



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE ENZIMAS GLICOSIDASAS TIPO INULINASA DE *Lactobacillus casei* UTILIZANDO RESIDUOS AGROINDUSTRIALES

Autor

Ricardo Javier Panchano Jara

Año
2018



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO PARA LA
PRODUCCIÓN DE ENZIMAS GLICOSIDASAS TIPO INULINASA
DE *Lactobacillus casei* UTILIZANDO RESIDUOS AGROINDUSTRIALES

Trabajo De Titulación presentado en conformidad con los requisitos
establecidos para optar por el título de Ingeniero en Biotecnología

Profesor Guía

MSc. María Alejandra Cruz Salazar

Autor

Ricardo Javier Panchano Jara

Año

2018

DECLARACIÓN DEL DOCENTE GUÍA

“Declaro haber dirigido el trabajo, Optimización de las condiciones de cultivo para la producción de enzimas glicosidasas tipo inulinasa de *Lactobacillus casei* utilizando residuos agroindustriales, a través de reuniones periódicas con el estudiante Ricardo Javier Panchano Jara, en el semestre 2018-2, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y cumpliendo a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”

María Alejandra Cruz Salazar
Máster en Ingeniería en Bioprocesos y Biotecnología
CI: 1719928572

DECLARACIÓN DEL DOCENTE CORRECTOR

Declaro haber revisado este trabajo, Optimización de las condiciones de cultivo para la producción de enzimas glicosidasas tipo inulinasa de *Lactobacillus casei* utilizando residuos agroindustriales, de Ricardo Javier Panchano Jara en el semestre 2018-2, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación

Wilson David Tapia López
MSc. En Gestión y Planificación Ambiental
CI: 1714205281

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se representaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.”

Ricardo Javier Panchano Jara
CI: 1722902606

AGRADECIMIENTOS:

Agradezco a mis padres y a mi hermana, mi motivación de cada día. Por su apoyo incondicional a lo largo de toda mi carrera universitaria. Gracias a ustedes me he convertido en la persona que soy ahora.

A MSc. Alejandra Cruz por orientarme, y confiar en mis habilidades profesionales a lo largo de todo este tiempo.

A Alexis Guerra y Mishell Monsalve Por su apoyo incondicional y por formar parte no solo de este proyecto de titulación sino de mi vida, por los consejos y su apoyo.

A Universidad de las Américas por abrirme las puertas para formarme como profesional

DEDICATORIA

A mis padres Ricardo Panchano y María Elena Jara y a mi hermana Sofía Panchano, por brindarme todo su amor y el apoyo incondicional en cada momento de mi vida.

RESUMEN

La inulina es un polisacárido tipo fructano presente en diversas especies vegetales. En la última década ha sido usada comúnmente en alimentos procesados, como sustituto de grasas o azúcares, debido al aporte del 25-35% de energía en comparación con otros carbohidratos que son digeribles completamente. Uno de los microorganismos más utilizados para obtener inulinasa son los *Lactobacillus*. El objetivo de este estudio fue optimizar las condiciones de cultivo para la producción de enzimas glicosidasas, tipo inulinasa a partir de *Lactobacillus casei* mediante el empleo de residuos agroindustriales, específicamente residuos de espárragos. La cepa utilizada fue *Lactobacillus casei* ATCC 334 para lo cual se inició con la conservación de la cepa, se preparó el sustrato alternativo (solución de residuos de espárragos suplementada), se determinó biomasa y parámetros cinéticos. Posteriormente mediante un diseño central compuesto se procedió a optimizar la producción de enzima inulinasa variando la concentración de la fuente de carbono (solución de residuos de espárragos) y nitrógeno (nitrato de amonio). Se obtuvo como resultado que las concentraciones óptimas de carbono y nitrógeno fueron de 20% v/v y 1,8 g L⁻¹, respectivamente; generando una producción de enzima inulinasa de 3,35 U mL⁻¹. Finalmente, los parámetros cinéticos dieron como resultado un Km de 30,98 mol L⁻¹ y Vmax de 1,55 U mL⁻¹

Palabras clave: *Lactobacillus casei*, optimización, residuo de espárragos, inulinasa, cinética enzimática.

ABSTRACT

Inulin is a fructose polysaccharide present in several vegetable plants, in the last decade, used in processed products, as a substitute for fats or sugars, due to the content of 25-35% of energy compared to other carbohydrates that are completely digestible. One of the microorganisms most used to obtain inulinase are the *Lactobacillus*. The objective of this study was to optimize the culture conditions for the production of glycosidase enzymes, inulinase type from *Lactobacillus casei* through the use of agroindustrial waste, as well as asparagus waste. The strain used was *Lactobacillus casei* ATCC 334 for which it was started with the conservation of the strain, the alternative substrate was prepared, the biomass and the kinetic parameters were determined. Subsequently, by means of a central composite design, the production of the inulin enzyme was optimized by varying the concentration of the carbon (solution of asparagus waste) and nitrogen source (ammonium nitrate). Positive results of 20% v / v and 1,8 g L⁻¹ were obtained, respectively; generating an inulinase enzyme production of 3,35 U mL⁻¹. Finally, the kinetic parameters resulted in a Km of 30,98 mol L⁻¹ and Vmax of 1,55U mL⁻¹.

Key words: *Lactobacillus casei*, optimization, asparagus residue, inulinase, enzymatic kinetics.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Antecedentes.....	1
1.2 Planteamiento del problema	3
1.3 Justificación de la investigación	4
1.4 Objetivos.....	5
1.4.1 Objetivo general:.....	5
1.4.2 Objetivos específicos:.....	6
2. MARCO TEÓRICO	6
2.1 Descripción de la especie <i>Lactobacillus casei</i>	6
2.1.1 Importancia de la bacteria <i>Lactobacillus casei</i>	7
2.2 Inulinasas	9
2.2.1 Generalidades de las enzimas inulinasas.....	9
2.2.2 Aplicaciones industriales de la enzima inulinaasa	10
2.2.3 Producción de enzimas inulinasas en bacterias	12
2.3 Optimización de Bioprocesos de producción de inulinasas	12
2.3.1 Parámetros y condiciones de cultivo	12
2.3.2 Cuantificación enzimática y medición de parámetros cinéticos	14
3. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL	15
3.1 Diagrama de flujo	15
4. PROCEDIMIENTOS	16
4.2 Materiales y métodos para la obtención de datos	16
4.2.1 Elaboración de medio de cultivo alternativo	16
4.2.2 Purificación de la bacteria <i>Lactobacillus casei</i>	16
4.2.3 Preparación del sustrato alternativo (Solución de residuos de espárragos)	17
4.2.4 Determinación de biomasa	17
4.2.5 Método peso seco	17
4.2.6 Método de absorbancia	17
4.2.7 Curva de calibrado de biomasa	18
4.2.8 Pre ensayo de crecimiento con el sustrato alternativo (solución de residuos de espárragos al 20%)	18

