), 463-474. [https://doi.org/10.1016/S1405-7743\(13\)72258-3](https://doi.org/10.1016/S1405-7743(13)72258-3)
- Fuchs, L. (2020, octubre 18). *Qué son los grados Brix y cómo nos ayudan a saber el azúcar que tienen alimentos como frutas y verduras*. Directo al Paladar. <https://www.directoalpaladar.com/cultura-gastronomica/que-grados-brix-como-nos-ayudan-a-saber-azucar-que-tienen-alimentos-como-frutas-verduras>
- Fundación, E. d. (s.f.). *Espárragos*. Madrid, España: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
- FUNIBER. (2017). *composicionnutricional.com*. Obtenido de <https://www.composicionnutricional.com/alimentos/ESPARRAGO-1>
- García, C., Giraldo, G., Hurtado, H., & Mendivil, C. (2006). CINÉTICA ENZIMÁTICA DE LA POLIFENOL OXIDASA DEL BANANO GROS

MICHEL EN DIFERENTES ESTADOS DE MADURACIÓN. *REVISTA DE LA FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA*, 13-19.

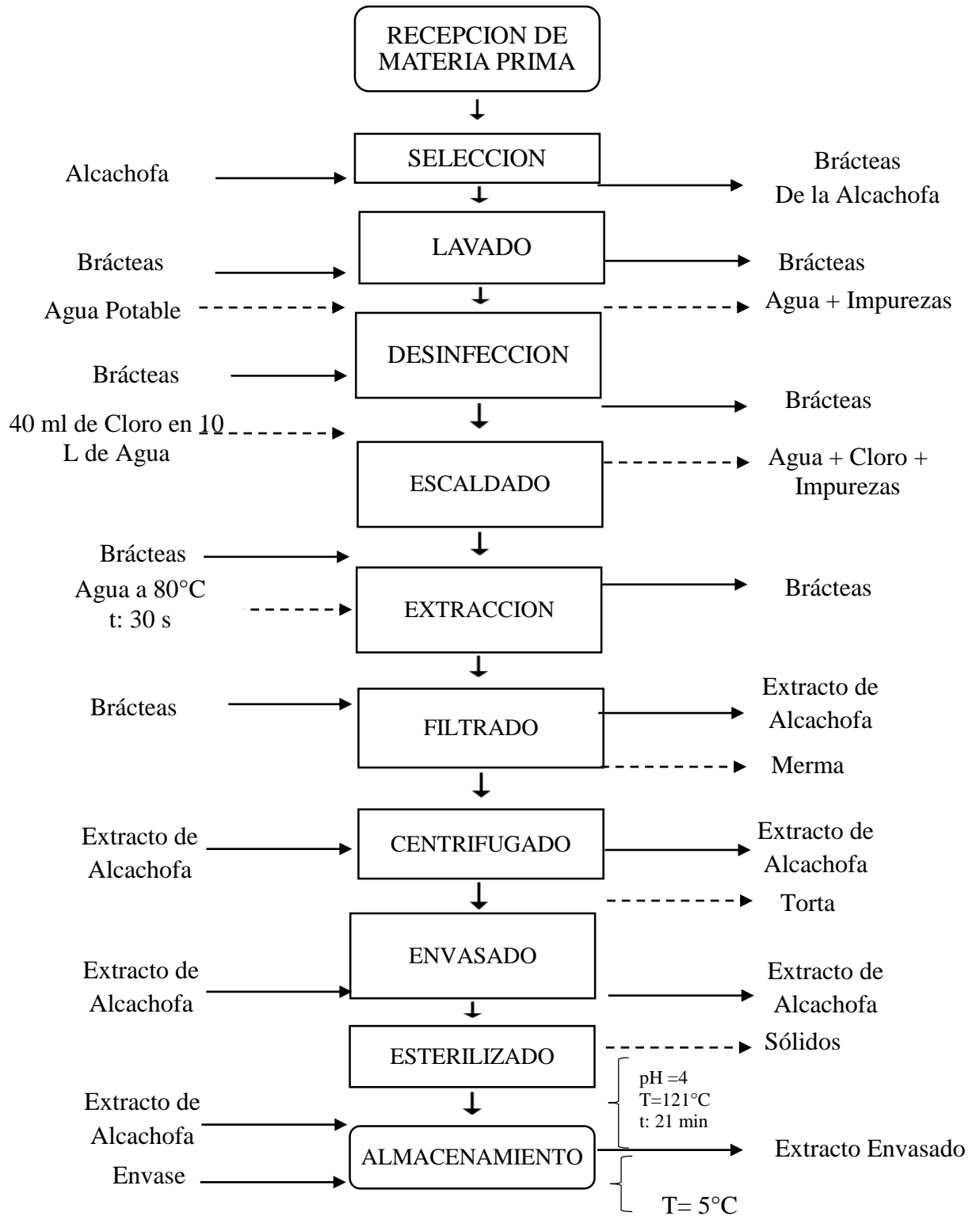
- García, Y., Boucourt, R., Albelo, N., & Núñez, O. (2007). *Fermentación de inulina por bacterias ácido lácticas con características probióticas*. Recuperado el 3 de 7 de 2022, de <http://redalyc.org/pdf/1930/193017693011.pdf>
- Goldbeter, A. (2013). Oscillatory enzyme reactions and Michaelis-Menten kinetics. *FEBS Letters*, 587(17), 2778-2784. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.07.031>
- Huaraz, R., & Reyes, J. C. (2014). *Producción de Inulinasa por Fermentación de Kluyveromyces Marxianus en condiciones óptimas de aireación y Concentración de extracto de (Cynara Scolymus)*. Nuevo Chimbote: Universidad Nacional del Santa.
- INFOAGRO. (5 de Diciembre de 2010). *InfoAgro.com*. Obtenido de InfoAgro.com: www.infoagro.com/hortalizas/alcachofa.htm
- Kadić, A., Palmqvist, B., & Lidén, G. (2014). Effects of agitation on particle-size distribution and enzymatic hydrolysis of pretreated spruce and giant reed. *Biotechnology for Biofuels*, 7(1), 77. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-77>
- Lara, M., Lara, P., Julián, M. C., Pérez, A., & Benites, I. (2017). Avances en la producción de inulina. *SciELO*, 352-366.
- Llorach, R., Espín, J., Tomás-Barberán, F., & Ferreres, F. (2002). Artichoke (*Cynara scolymus* L.) byproducts as a potential source of health-promoting antioxidant phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 3458-3464.
- Márquez, L. (2017). Utilización de subproductos agroindustriales en alimentos. *UCV-Scientia*, 167.
- Martínez, D. (2016). Extracto de alcachofa (*Cynara scolymus* L.): experiencias de uso en los mercados de producción animal y oportunidades para su producción en Perú. *Agroindustrial Science*, 7.
- Mathers, C., & Loncar, D. (2006). Projections of Global Mortality and Burden of Disease from 2002 to 2030. *PLOS Medicine*.
- Melina, H. Z. R., & Carlos, R. C. J. (s. f.). *ASESOR: Dr. AUGUSTO CASTILLO CALDERON*.
- Mirabella, N., Castellani, V., & Sala, S. (2014). Current options for the valorization of food manufacturing waste: a review. *Journal Cleaner Production*, 28-41.

- Mota, Speck, Raja, Ramesh, & Thivaharan. (2016). *Modelado y optimización de la degradación foto-fentón homogénea de rodamina B mediante metodología de superficie de respuesta y red neuronal artificial*. 534-554.
- Pimentel, L. (2015). *Efecto de la sustitución de harina de trigo (triticum aestivum) por harina de brácteas de alcachofa (cynara scolymus) sobre el contenido de fibra cruda, firmeza instrumental y aceptabilidad general de galletas dulces*. Trujillo: Universidad Privada Antenor Orrego.
- Prajakta, P. K., Maheshkumar, V. K., Sushama, A. P., & Jadhavb, J. P. (2018). Statistical optimization of process parameters for inulinase production from Tithonia weed by Arthrobacter mysorens strain no.1. *Journal of Microbiological Methods*, 149, 55-66.
- Quitral, V., Torres, M., Velásquez, M., & Bobadilla, M. (2018). Efecto de inulina en la saciedad en humanos. *Perspectivas en Nutrición Humana*, 79-89.
- Ram, S., Singh, K., & Chauhan, J. F. (2016). A panorama of bacterial inulinases: Production, purification, characterization and industrial applications. *International Journal of Biological Macromolecules*. doi:http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.12.004
- Ramirez, J., & Ayala, M. (2014). Enzimas ¿Qué son y cómo funcionan ? *Revista Digital Universitaria*, 13.
- Ramírez, J., & Ayala, M. (2014). ENZIMAS: ¿QUÉ SON Y CÓMO FUNCIONAN? *Revista Digital Universitaria*, 1-13.
- Ricca, E., Calabrò, V., Curcio, S., & Gabriele, L. (2008). The State of the Art in the Production of Fructose from Inulin Enzymatic Hydrolysis. *Critical Reviews in Biotechnology*, 129-145.
- Ricce, C., Leyva, M., Miranda, J., Saldarriaga, L., Rodriguez, J., & Siche, R. (2013). Uso de residuos agroindustriales de la Libertad en la elaboración de un pan integral. *Agroindustrial Science*, 41-46.
- Rivera, I., & Rodríguez, P. (1999). *PERFIL DE MERCADO: ESPARRAGO*. Buenos Aires: Instituto de Economía y Sociología.
- Rodrigues, M., & Iemma, A. (2005). *Planeamiento de experimentos y optimización de procesos*. Campinas, Brasil: Casa de pan.
- Roldan-Cruz, C., Garcia-Hernandez, A., Alvarez-Ramirez, J., & Vernon-Carter, E. J. (2021). Effect of the stirring speed in the in vitro activity of α -amylase. *Food Hydrocolloids*, 110, 106127. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106127>

- Romero, L., Mejía, C., Sánchez, A., Balagurusamy, N., & Luévanos, M. (2014). Aplicaciones de las Enzimas Inmovilizadas. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 6, 1-9.
- RS, S., Rajesh, D., & Munish, P. (2006). Producción de inulinasa por *Kluyveromyces marxianus* YS-1 usando extracto de raíz de racemosus *Asparagus*. *Proceso de Bioquímica*, 41, 1703-1707. doi:doi:10.1016/j.biortech.2008.01.004
- Singh, R., & Bhemi, H. (2008). *Production of extracellular Exoinulinase from Kluyveromyces Marxianus YS-1 usinf root tubers of Asparagus Officinalis*.
- Zugasti Murillo, A., Estremera Arévalo, F., & Petrina Jáuregui, E. (2016). Dieta pobre en FODMAPs (fermentable oligosaccharides, disaccharides, monosaccharides and polyols) en el síndrome de intestino irritable: Indicación y forma de elaboración. *Endocrinología y Nutrición*, 63(3), 132-138. <https://doi.org/10.1016/j.endonu.2015.10.009>

ANEXO 1

Flujograma para la obtención del extracto de alcachofa.



ANEXO 2

Flujograma para la obtención del extracto de espárrago.