4.2.9	Curva de crecimiento de biomasa en medio óptimo	18
4.2.10	Consumo de sustrato.....	19
4.2.11	Parámetros cinéticos de <i>Lactobacillus casei</i>	20
4.2.12	Curva de calibrado.....	21
4.2.13	Actividad enzimática	21
4.2.14	Determinación de proteínas totales	22
4.2.15	Cálculo de parámetros cinéticos de la inulinasa Km y Vmax.....	23
4.2.16	Cinética de formación de producto	23
4.3	Evaluación estadística de los resultados	24
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
5.1	Purificación de la bacteria <i>Lactobacillus casei</i>	25
5.2	Determinación de biomasa.....	26
5.2.1	Curva de calibrado de biomasa	26
5.2.2	Pre-ensayo de crecimiento de biomasa en sustrato alternativo .	27
5.2.3	Curva de crecimiento de biomasa utilizando las condiciones de operación optimizadas	28
5.2.4	Parámetros cinéticos de <i>Lactobacillus casei</i>	30
5.2.5	Consumo de sustrato.....	31
5.2.6	Actividad enzimática	33
5.2.6.1	Efecto de diversos porcentajes de carbono en la producción de inulinasa por <i>L. casei</i>	33
5.2.7	Determinación de proteínas totales	35
5.2.8	Producción de proteínas totales en función del tiempo	35
5.2.9	Determinación de parámetros cinéticos de <i>Lactobacillus</i> <i>casei</i> : Km y Vmax	36
5.3	Optimización de la producción de inulinasa	38
5.3.1	Diseño central compuesto	38
5.3.2	Gráfico de superficie y respuesta	39
6.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	44
6.1	Conclusiones	44
6.2	Recomendaciones.....	44
	REFERENCIAS	45

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

La industria agrícola es una de las fuentes más importantes de producción de residuos, produciendo cantidades enormes de desechos por año (Saucedo, 2017), y que en la actualidad son usados como una fuente importante para la producción de enzimas, capaces de degradar azúcares como la inulina, conocidas como inulinasas. Las inulinasas se pueden dividir en: exoinulinasas (EC 3.2.1.80) que son capaces de catalizar la remoción de unidades de fructosa de principio a fin de la cadena con la hidrólisis del residuo de sacarosa; y las endoinulinasas (EC 3.2.1.7) catalizan la hidrólisis de los enlaces de las moléculas de inulina, dando como resultado inulotriosa, inulotetrosa e inulopentosa los cuales no presentan actividad invertasa, para hidrolizar residuos de sacarosa (Calderón y Maggi, 2010).

Es una enzima utilizada para procesar polifruktanos en jarabes de fructosa-glucosa, los cuales actúan como aditivos dietéticos para producir etanol (Aruna y Hati, 2014) de la misma manera las inulinasas se pueden usar como edulcorantes (Baston y Neagu, 2013). La inulina es una enzima que rompe los enlaces 1-2 de oligosacáridos de cadena larga (en especial fructooligosacáridos), dando lugar a la degradación de moléculas para la correcta absorción de azúcar por parte de las células; dicha función la cumplen únicamente las bacterias ácido-lácticas con actividad prebiótica (Nascimento, 2012).

A estas enzimas se las puede encontrar en varias especies vegetales y frutas, también, se obtienen de diferentes microorganismos como hongos, levaduras, bacterias y actinomicetos. Uno de los microorganismos más utilizados para la obtención de inulina son las bacterias pertenecientes al género *Lactobacillus*, en su mayoría cepas bacterianas de *Lactobacillus* spp. (Campos, Roa, Mosqueda, Cruz y Claudia, n.d.). Han sido estudiadas como prebióticos en

productos alimenticios y medicinales debido a estudios realizados *in vitro* (Douillard, 2013). El uso de microorganismos para la obtención de productos de interés se ha ido incrementando en los últimos años, ya que presentan ventajas como la producción de enzimas en menor tiempo y mayor cantidad de producto. Otra de las ventajas es que, con el uso de microorganismos, se puede utilizar materias primas naturales, como desechos, o fuentes que no sean reutilizadas, ayudando así al medio ambiente

En el estudio realizado en el año 2012 por Smetanková y colaboradores se investigaron tres cepas silvestres de *Lactobacillus* por su crecimiento y capacidad para producir ácido láctico, ácido acético y etanol en condiciones aeróbicas y anaeróbicas, para ello se probó tres temperaturas diferentes (30, 37 y 45°C). El crecimiento se estudió midiendo la densidad óptica y el valor de pH, dando como resultado que el rendimiento celular final en condiciones aeróbicas fue mayor. Además la formación de ácido láctico (como el principal metabolito) fue más lento durante el cultivo a 30°C, las tres cepas mostraron una buena capacidad para crecer en cultivo en las tres temperaturas analizadas en condiciones aeróbicas. Para las temperaturas de 37 y 45°C, la fase de crecimiento exponencial se observó entre las 2 y 8 horas y a 30°C. En general, estas cepas de lactobacilos crecieron más rápido en condiciones aeróbicas (Smetanková, 2012).

En el estudio realizado por Shahravy y colaboradores en el año 2012, en donde, el objetivo del estudio fue optimizar las condiciones de cultivo para una producción económica de *Lactobacillus casei* ATCC 334 como probiótico utilizando como fuente de carbono el polvo proveniente de la palma, donde se evaluó el efecto de once factores sobre el crecimiento bacteriano, y se encontró tres factores que incluyen como los parámetros más significativos (polvo de palma, triptona y la velocidad de agitación). Las condiciones óptimas incluyen la concentración de polvo de palma (38 g L⁻¹), concentración de triptona (30 g L⁻¹); y se determinó una velocidad de agitación de 320 rpm y que el pH óptimo para su crecimiento es de 6,9 (Shahravy, Tabandeh, Bambai, Zamanizadeh, y Mizani, 2012).

Adicionalmente, en el estudio realizado por Jurado Gámez y colaboradores en el año 2014 cuya finalidad fue valorar los parámetros cinéticos óptimos para la fermentación de *Lactobacillus casei* en dos medios probióticos (MRS y Pro). Para esto se evaluó en cada medio el valor máximo de crecimiento en relación a la producción de biomasa, el número de microorganismos viables en placa (UFC mL⁻¹), pH, cantidad total de azúcares que consume (mg L⁻¹) y producción de ácido láctico (%). Se obtuvo como resultado que el crecimiento en la fase exponencial (UFC mL⁻¹) al tiempo 7 fue de 3x10¹¹ UFC mL⁻¹, con una concentración de proteínas de 46,95 g L⁻¹, mientras que en el tiempo 6 se obtuvo un resultado de 7,3x10⁸ UFC mL⁻¹ y de 45,83 g L⁻¹ para crecimiento y concentración de proteínas, respectivamente. Mediante HPLC se determinó que las cepas de *L. casei* eran homofermentivas debido a que su producción de ácido láctico fue superior al 80%. Concluyendo que los valores encontrados en los dos medios revelan que son adecuados para la preparación de inóculos probióticos (Jurado Gámez, Calpa Yamá, y Chaspuengal Tulcán, 2014).

Por tal motivo en los últimos años las enzimas han sido aisladas a partir de microorganismos, permitiendo su producción a nivel industrial a la vez, de su aplicación en la industria alimenticia, teniendo como ventajas la producción a mayor escala en un tiempo corto y desarrollo de métodos que permiten que estos microorganismos produzcan enzimas similares a las que existen en plantas o animales (Shinde, 2015).