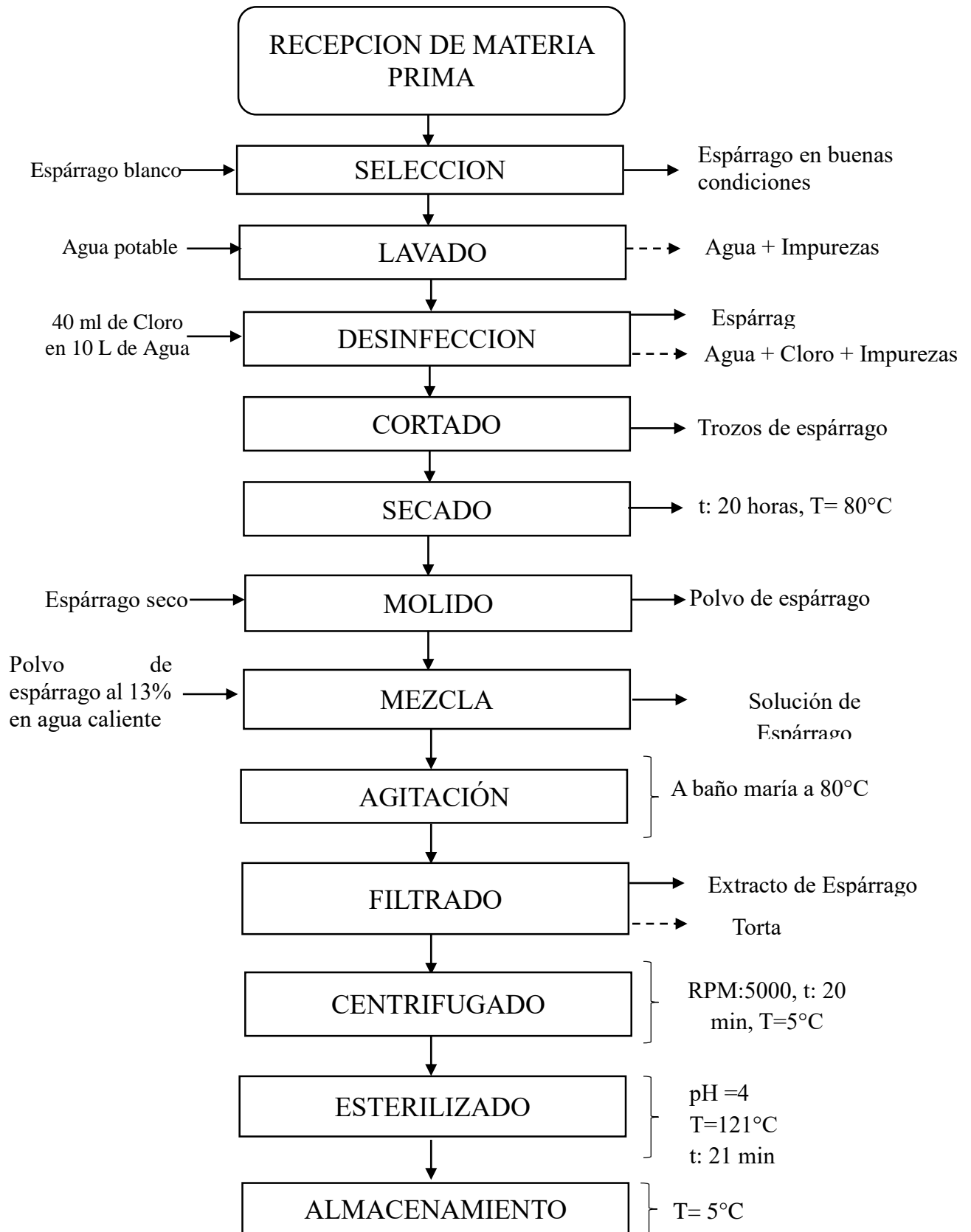


Figura 23. *Proceso de obtención del extracto de alcachofa.*



Figura 24. *Proceso de obtención del extracto de espárrago.*



ANEXO 3

Caracterización de los extractos

i. Determinación de porcentaje de humedad

Para determinar el contenido de humedad, se sigue el procedimiento establecido por la Norma Técnica ITINTEC 205.037 (1974), denominado “Método de desecación por estufa”, el cual es el siguiente:

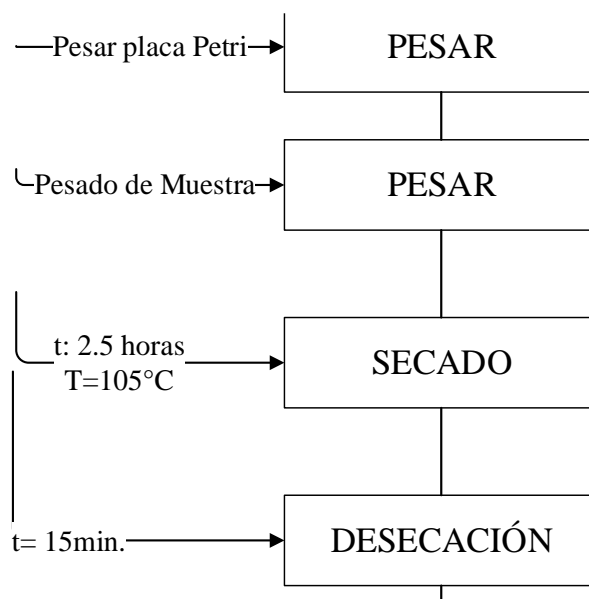
- ❖ Pesar las placas vacías en la balanza analítica.
- ❖ Pesar 10 g de muestra
- ❖ Llevar a la estufa a 105°C hasta peso constante.
- ❖ Una vez pasado el tiempo establecido, someterlo a temperatura Ambiente en un desecador por 15 minutos.
- ❖ Luego del reposo, pesar la muestra en placa
- ❖ Mediante la fórmula, calcular el % de humedad de la muestra.

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

Dónde:

- P1= Peso de la placa más muestra.
- P2= Peso de la placa más muestra seca
- m= Peso de la muestra.

Figura 25. Diagrama de Flujo de la Determinación de Humedad.



El análisis de determinación de humedad se realizó por triplicado y los pesos son registrados en la siguiente Tabla:

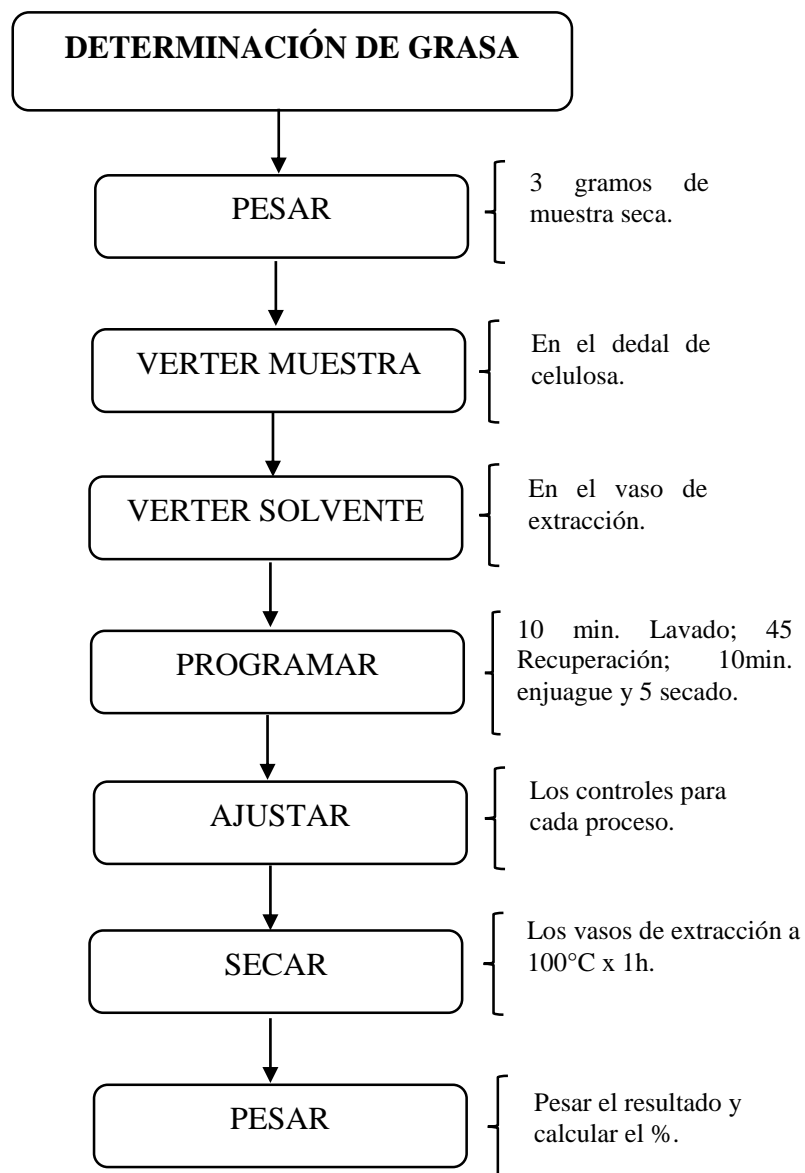
Tabla 30. Determinación de humedad en ambos extractos

Extracto	Muestra	Porcentaje de humedad (%)	Promedio de humedad (%)
Alcachofa	1	83.54	83.19
	2	84.12	
	3	81.92	
Espárrago	1	92.92	93.69
	2	95.42	
	3	92.72	

ANEXO 4

Determinación del porcentaje de grasas

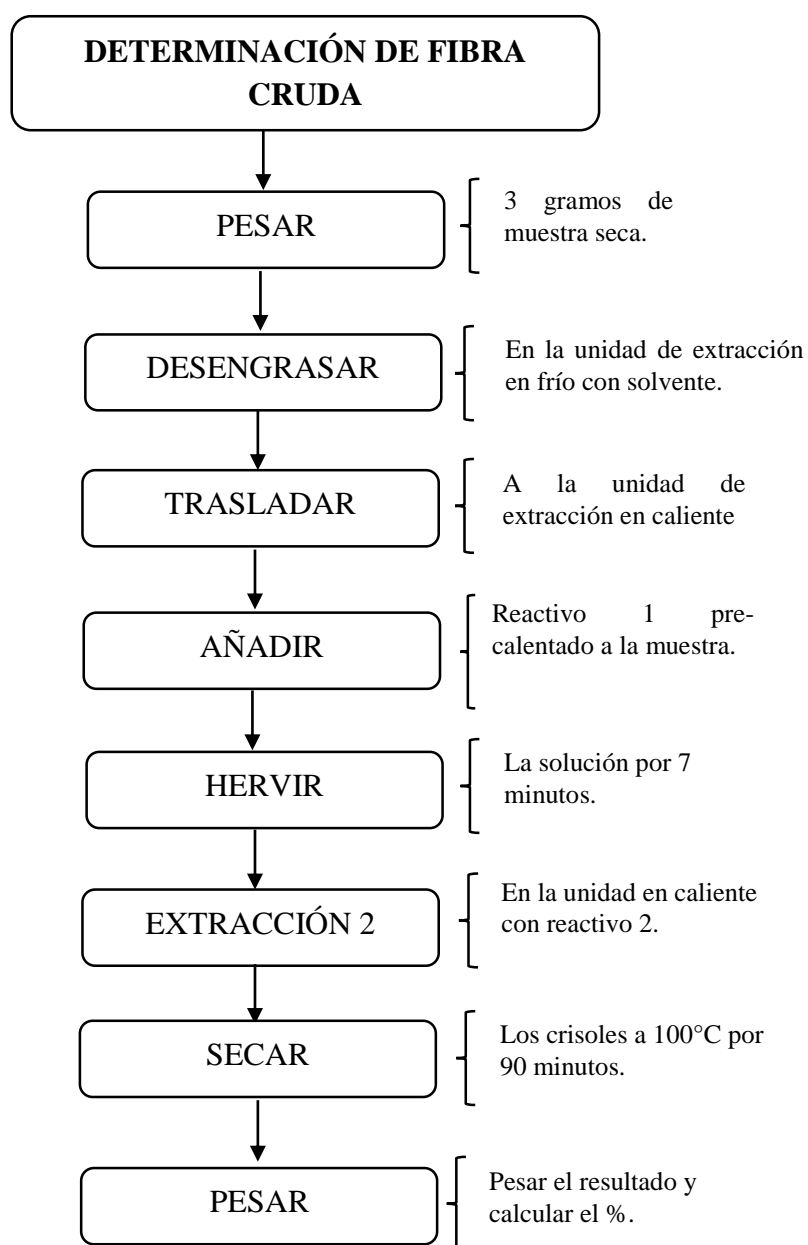
Figura 26. Diagrama de flujo para determinación de grasa por método Soxhlet.



ANEXO 5

Determinación del porcentaje de fibra cruda

Figura 27. Diagrama de flujo para determinación de fibra cruda por método Weende.



ANEXO 6

Determinación de cenizas

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

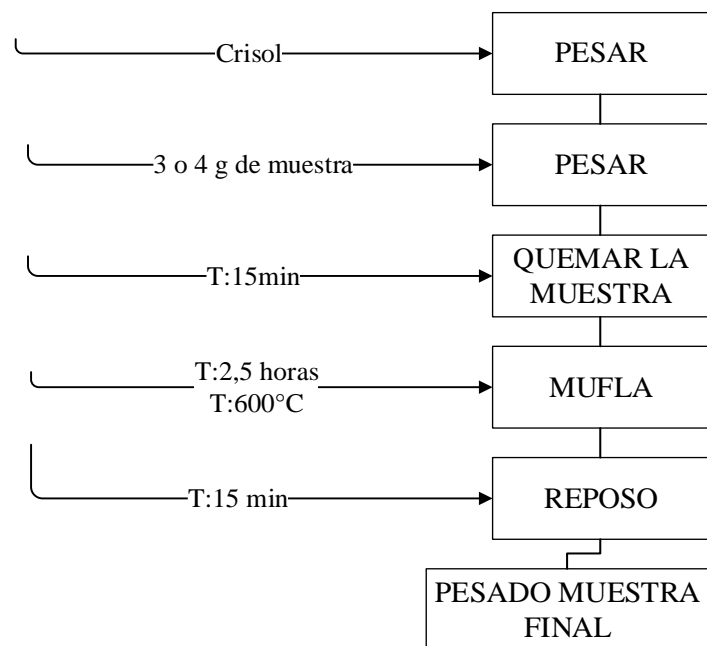
- ❖ Pesar el crisol vacío en la balanza analítica.
- ❖ Agregar 3 ó 4 gramos de muestra.
- ❖ Quemar previamente la muestra en la cocina eléctrica, para evitar la expansión de malos olores y el manchado de la mufla por unos 15 minutos.
- ❖ Llevar la muestra a la mufla por un lapso de 2.5 horas a 600°C.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

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

Dónde:

- P1= Peso del crisol más las cenizas
- P0= Peso del crisol
- P= Peso inicial de la porción de muestra
- H= Humedad de la muestra (%)

Figura 28. Diagrama de flujo para determinación de Cenizas.