1.2 Planteamiento del problema

En la actualidad la producción de enzimas a partir de microorganismos se lleva a cabo mediante el uso de reactivos ultra puros, costosos y que no se producen en el Ecuador; es por este motivo que una gran cantidad de empresas en el exterior han implementado protocolos para producir enzimas de una manera más económica, a través de la reutilización de desechos orgánicos. En Ecuador, particularmente en la región sierra, existe una tasa del 53,81% de producción de desechos orgánicos por día, del cual un porcentaje muy pequeño es reutilizado (Cando, 2014). Cabe mencionar que los residuos orgánicos son generados de actividades urbanas, agropecuarias e industriales,

los cuales se relacionan directamente con el modelo productivo actual y simbolizan una de las formas vitales de deterioro del medio ambiente porque no existe un aprovechamiento adecuado y un reciclaje sistemático de los mismos. Es por esto que hace algunos años se inicia el desarrollo de métodos para manejar y transformar estos desechos con la finalidad no solo de disminuir el problema de contaminación ambiental, sino obtener productos útiles y necesarios para la nutrición tanto de humanos, animales y plantas (Acosta Durán, 2013). Además, no se llevan a cabo investigaciones que permitan establecer protocolos de producción de enzimas glicosidasas tipo inulinasas a escala de laboratorio e industrial, que puedan ser empleadas por las mismas empresas que producen dichos desechos. Para ello se ha optado por importar dichas enzimas, lo que genera un precio elevado y alarga el tiempo de desarrollo de los proyectos, reflejándose a largo plazo en el costo de los productos generados a partir de estas moléculas.

Por tal motivo, una de las alternativas que se ha evaluado para la producción de inulinasa a partir de microorganismos, ha sido el uso de *Lactobacillus casei*. Sin embargo, no existen estudios en los que se haya utilizado como sustrato residuos orgánicos de espárragos en el establecimiento de las condiciones adecuadas de crecimiento.

1.3 Justificación de la investigación

El estudio del comportamiento de los microorganismos como las bacterias permite conocer su desarrollo y su correlación con diferentes tipos de sustratos; generando proyecciones de investigación que se relacionan directamente con la nutrición y mejora de procesos fermentativos en áreas destinadas a la biotecnología de alimentos (Onyenweaku, 2016). Es así que, la producción enzimática es un proceso importante a nivel industrial, debido a que genera moléculas capaces de participar en las principales reacciones catabólicas que influyen en varias áreas productivas (Mejía, Chacón, Guerrero y Balmore, 2007).

Actualmente el uso y aprovechamiento de residuos agroindustriales para la elaboración de compuestos rentables o como insumos para procesos agrícolas, ganaderos e industriales, son una alternativa en la reducción del impacto ambiental que podrían generar dichos desechos. Los desechos agrícolas pueden convertirse en materia prima para distintos propósitos, debido a que posee compuestos lignocelulósicos con bajo costo y que pueden ser aprovechados para la producción de metabolitos de interés para diferentes industrias (Saucedo, 2017)

Sin dejar de lado que se debe plantear una opción eficaz y rentable para solucionar la problemática de la contaminación ambiental producida por residuos orgánicos. Para esto se ha planteado la alternativa de que dichos residuos sean empleados de manera adecuada y sostenible, partiendo de la reutilización de la materia orgánica que no es aprovechada en ciertos casos y que sin duda alguna se pueden extraer componentes útiles para la sociedad (Vargas, Torrescano y Sánchez., 2013).

Este trabajo de titulación tiene como finalidad optimizar las condiciones de cultivo de *Lactobacillus casei* para producir enzimas glicosidasas, tipo inulinasa mediante el empleo de residuos agroindustriales, promoviendo el uso de este tipo de residuos orgánicos (desechos de espárragos) como alternativa económica, eficaz y que a la vez pueda contribuir a la disminución de la contaminación ambiental; además de establecer las condiciones de cultivo adecuadas para que este proyecto pueda ser reproducible en el futuro a escala industrial y generar metabolitos de interés además de la inulina, productos que puedan ser aprovechados y comercializados.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general:

Optimizar las condiciones de cultivo, para la producción de enzimas glicosidasas, tipo inulinasa de *Lactobacillus casei* mediante el empleo de residuos agroindustriales.

1.4.2 Objetivos específicos:

- Optimizar las condiciones de cultivo de *Lactobacillus casei*, concentración de fuente de carbono (residuos de espárragos) y concentración de fuente de nitrógeno (nitrato de amonio) para obtención de inulinasa, mediante diseños estadísticos.
- Determinar los parámetros cinéticos y enzimáticos de la fermentación de *Lactobacillus casei*, a escala de laboratorio

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Descripción de la especie *Lactobacillus casei*.

Lactobacillus casei es una bacteria Gram positiva (Figura 1), sin motilidad, incapaces de formar esporas y que tienen un metabolismo rigurosamente fermentativo. Se presentan como bacilos largos y delgados hasta cortos y curvados, los cuales tienen forma de bastón y su tamaño varía entre 0,7 y 1,1 μm x 2,0 y 4,0 μm (Ramírez, 2011; Panesso, 2015). Estas bacterias en su mayoría están compuestas por especies homofermentativas, es decir, cuando un mol de glucosa es transformada en dos moles de ácido láctico; sin embargo, algunas son heterofermentativas, las cuales representan como resultado final la producción de un mol de ácido láctico, un mol de etanol y un mol de CO_2 por cada mol de glucosa fermentada (Cartes, 2005 y Panesso, 2015).

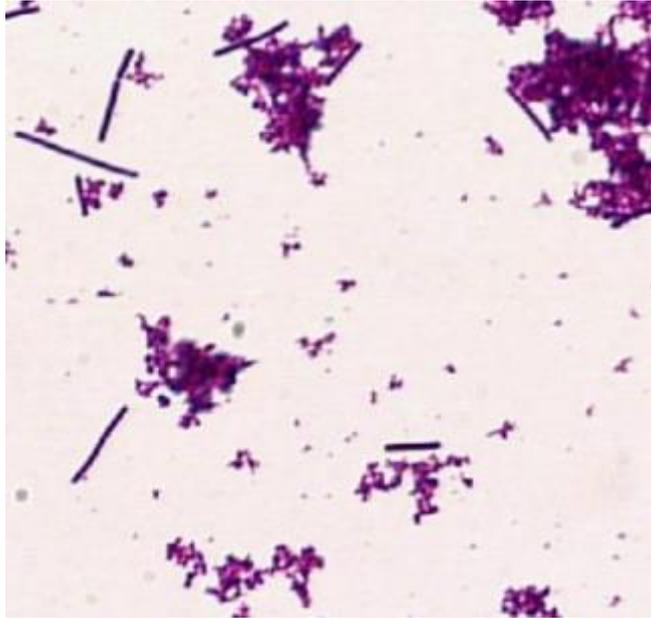


Figura 1. Tinción Gram de *L. casei*
Tomado de (Kamiya, 2011)

Principalmente se localizan en la leche y algunas cepas son usadas para la preparación de productos lácteos; también se los encuentra en la fermentación de vegetales, carne, boca e intestino humano y en el ambiente (Ramírez, Ulloa, Velázquez, Ulloa y Arce, 2011; Panesso, 2015).

De igual manera este microorganismo es usado en la industria láctea para la elaboración de prebióticos (Ramírez, 2011). Este tipo de bacterias son usadas para la fermentación de carbohidratos de manera eficiente junto con la fosforilación a nivel de sustrato, lo que quiere decir que, es un paso importante para la obtención de energía, debido a que no son capaces de producir la misma por medio de la actividad respiratoria. Por tal motivo este proceso se lleva a cabo mediante reacciones durante la glucólisis, logrando obtener energía en forma de ATP que será usada para realizar funciones específicas como el transporte de nutrientes (Hofvendahl y Hahn–Hägerdal, 2000).