ANEXO 7

Determinación de proteínas por el método de Bradford

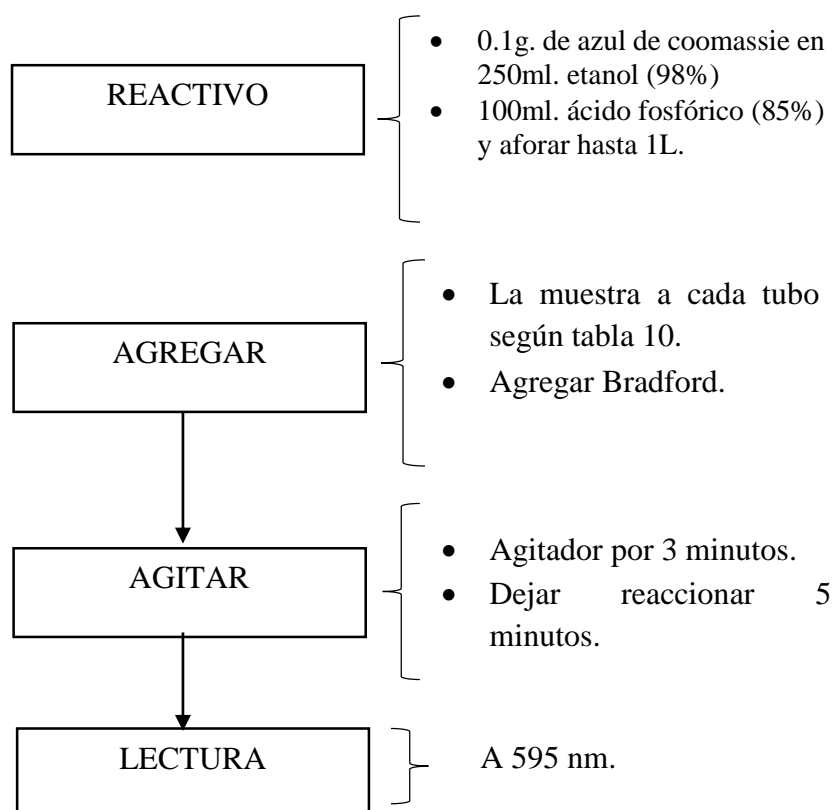


Tabla 31 . *Detalle de técnica para curva de calibrado Bradford*

Nº	Muestra (ul)	Albúmina (ul)	Tampón citrato (ul)	Bradford (ml)	Concentración (g/L)	Abs (540nm)
1	100	100.0	0	5	0.5	
2	100	80	20	5	0.4	
3	100	60	40	5	0.3	
4	100	50	50	5	0.25	
5	100	40	60	5	0.2	
6	100	20	80	5	0.1	
7	100	10.0	90	5	0.05	
8	100	0	100	5	0	

ANEXO 8

Preparación de Soluciones Estándar y Mezclas de Soluciones Estándar

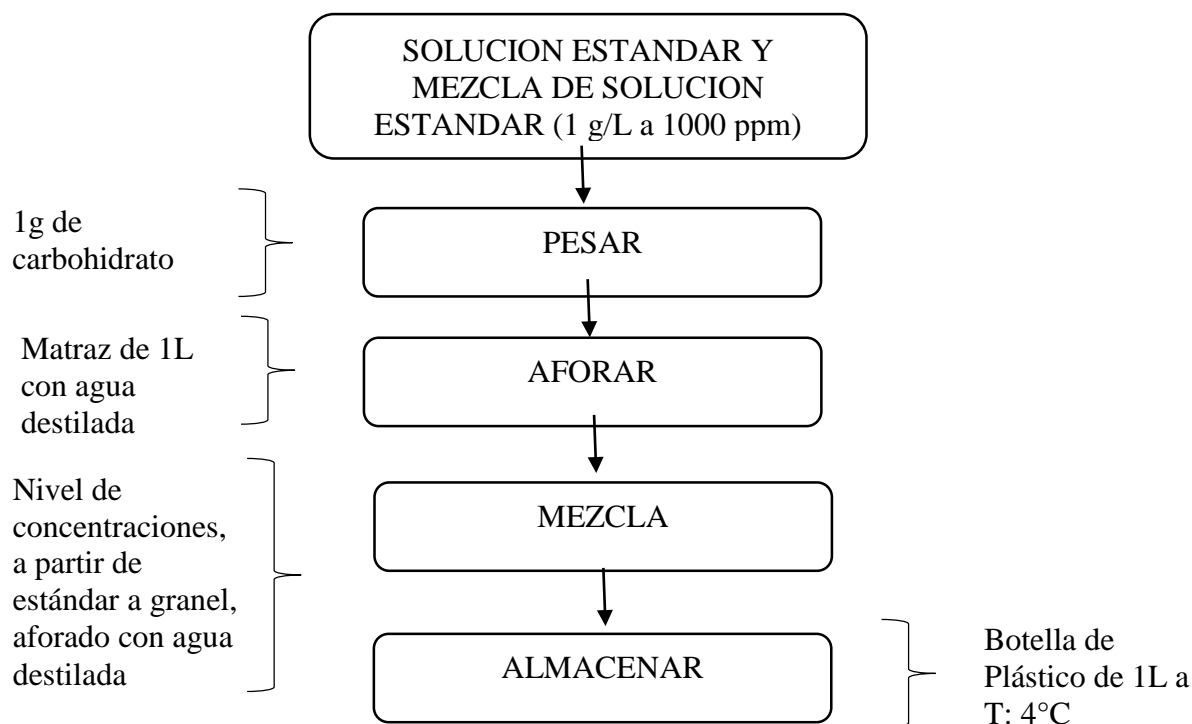


Figura 29. Preparación de Soluciones Estándar y Mezclas de Soluciones Estándar

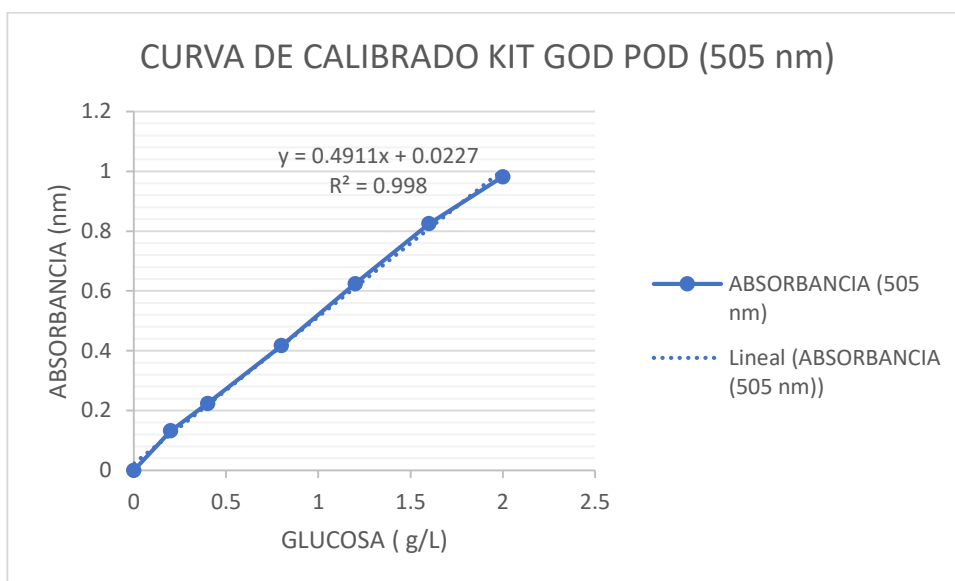
ANEXO 9

Curva de KID GOD POD DE GLUCOSA

Tabla 32 . Curva de KID GOD POD DE GLUCOSA

	N°	SOL. STD	AGUA	GLUCOSA	ABS (505 nm)
	1	500	0	2	0.982
	2	400	100	1.6	0.825
	3	300	200	1.2	0.624
	4	200	300	0.8	0.417
	5	100	400	0.4	0.224
	6	50	450	0.2	0.132
BLANCO	7	0	500	0	0

Figura 30. Curva de calibrado KIT GOD POD a 505nm.



ANEXO 10

CURVA DE CALIBRADO DE DNS

Figura 31. *Curva de calibrado DNS*

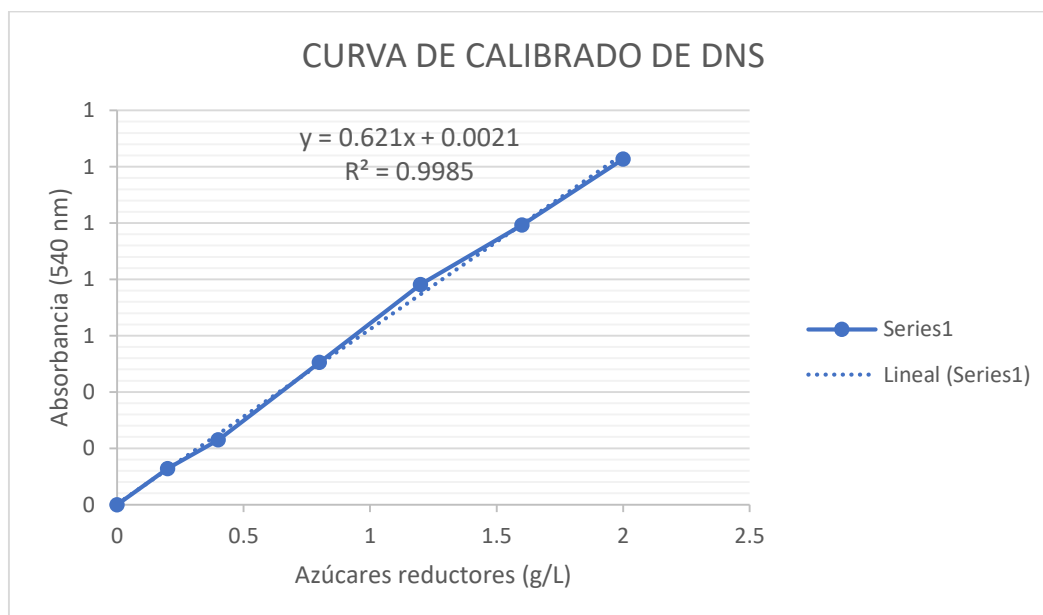


Figura 32. *Preparación del medio de fermentación*



Figura 33. *Preparación del medio de fermentación*



Figura 34. *Medio de fermentación en shaker*

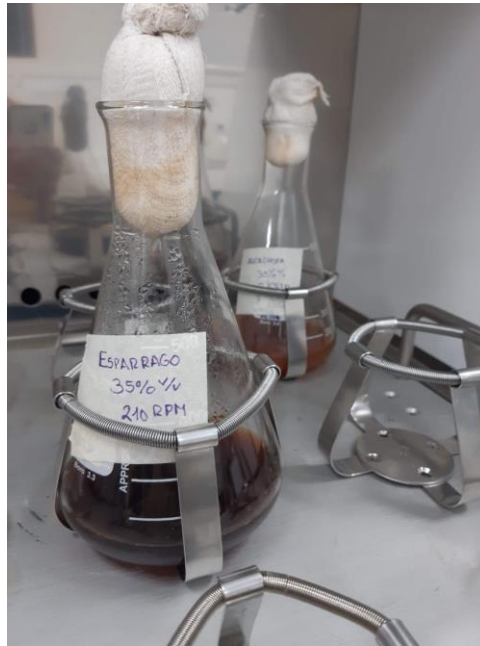
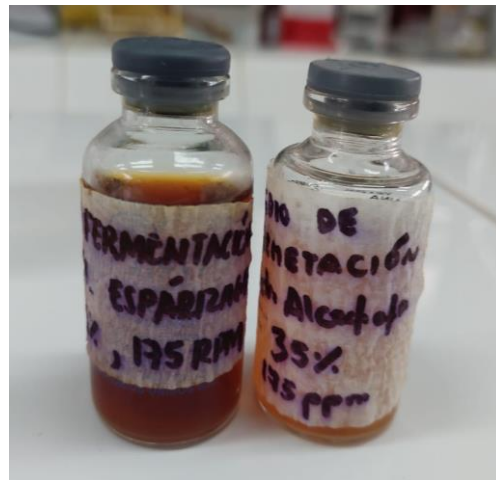


Figura 35 . Medio de fermentación luego de 30 horas.



ANEXO 11

Determinación de valores de Parámetros Cinéticos Km y Vmax, en la fermentación de *kluveromyces marxianus*, para Producción de la Enzima Inulinasa

1. Determinación de parámetros cinéticos Km y Vmax, en la fermentación de *kluveromyces marxianus*, por extracto de Espárrago para Producción de la Enzima Inulinasa, con respecto a la Inulina.

Ecuación de Michaelis-Menten

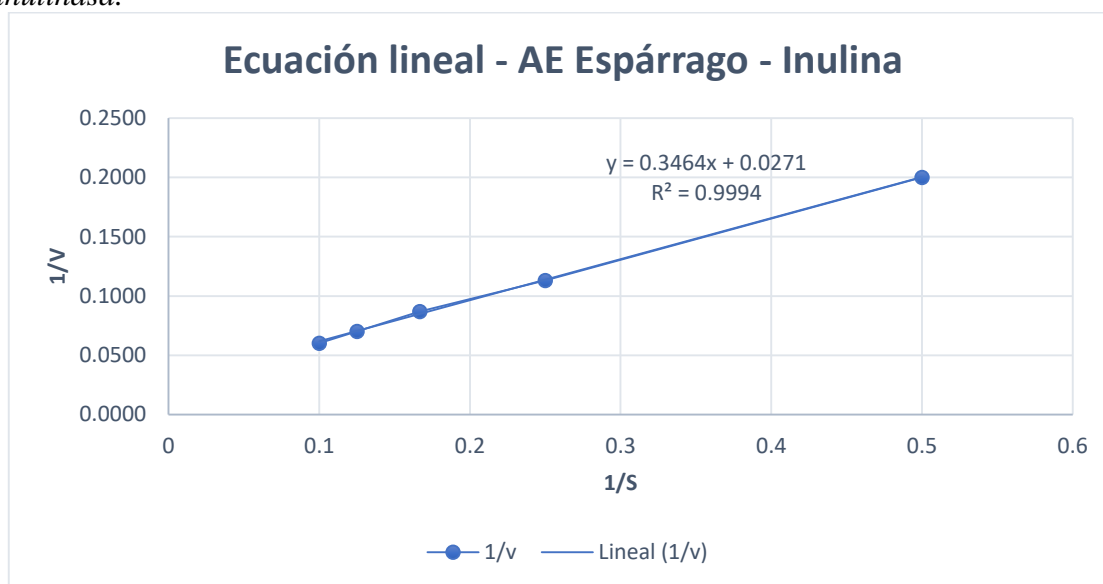
$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max}} \left(\frac{1}{S} \right) + \frac{1}{V_{max}}$$

Tabla 33. Parámetros cinéticos Km y Vmax ajustados al modelo de Lineweaver-Burk.