2.1.1 Importancia de la bacteria *Lactobacillus casei*.

Las bacterias ácido-lácticas (BAL) son muy importantes en la industria de los alimentos porque permiten conservar y desarrollar características sensoriales como sabor, olor textura y aumentan su calidad nutritiva; gracias a esto se puede desarrollar todo tipo de alimentos capaces de satisfacer los requerimientos del consumidor. Esos microorganismos son usados como probióticos y esta aplicación ha animado el interés de científicos, quienes han demostrado los beneficios que tienen los probióticos para la salud como equilibrar la flora intestinal y regular el sistema inmunológico. Además de efectuar actividades inmunomoduladoras, antiinflamatorias y anticancerígenas (Ramírez, 2011; Tiptiri-Kourpeti, 2016). Por otro lado, las BAL presentan capacidad antagónica por la producción de ácidos orgánicos y metabolitos inhibidores y fácil reproducción en ambientes con azúcares fermentables como la inulina (Samaniego, 2010).

Lactobacillus casei ha sido utilizada mayoritariamente en la industria alimenticia y medicinal, siendo considerada como un microorganismo capaz de beneficiar la salud tanto de humanos como de animales (Douillard, 2013). Puede constituir parte de la estructura intrínseca de varios alimentos conocidos como funcionales, empleados en la manufactura alimentaria como sustitutos de azúcares, grasas e incluso pueden contribuir textura, estabilizar la formación de espuma, mejorar las cualidades sensoriales de productos lácteos fermentados, galletas, mermeladas, el pan y la leche (Lara, Lara, Julián, Pérez y Benítes, 2017).

Es así que, *L. casei* ha sido enormemente usada en la industria láctea para producir derivados lácteos como queso, yogurt y en la industria alimenticia en el procesamiento del chucrut, vegetales fermentados, carne, vinos y cerveza (Panesso, 2015).

Adicionalmente, poseen propiedades anticancerígenas cuando se produce una alteración de la microflora gastrointestinal y en el metabolismo del colon en donde, degrada los carcinógenos y produce antimutagénicos para mejorar la respuesta inmune del huésped (Tiptiri-Kourpeti, 2016).

Se han realizado estudios preclínicos en ratones para determinar la eficacia protectora y terapéutica frente a infecciones microbianas inducidas, en la cual se afirma que *L. casei* puede aumentar la capacidad de activación de macrófagos, lo que provoca el incremento de monocitos provenientes de la circulación hacia el sitio de la infección, dando como resultado el aumento de las funciones antimicrobianas y la disminución en la duración e incidencia de algunos procesos infecciosos (Cobo, Mateos, y Muñoz, 2006; Lujan, 2007).

2.2 Inulinasas

2.2.1 Generalidades de las enzimas inulinasas

Fue aislada por primera vez en 1804 por Rose, científico alemán, quien aisló “una sustancia peculiar de origen vegetal” como él lo llamó; a partir de *Inula helenium* que Thomson en 1818 la renombró como inulina. Sin embargo, en 1864 Julius Sachs, fisiólogo alemán de plantas fue el pionero en investigar los fructanos, además de detectar en tubérculos de *Dahlia*, *Heliantus tuberosus* e *Inula* los cristales esféricos de inulina (Lara, Lara, Julián, Pérez y Benítez, 2017). La inulinasa (E.C. 3.2.1.7) es una enzima que pertenece a la familia de las glicósido-hidrolasas, las cuales son capaces de catalizar la hidrólisis de inulina a fructosa. Además, tiene la capacidad de liberar fructosa y oligofructosa de la inulina, que es un polímero natural de almacenamiento de energía, unido por enlaces β (2-1) que se encuentran en algunas especies de plantas de la familia de las Asteraceae, como la alcachofa de Jerusalem, la achicoria, los espárragos (Johnson y Echavarri-Erasun, 2011).

Se clasifican en las exoinulasas, las cuales inician fragmentando la primera molécula de D-fructosa, continuando su recorrido hasta llegar a romper el último enlace que se encuentre dentro de la molécula de inulina, liberando una molécula de D-glucosa; mientras que las endoinulinasas realizan cortes internos en la molécula de inulina originando inulo-oligosacáridos, generando inulopentosa, inulotetrosa, inulotriosa, sin actividad invertasa para hidrolizar el

residuo de sacarosa (Calderón y Maggi, 2010). Esta propiedad de que la enzima sea exo o endo inulinasa depende del origen microbiano de la que se obtuvo la inulinasa (Tharun, Guttikonda, Vanitha y Anuradha, 2017).

Pueden obtenerse de diversas especies vegetales, además de microorganismos, los cuales se encuentran en la capacidad de producir la cantidad necesaria de inulinasa para ser usada en diversas áreas industriales (Calderón y Maggi, 2010). Entre los microorganismos productores de la enzima inulinasa se pueden citar a los hongos del género *Aspergillus*, *Rhizopus*, levaduras del género *Pichia*, *Kluyveromyces*, y bacterias del género *Lactobacillus* (Singh y Gill, 2006).

2.2.2 Aplicaciones industriales de la enzima inulinasa

Actualmente las enzimas que han sido producidas a partir de microorganismos son enormemente reconocidas a nivel mundial por su amplio uso en la industria química, agrícola, médica, farmacéutica, alimentaria y energética. Su importancia se debe a las características que presentan como la reducción del tiempo de los procesos, menor consumo de energía, además de ser ecológicas y no tóxicas. Existen factores que motivan a reducir el tiempo de los procesos en la industria, la conservación de recursos naturales y la seguridad ambiental (Singh, Kumar, Mittal y Kumar, 2016).

En la industria de los alimentos se han empleado microorganismos capaces de producir enzimas importantes para la nutrición de los seres vivos y en la última década la inulina ha sido usada comúnmente en alimentos procesados, como sustituto de grasas o azúcares, debido a que presenta un aporte de 25-35% de energía en comparación con otros carbohidratos que son digeribles por completo, pero solo cuenta con el 10% de dulzura en relación a la sacarosa (Shoaib, 2016).

Como función se ha encontrado que estimula el crecimiento de la microbiota intestinal a través de la producción de sacáridos inulocolisacáridos, porque en

su trayecto hacia el intestino delgado no es digerida (Lara, Gordillo, Pascual, Pérez y Benítez, 2017), y en el intestino la inulina puede ser metabolizada por microorganismos intestinales como el *L. casei* (Singh y Chauhan, 2017)..

Gracias a estas evidencias científicas, la inulina puede ser considerada un prebiótico y de acuerdo a investigaciones realizadas, los prebióticos de cadena corta como los fructooligosacáridos (FOS), tienen de 2 a 8 enlaces por molécula de sacárido, son fermentados más rápido en el lado derecho del colon alimentando a las bacterias de esa parte. Por el contrario, los prebióticos de cadena larga, como la inulina que tienen de 9 a 64 enlaces por molécula de sacárido, son fermentados de forma más lenta, alimentando a las bacterias del lado izquierdo del colon.