Ensayo	S(g/L)	1/S	Vmax (UI/mL)	1/v
1	2	0.5	4.997	0.2001
2	4	0.25	8.834	0.1132
3	6	0.167	11.490	0.0870
4	8	0.125	14.244	0.0702
5	10	0.1	16.571	0.0603

Nota. Fermentación de *kluveromyces marxianus*, por extracto de Espárrago para Producción de la Enzima Inulinasa, con respecto a la Inulina.

Figura 36. Gráfica de Lineweaver-Burk obtenida para la producción de enzima inulinasa.



Nota. Fermentación de *kluveromyces marxianus*, por extracto de Espárrago para producción de la enzima inulinasa, con respecto a la Inulina.

Con la ecuación lineal que se obtiene del modelo ajustado de Lineweaver-Burk, se calcula K_m y V_{max} :

$$y = 0,3464 x + 0,0271$$

$$\frac{1}{V_{max}} = 0,0271$$

$$v_{max} = 36.90 \text{ UI/ml}$$

$$\frac{K_m}{V_{max}} = 0,3464$$

$$K_m = 12.782$$

$$\frac{K_m}{36.90} = 0,3464$$

$$K_m = 12.782 \text{ g/L}$$

2. Determinación de parámetros cinéticos K_m y V_{max} , en la fermentación de *kluveromyces marxianus*, por extracto de espárrago para producción de la enzima inulinasa, con respecto a la sacarosa.

Ecuación de Michaelis-Menten

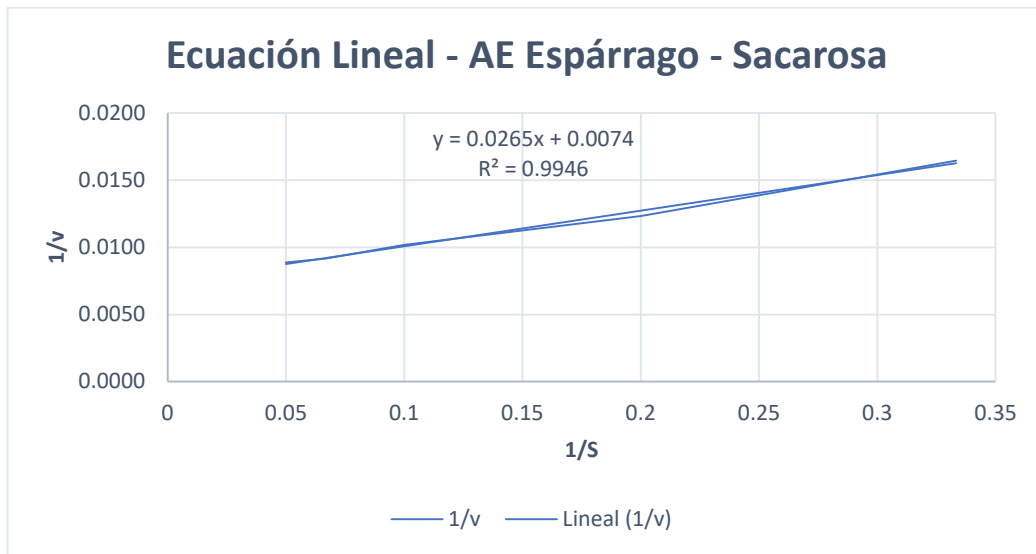
$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max}} \left(\frac{1}{S} \right) + \frac{1}{V_{maz}}$$

Tabla 34. Parámetros cinéticos K_m y V_{max} ajustados al modelo de Lineweaver-Burk.

Ensayo	S(g/L)	1/S	V (UI/mL)	1/v
1	3	0.33333333	60.774	0.0165
2	5	0.2	81.039	0.0123
3	10	0.100	98.155	0.0102
4	15	0.06666667	109.075	0.0092
5	20	0.05	112.783	0.0089

Nota. Fermentación de *Kluveromyces Marxianus*, por extracto de Espárrago para Producción de la Enzima Inulinasa, con respecto a la Sacarosa.

Figura 37. Gráfica de Lineweaver-Burk obtenida para la producción de enzima inulinasa.



Nota. Fermentación de *kluveromyces marxianus*, por extracto de espárrago para producción de la enzima inulinasa, con respecto a la sacarosa.

Con la ecuación lineal que se obtiene del modelo ajustado de Lineweaver-Burk, se calcula K_m y V_{max} :

$$y = 0,0265 x + 0,0074$$

$$\frac{1}{V_{max}} = 0,0074$$

$$v_{max} = 135.135 \text{ UI/ml}$$

$$\frac{K_m}{V_{max}} = 0.0265$$

$$\frac{K_m}{135.135} = 0,0265$$

$$K_m = 3.58 \text{ g/L}$$

3. Determinación de parámetros cinéticos K_m y V_{max} , en la fermentación de *kluveromyces marxianus*, por extracto de alcachofa para producción de la enzima inulinasa, con respecto a la inulina.

Ecuación de Michaelis-Menten

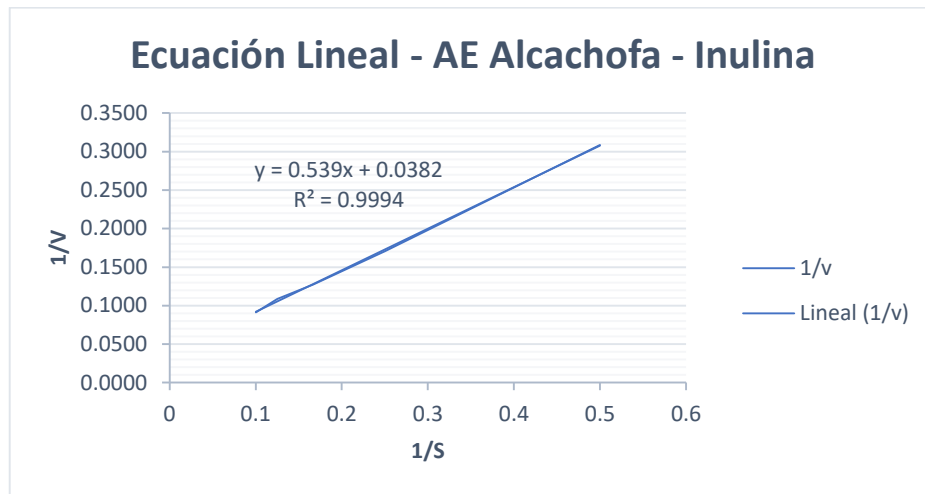
$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max}} \left(\frac{1}{S} \right) + \frac{1}{V_{max}}$$

Tabla 35. Parámetros cinéticos K_m y V_{max} ajustados al modelo de Lineweaver-Burk.

Ensayo	S(g/L)	1/S	v (UI/mL)	1/v
1	2	0.5	3.240	0.3086
2	4	0.25	5.867	0.1704
3	6	0.167	7.844	0.1275
4	8	0.125	9.202	0.1087
5	10	0.1	10.948	0.0913

Nota. Fermentación de *kluveromyces marxianus*, por extracto de alcachofa para producción de la enzima inulinasa, con respecto a la inulina.