En la industria farmacéutica la inulina es empleada para fortalecer la microbiota intestinal y contribuye en la sustitución o complementación de la leche materna. Además, se usan sus derivados como material excipiente en tabletas, coadyuvantes en vacunas, los principales usos son como sustitutos no carcinogénicos e hipocalóricos de azúcares edulcorantes en donde se ven afectadas sus propiedades sensoriales aún en concentraciones tan altas como un 15% (Lara, 2017). Adicionalmente, son utilizadas para procesar polifruktanos en jarabe de fructosa- glucosa, el cual tiene un contenido de D-fructosa que supera el 75%, o para la producción de fructooligosacáridos los cuales son aditivos dietéticos para producir etanol (Aruna y Hati, 2014) además, son usados como edulcorantes (Baston y Neagu, 2013). La fructosa, que tiene el estado generalmente reconocido como seguro (GRAS), se conoce como un edulcorante alternativo seguro, que es importante por sus propiedades funcionales en lugar de su dulzura. Su demanda es cada vez mayor debido a que juega un papel beneficioso para pacientes diabéticos, disminuye la actividad cariogénica y la asistencia en la absorción de hierro (Montañez, Venegas, Vivar, y Ramos, 2011). El desarrollo de un nuevo método de obtención de jarabes de fructosa mediante la hidrólisis enzimática de la inulina empleando inulinasas, ha sido estudiado durante las tres últimas décadas con la finalidad de contribuir en el mejoramiento de la salud humana y

es que en niveles de administración bajos puede metabolizarse sin necesidad de insulina, resultanto favorable para pacientes con diabetes como se mencionó con anterioridad (Ros, Fernandes, y Jiang, 2013).

2.2.3 Producción de enzimas inulinasas en bacterias

Los microorganismos producen una amplia variedad de enzimas que son diferenciadas por sus mecanismos de regulación, lugar de síntesis (intra o extra celulares) y sus propiedades catalíticas. Una de las ventajas que presentan las bacterias para la producción de enzimas es su resistencia a elevadas temperaturas (Aruna y Hati, 2014).

Los niveles de obtención de inulinasas en bacterias no se comparan con los obtenidos en levaduras y hongos. Sin embargo, gracias a la capacidad que tienen muchas bacterias para sobrevivir a altas temperaturas, se han realizado intentos para aislar cepas bacterianas que pueden producir grandes cantidades de inulinasa térmicamente estable (Singh y Gill, 2006).

La producción de enzimas inulinasas en bacterias como *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus polymyxa*, bacterias ácido lácticas como *Lactobacillus casei*, se produce de forma extracelular en rangos óptimos de temperatura (50-70°C) y pH ácidos (5,5- 9) , a pesar de que estos parámetros varían de acuerdo a la cepa con la que se trabaje (Chi, Chii, Zhang, Liu y Yue, 2009; Singh y Pandey, 2009)

2.3 Optimización de Bioprocesos de producción de inulinasas

2.3.1 Parámetros y condiciones de cultivo

L. casei es cultivado en medio MRS que fue desarrollado por Man Rogosa y Sharpe el cual presenta una formulación que favorece el desarrollo de lactobacilos y demás bacterias ácido-lácticas. Es así que, el extracto de carne, glucosa, peptona y extracto de levadura son la fuente nutritiva que aporta minerales, vitaminas, nitrógeno y carbono mostrando así que las BAL son más

exigentes debido a la limitada capacidad de biosíntesis. El magnesio, manganeso, sales de sodio y el manoleato de sorbitán proveen cofactores para el crecimiento bacteriano, además de inhibir el desarrollo de otros microorganismos. El citrato de amonio actúa como agente inhibitorio del crecimiento de bacterias Gram negativas. La temperatura para su incubación debe ser de 35-37°C por un tiempo de 24-72 horas (Neogen, 2010).

El uso de diferentes fuentes de sustrato de origen orgánico como residuos de vegetales y lácteos, ha hecho que el estudio de la obtención a nivel industrial de las enzimas inulinasas sea de interés, en donde la optimización de la producción de las mismas en bacterias presenta investigaciones recientes (Laowklom, Chantanaphan, y Pinphanichakarn, 2012)

Puede emplearse materia prima bruta o residuos agroindustriales como sustratos para la producción de bacterias ácido lácticas con el fin de producir enzimas inulinasas. La inulina de origen vegetal es una fuente de carbono suficiente para la producción de este tipo de enzimas (Lara, 2017). El carbono es uno de los principales elementos que se necesitan para el crecimiento del microorganismo y producción de enzimas de interés, ya que el mismo proporciona energía necesaria para realizar estos procesos (Singh y Gill, 2006).

Entre los parámetros más importantes que se deben tomar en cuenta para cultivo de *Lactobacillus casei* se encuentra la fuente de nitrógeno, carbono, tipo de fermentación, entre otros.

Uno de los nutrientes que se encuentra en pequeñas cantidades es el magnesio el cual es el constituyente de la lactosa deshidrogenasa. Es de vital importancia cuidar las cantidades de nutrientes que se emplea, debido a que un exceso de los mismos puede causar una inhibición del crecimiento celular (Hofvendahl y Hahn-Hägerdal, 2000).

Otro parámetro importante a tomar en cuenta es la concentración de iones hidrógeno, este factor juega un papel importante en la producción de ácidos orgánicos que se forman durante la fermentación debido a que la acumulación

de caldo en dicho proceso, inhibe el crecimiento del microorganismo. Para controlar su acumulación se puede adicionar agentes neutralizantes (Shahravy, Tabandeh, Bambaï, Zamanizadeh y Mizani, 2012). El pH óptimo para el crecimiento de *L. casei* debe encontrarse entre 5,5 y 6,2 (Panesso, 2015).

Al ser considerada como una bacteria mesófila cuya temperatura óptima para su crecimiento es de 37 °C, encontrándose dentro del rango anteriormente mencionado de 30-40 °C (Hofvendahl y Hahn-Hägerdal, 2000).

2.3.2 Cuantificación enzimática y medición de parámetros cinéticos

La actividad enzimática es la velocidad en la que una enzima determinada reacciona, la misma que se establece por la medición de la velocidad en la que se transforma el sustrato (Müller, 2008). Existen dos procedimientos de medida: el primero es la reacción a punto final o medida a dos puntos y el segundo es el método cinético o medición continua. Para ello, se efectúa una medición de la cantidad de sustrato no transformado de forma continua en ciertos periodos de tiempo o la cantidad de producto formado (Koolman y Röhm, 2005)

La V_{max} representa la velocidad máxima en donde la concentración de sustrato incrementa hasta llegar a una velocidad constante, es decir, toda la enzima se encuentra formando el complejo enzima-sustrato. La V_{max} es directamente proporcional a la concentración de la enzima (Battaner, 2014). Se considera que V_{max} es la medida cuantitativa de la intensidad de la transformación catalítica del sustrato, mientras que K_m simboliza la fijación al mismo (Koolman y Röhm, 2005).

La concentración de sustrato cuando la reacción ha alcanzado la mitad de su velocidad máxima se conoce como K_m o constante de Michaelis-Menten, la cual es un valor característico de cada enzima e indica la afinidad de la unión enzima- sustrato, es decir, cuando el valor de K_m es bajo, indica que existe una alta afinidad entre la enzima y el sustrato; mientras que un valor alto indica que existe una baja afinidad entre las mismas (Koolman y Röhm, 2005). La K_m no depende de la concentración de la enzima, cuando el valor del contenido de

sustrato es igual al valor de K_m la velocidad de reacción es $V_{max}/2$, además, es un parámetro intrínseco y su cambio debe a la temperatura y al pH (Christensen y Palmer, 1980).

3. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL

3.1 Diagrama de flujo

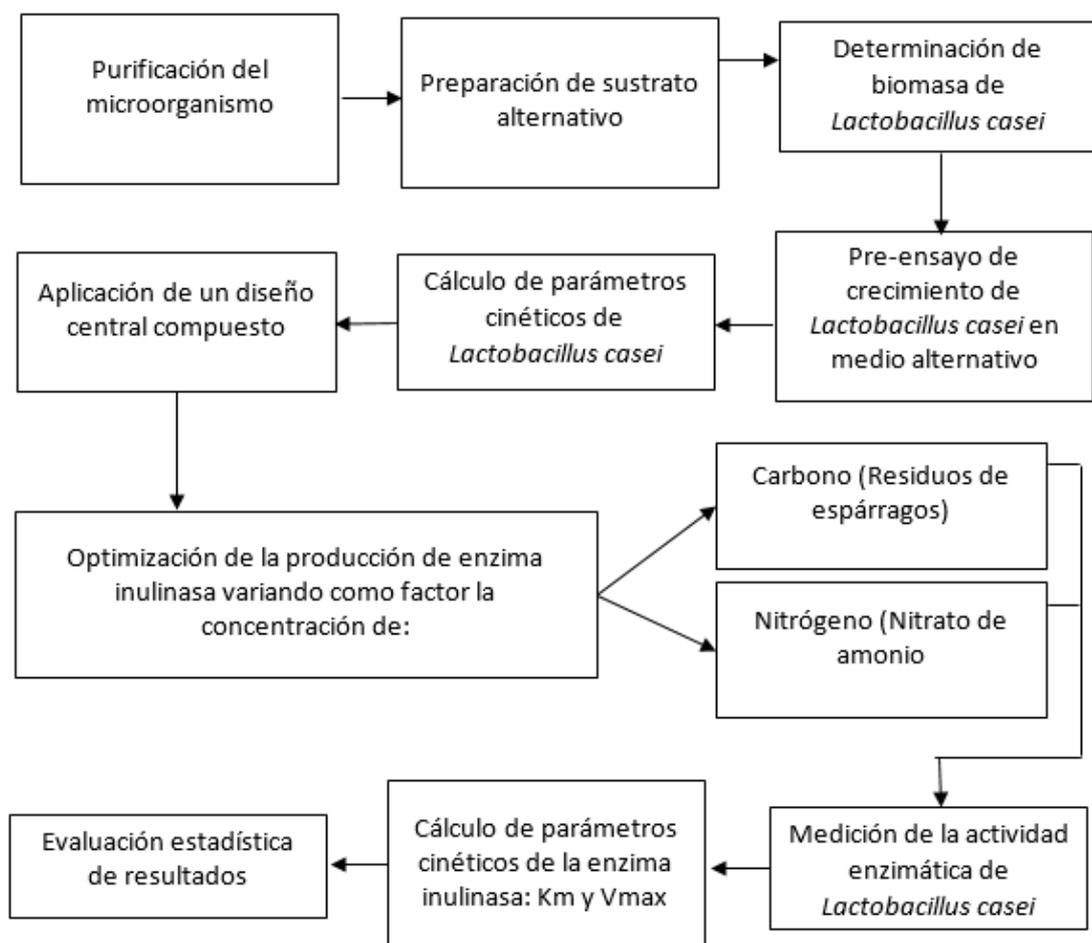


Figura 2. Diagrama del proceso a realizarse para la optimización de las condiciones de cultivo de *Lactobacillus casei* para producción de inulinasa.

4. PROCEDIMIENTOS

4.1 Población y muestra

Se utilizó *Lactobacillus casei* (ATCC® 334™) obtenida de la casa comercial Microbiologics®. La muestra es el coctel de enzimas extracelulares contenidas en el sobrenadante del medio de cultivo

4.2 Materiales y métodos para la obtención de datos

4.2.1 Elaboración de medio de cultivo alternativo

El medio usado para el crecimiento del microorganismo fue el medio MRS broth modificado (Himedia Laboratories, 2010) cuya composición se presenta en la Tabla 1

Tabla 1.

Composición del medio de cultivo alternativo para el crecimiento de Lactobacillus casei

Componente	Cantidad (g L ⁻¹)
Acetato de sodio tri hidratado	5,00
Sulfato de manganeso	0,05
Fosfato de sodio	2,00

Cabe destacar que cada sal se disolvió de manera individual con una concentración de 0,05 M.

4.2.2 Purificación de la bacteria *Lactobacillus casei*

La purificación de cepas se llevó a cabo siguiendo el método modificado de Sánchez, (2005), en el que se sembraron las cepas en medio de cultivo MRS líquido y se incubó por 72 h a 37 °C. Posteriormente se sembró 15 µL de cultivo en medio sólido MRS mediante la técnica de extensión en placa y se incubó igualmente por 72 h a la misma temperatura. Se observó la presencia

de colonias puras y se comprobó su purificación mediante tinción Gram y visualización microscópica.

4.2.3 Preparación del sustrato alternativo (Solución de residuos de espárragos)

Para la elaboración del sustrato se trituró 200 g de espárragos frescos, se procedió a licuar con 50 mL de agua destilada para su posterior filtrado. Dicho filtrado se autoclavó para realizar un segundo filtrado hasta obtener la solución de espárragos libre de sólidos suspendidos.

4.2.4 Determinación de biomasa

Para determinar el crecimiento de *Lactobacillus casei* se llevaron a cabo dos procedimientos diferentes con la misma finalidad.

4.2.5 Método peso seco

Consiste en una determinación gravimétrica de biomasa, en donde se tomaron 4 mL de la muestra los cuales fueron centrifugados (Sigma ®3-18KS) a 10000 rpm durante 10 min, se recuperó la biomasa (pellet) y se resuspendió en 2 mL de agua destilada estéril para posteriormente colocarla en capuchones secos de aluminio (previamente pesados). Se procedió a secar las muestras por 24 h a 80°C en la estufa. Para finalizar se pesó los capuchones y se restó el peso inicial (Arnáiz, Isac y Lebrato, 2000; Camacho y Torres, 2010).

4.2.6 Método de absorbancia

Consiste en medir la absorbancia de la biomasa que se encuentra en una celda utilizando el espectrofotómetro. Para medir la biomasa se utilizó un blanco específico, que en este caso fue la solución de espárragos sin inóculo. Seguido de esto, se tomó 1 mL de la muestra que se centrifugó a 6000 rpm durante 10 min. Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 1 mL de agua destilada estéril para después medir la absorbancia a 600 nm.

4.2.7 Curva de calibrado de biomasa

Se procedió a realizar la curva de calibrado del microorganismo de acuerdo a las diluciones establecidas en la Tabla 2, para lo cual se midió la concentración de biomasa por medio de los dos procedimientos descritos en los apartados anteriores.

Tabla 2.

Diluciones para efectuar la curva de calibrado para la determinación de biomasa

Diluciones	Volumen de la muestra (mL)	Volumen del medio estéril (mL)
1	5,0	5,0
2	4,0	6,0
3	3,0	7,0
4	2,0	8,0
5	1,0	9,0
6	0,5	9,5

4.2.8 Pre ensayo de crecimiento con el sustrato alternativo (solución de residuos de espárragos al 20%)

Para el ensayo de crecimiento de *L. casei* se utilizó un medio alternativo de 40 mL en el cual se añadió los siguientes reactivos: Acetato de sodio (5 g L^{-1}), sulfato de manganeso ($0,05 \text{ g L}^{-1}$), fosfato de di sodio (2 g L^{-1}), solución de residuos de espárragos (20% v/v) y nitrato de amonio ($2,85 \text{ g L}^{-1}$), se homogenizó al medio, se ajustó a un pH de 6,5, se autoclavó y se incubó a 37°C y 150 rpm durante 72 h. Se observó si crecía la bacteria en el medio alternativo (Oh, 1995) .

4.2.9 Curva de crecimiento de biomasa en medio óptimo

La curva de crecimiento de *Lactobacillus casei* se llevó a cabo con la finalidad de determinar la fase exponencial de su crecimiento. Para esto se realizaron tres réplicas de la siguiente manera. Se tomaron 5 mL de la muestra cada hora y se los colocó en tubos falcon de 15 mL, y se dividió en dos procesos. El primero se realizó por el método de absorbancia, en el cual se utilizó un blanco

que fue el medio sin inocular. Seguido, se extrajo 1 mL de la muestra, se lo colocó en una celda y se midió la absorbancia a punto fijo en el espectrofotómetro a 600 nm. En el segundo procedimiento, a los 4 mL restantes se los centrifugó por 10 min a 10000 rpm con el fin de que se separe la biomasa. Se desechó el sobrenadante dejando el pellet en el falcon, se añadió 2 mL de agua destilada estéril, se homogenizó con vortex y se lo centrifugó a 10000 rpm por 5 min. Se realizó el paso anterior 2 veces más y a la tercera vez que salió de la centrífuga se desechó el sobrenadante y se colocó 2 mL de agua destilada estéril. Se homogenizó nuevamente y se colocó en sus respectivos capuchones durante 24 h, los cuales se colocaron en el desecador durante 15 min para posteriormente pesarlos

4.2.10 Consumo de sustrato

Para la obtención del consumo de sustrato se realizó una curva de calibrado mediante el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS). En la misma se utilizó solución de fructosa y se diluyó en agua destilada estéril, en las cantidades que se indican en la Tabla 3. Una vez realizadas las diluciones se colocaron 500 μ L de cada dilución en microtubos de 1,5 mL y se adicionaron 500 μ L del reactivo del DNS. Se hizo reaccionar en el termobloque a una temperatura de 95 °C por 5 min. Se dejó enfriar las muestras y se las traspasó a las celdas del espectrofotómetro y se midió la absorbancia a 540 nm. El blanco utilizado fue el reactivo del DNS puro que también fue incubado a 95 °C por 5 min (Miller, 1959).

Tabla 3.
Diluciones para realizar la curva de calibrado para determinar el consumo de sustrato (fructosa)

Diluciones	Volumen de la fructosa (mL)	Volumen de agua destilada estéril (mL)
1	5,0	0,0
2	4,5	0,5
3	4,0	1,0
4	3,5	1,5
5	3,0	2,0
6	2,5	2,5
7	2,0	3,0
8	1,5	3,5
9	1,0	4,0
10	0,5	4,5
11	0,0	5,0

Para medir el consumo de sustrato de *Lactobacillus casei* se tomaron 500 μL de la muestra de cada hora y se colocó en un microtubo de 1,5 mL y se agregaron 500 μL de DNS. Se incubó en el termo bloque a 95 $^{\circ}\text{C}$ por 5 min, se dejó enfriar las muestras y se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a 540 nm generando así una curva de consumo de sustrato. Seguido de esto se procedió a determinar el rendimiento de biomasa con el sustrato mediante el uso de la ecuación 1.

$$\gamma_{x/s} = \frac{X_f - X_0}{S_f - S_0} \quad \text{Ecuación 1}$$

4.2.11 Parámetros cinéticos de *Lactobacillus casei*

Para la medición de los parámetros cinéticos de la bacteria *Lactobacillus casei*, se lo realizó tanto para el sustrato no óptimo y para el medio óptimo.

En la misma se midieron parámetros como velocidad específica de crecimiento (μ) (Ecuación 2), velocidad máxima de crecimiento (μ_{max}) (Ecuación 3), tiempo de duplicación (td) (Ecuación 4) y productividad global de biomasa ($Y_{X_{\text{global}}}$) (Ecuación 5) (Zapata, Hoyos y Quinchía, 2005).

$$\mu = \frac{\ln X_f - \ln X_0}{\Delta t} \quad \text{Ecuación 2}$$

$$\mu_{max} = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1} \quad \text{Ecuación 3}$$

$$td = \frac{\ln 2}{\mu} \quad \text{Ecuación 4}$$

$$Y_{X_{global}} = \frac{X_2 - X_1}{t_2 - t_1} \quad \text{Ecuación 5}$$

Formación de producto

4.2.12 Curva de calibrado

Se utilizó la misma curva de calibrado de fructosa que se realizó en el consumo de sustrato.

4.2.13 Actividad enzimática

Para medir la actividad enzimática, se utilizó la solución de espárragos al 20% v/v, con un pH de 6,5 y se adicionaron 2,86 g L⁻¹ de nitrato de amonio. Se utilizó dicho compuesto debido a que esta es una sal que contiene el 35% de nitrógeno, el cual ayuda en la fermentación de *L. casei*, además que es utilizado como fertilizante y abono por la cantidad de nitrógeno que presenta. Adicionalmente es un reactivo que se lo puede adquirir de forma no tan costosa (Meena, 2014). Se siguió el procedimiento descrito por Kavitha, Angel, Vidyadharani y Roy, (2012) con modificaciones para determinar la actividad enzimática de la inulinasa. Se centrifugó el inóculo y se colocaron 350 µL de buffer de acetato sódico con una concentración de 0,1 M, 100 µL de inulina al 1% y 50 µL del sobrenadante, para posteriormente incubar a 50 °C por 20 min. Se agregaron 500 µL de DNS y se elevó su temperatura a 95 °C en el termo bloque (Thermo scientific) por 5 min, posteriormente se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a una absorbancia de 540 nm. A partir de estos datos se generó una curva de producción de enzima inulinasa, a la cual se la transformó a concentración de enzima gracias al uso de la curva de calibrado de fructosa.

4.2.14 Determinación de proteínas totales

Para esta etapa se procedió a realizar una curva de calibrado utilizando el método de Biuret, en el cual se utiliza la albúmina de suero bovino (BSA) mediante un stock de 10 mg mL^{-1} . Se realizaron diluciones como se observa en la Tabla 4 y se midió la absorbancia en el lector de placas a una longitud de onda de 540 nm. De igual manera este procedimiento se realizó por triplicado y se obtuvo del promedio de las absorbancias, la curva de calibrado para la determinación de proteínas (Zheng, Wu, He, Yang y Yang, 2017).

Tabla 4.