Figura 38. Gráfica de Lineweaver-Burk obtenida para la producción de enzima inulinasa.



Nota. Fermentación de *kluveromyces marxianus*, por extracto de alcachofa para producción de la enzima inulinasa, con respecto a la inulina.

Con la ecuación lineal que se obtiene del modelo ajustado de Lineweaver-Burk, se calcula K_m y V_{max} :

$$y = 0,539x + 0,0382$$

$$\frac{1}{V_{max}} = 0.0382$$

$$v_{max} = 26.17 \text{ UI/ml}$$

$$\frac{K_m}{V_{max}} = 0,539$$

$$\frac{K_m}{26.17} = 0,539$$

$$K_m = 14.109$$

4. Determinación de parámetros cinéticos K_m y V_{max} , en la fermentación de *kluveromyces marxianus*, por extracto de alcachofa para producción de la enzima inulinasa, con respecto a la sacarosa.

Ecuación de Michaelis-Menten

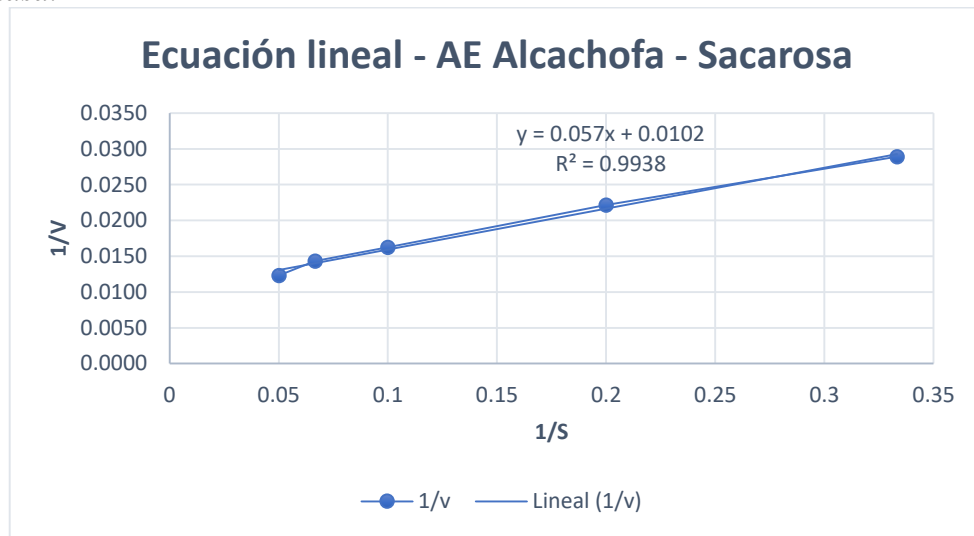
$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max}} \left(\frac{1}{S} \right) + \frac{1}{V_{maz}}$$

Tabla 36. Parámetros cinéticos K_m y V_{max} ajustados al modelo de Lineweaver-Burk.

Ensayo	S(g/L)	1/S	v(g/Lxmin) (UI/mL)	1/v
1	3	0.33333333	34.576	0.0289
2	5	0.2	45.141	0.0222
3	10	0.100	61.549	0.0162
4	15	0.06666667	69.694	0.0143
5	20	0.05	81.049	0.0123

Nota. Fermentación de *kluveromyces marxianus*, por extracto de alcachofa para producción de la enzima inulinasa, con respecto a la sacarosa.

Figura 39. Gráfica de Lineweaver-Burk obtenida para la producción de enzima inulinasa.



Nota. Fermentación de *kluveromyces marxianus*, por extracto de alcachofa para producción de la enzima inulinasa, con respecto a la sacarosa.

Con la ecuación lineal que se obtiene del modelo ajustado de Lineweaver-Burk, se calcula K_m y V_{max} :

$$y = 0,0578 x + 0,0102$$

$$\frac{1}{V_{max}} = 0,0102$$

$$v_{max} = 98.03 \text{ UI/ml}$$

$$\frac{K_m}{V_{max}} = 0,0578$$

$$\frac{K_m}{98.03} = 0,0578$$

$$K_m = 5.66 \text{ g/L}$$

TESIS AGROINDUSTRIAL- KATHERINE-MISHEL

por Katherine Yupanqui

Fecha de entrega: 17-may-2023 10:57p.m. (UTC-0500)

Identificador de la entrega: 2095955271

Nombre del archivo: Tesis_17.05.23_turnitin.pdf (1.32M)

Total de palabras: 15455

Total de caracteres: 76323

TESIS AGROINDUSTRIAL-KATHERINE-MISHEL

INFORME DE ORIGINALIDAD

12%

INDICE DE SIMILITUD

12%

FUENTES DE INTERNET

3%

PUBLICACIONES

1%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	intranet.cip.org.pe Fuente de Internet	4%
2	repositorio.uns.edu.pe Fuente de Internet	4%
3	www.uel.br Fuente de Internet	1%
4	sites.google.com Fuente de Internet	1%
5	digital.csic.es Fuente de Internet	1%
6	docplayer.es Fuente de Internet	<1%
7	Submitted to Universidad San Ignacio de Loyola Trabajo del estudiante	<1%
8	www.coursehero.com Fuente de Internet	<1%
9	es.scribd.com Fuente de Internet	

<1 %

10

scielo.conicyt.cl

Fuente de Internet

<1 %

11

ri.ufs.br

Fuente de Internet

<1 %

12

www.researchgate.net

Fuente de Internet

<1 %

13

www.revistas.unitru.edu.pe

Fuente de Internet

<1 %

14

Submitted to Universidad Nacional del Santa

Trabajo del estudiante

<1 %

15

saber.ucv.ve

Fuente de Internet

<1 %

16

Angela Periche Santamaría. "STEVIA Y OTROS EDULCORANTES SALUDABLES EN LA FORMULACION DE GOLOSINAS FUNCIONALES: IMPLICACIONES TECNOLÓGICAS Y DE CALIDAD", Universitat Politecnica de Valencia, 2014

Publicación

<1 %

17

F. Chenlo, R. Moreira, M. D. Torres, J. Ferra. "DESHIDRATACIÓN OSMÓTICA DE CASTAÑA EN MEDIOS ESTÁTICOS Y DINÁMICOS DE SAL, SACAROSA Y GLUCOSA OSMOTIC DEHYDRATION OF CHESTNUT USING STATIC

<1 %

AND DYNAMIC MEDIA OF SALT, SUCROSE
AND GLUCOSE", Ciencia y Tecnologia
Alimentaria, 2008

Publicación

18

repositorio.uss.edu.pe

Fuente de Internet

<1 %

19

"Proceedings of the International Conference
of Sustainable Production and Use of Cement
and Concrete", Springer Science and Business
Media LLC, 2020

Publicación

<1 %

20

Morelos López Mariana. "Inmovilización y
caracterización de la inulinasa 960 de
novozyme como biocatalizador para la
hidrólisis inulina", TESIUNAM, 2020

Publicación

<1 %

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias < 15 words

Excluir bibliografía

Apagado