Diluciones para la curva de calibrado de Biuret utilizando albúmina de suero bovino (BSA)

# Tubo	H ₂ O (mL)	BSA (mL)	Biuret (mL)
1	1,0	0,0	2,0
2	0,9	0,1	2,0
3	0,8	0,2	2,0
4	0,7	0,3	2,0
5	0,6	0,4	2,0
6	0,5	0,5	2,0

Para la cuantificación de proteínas totales se realizó de la misma manera por triplicado. Se realizó el siguiente procedimiento: Se centrifugó la muestra a 10000 rpm por 7 min y se tomó el sobrenadante. Del mismo se tomó 0,4 mL, se le adicionó 0,7 mL del reactivo de Biuret y se lo dejó reaccionar durante 30 min a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo se colocaron 200 μL de la muestra en los pocillos de las placas (Placas 96 MicroWell™, Nunclon™) y se midió la absorbancia en el lector de absorbancia en placas a una longitud de onda de 540 nm. Para obtener la cantidad exacta de proteínas totales se tomó la ecuación de la recta de la curva de calibrado de Biuret, se despejó X y se tomó como valor de Y al promedio de las absorbancias de la muestra, generando así el resultado.

4.2.15 Cálculo de parámetros cinéticos de la inulinasa Km y Vmax

Se midió la cinética enzimática en función de la concentración de sustrato después de haber realizado los experimentos de actividad enzimática de la inulinasa. Para esto se utilizaron las diferentes concentraciones de sustrato (20%, 30%, 37,5%, 45% y 50% v/v) y la velocidad inicial que se midió a cada una de éstas concentraciones. Se utilizó la ecuación de Lineweaver-Burk (Ecuación 6). Para utilizarla primero se calculó el inverso de los datos, es decir $1/[S]$ y $1/v_0$, seguido de esto se procedió a realizar una gráfica y se realizó una aproximación a la ecuación de la recta, en la cual $Y=1/v_0$ y $X=1/[S]$. Una vez realizada la gráfica se calculó Km y Vmax. Para Vmax se dividió $1/b$ y Km es igual a $V_{max} \cdot m$ (Dorán, 1995)

$$\frac{1}{V_0} = \frac{1}{v_{max}} + \frac{k_m}{v_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} \quad \text{Ecuación 6}$$

4.2.16 Cinética de formación de producto

Se determinó la cinética de formación de producto, para lo cual se midió a cada hora la actividad enzimática, a partir de la fase exponencial del crecimiento bacteriano para verificar el tiempo en que hay mayor actividad por parte de la enzima inulinasa.

Una vez obtenidas las gráficas de producción de proteínas se procedió a calcular la productividad específica máxima de proteína (Ecuación 7) y la productividad volumétrica máxima de proteína (Ecuación 8), de los datos Recuperados de la gráfica de proteínas totales vs tiempo.

$$q_p = \frac{dP}{dt} * \frac{1}{X} \quad \text{Ecuación 7}$$

$$Q_p = \frac{dP}{dt} \quad \text{Ecuación 8}$$

4.3 Evaluación estadística de los resultados

Se realizó un análisis estadístico (ANOVA), en donde se varió el la concentración de fuente de carbono dejando como valor estándar la concentración de fuente de nitrógeno al $2,9 \text{ g L}^{-1}$. Los resultados obtenidos de este análisis se procesaron en el Software Statistica™. Cabe mencionar que cada prueba se lo realizó por triplicado.

Para la optimización de la producción de inulinasa se utilizó un diseño, las variables independientes fueron la fuente de nitrógeno (nitrato de amonio) y carbono (solución de residuos de espárragos); siendo la actividad enzimática de la inulinasa la variable dependiente o de respuesta. Se determinaron los valores centrales de cada una de los factores (C y N) para así poder generar datos al azar con el fin de formar una tabla con los valores decodificados para el diseño central compuesto (Tabla 5), de acuerdo con los diseños ya antes planteados y también a la bibliografía consultada, es decir, 50% v/v de solución de residuos de espárragos y $2,90 \text{ g L}^{-1}$ de nitrato de amonio. De esta manera se generan los tratamientos (Tabla 6) que se van a utilizar en el diseño central compuesto, gracias a la combinación de los valores de carbono (C) y nitrógeno (N).

Tabla 5.

Concentraciones de fuente de carbono y nitrógeno empleadas para la optimización de la producción de enzimas inulinasas en el diseño de central compuesto.

Valores decodificados		
Código	C (Solución de espárragos (% v/v))	N (Nitrato de amonio (g L^{-1}))
1,4	0,85	3,90
1,0	0,75	3,60
0,0	0,50	2,90
-1,0	0,25	2,10
-1,4	0,15	1,80

Tabla 6.
Tratamientos del diseño central compuesto

Tratamientos	C (Solución de espárragos (% v/v))		N (Nitrato de amonio (g L ⁻¹))	
	Código	Valor	Código	Valor
1	-1,0	25	-1,0	2,10
2	-1,0	25	1,0	3,60
3	1,0	75	-1,0	2,10
4	1,0	75	1,0	3,60
5	-1,4	15	0,0	2,90
6	1,4	85	0,0	2,90
7	0,0	50	-1,4	1,80
8	0,0	50	1,4	3,90
9	0,0	50	0,0	2,90
10	0,0	50	0,0	2,90
11	0,0	50	0,0	2,90
12	0,0	50	0,0	2,90

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Purificación de la bacteria *Lactobacillus casei*

Se puede observar en la Figura 3 (A) una coloración morada, lo cual indica que es una bacteria Gram positiva. Además, en la Figura 3 (B) se puede observar que la bacteria presenta forma alargada como bacilo. Esto se puede corroborar con el estudio hecho por James, Velastegu, y Cruz, (2017); Marin, Cortés, y Montoya, (2009), en donde la tinción gram generó el mismo resultado.

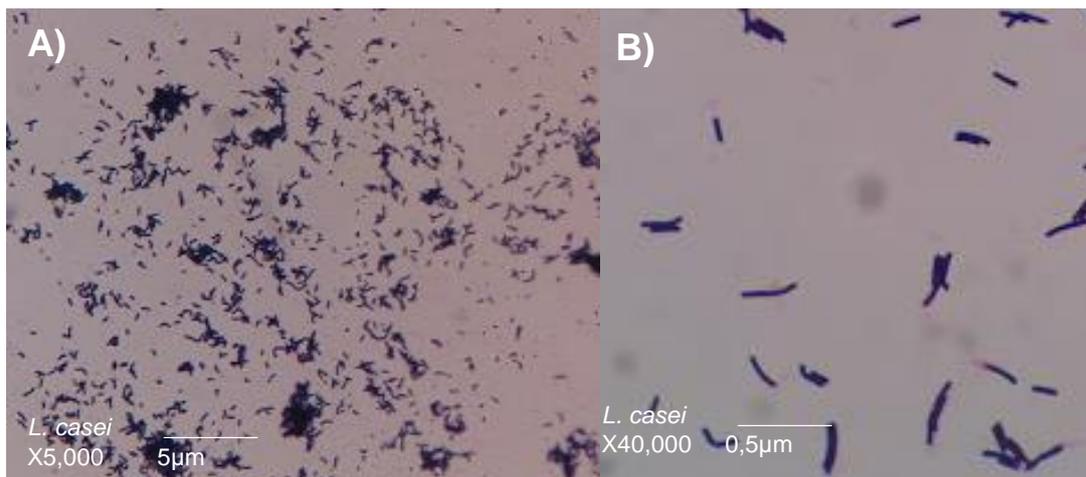


Figura 3. Tinción Gram de *Lactobacillus casei*

5.2 Determinación de biomasa

5.2.1 Curva de calibrado de biomasa

Se obtuvo una curva de calibrado de *L. casei* (Figura 4), haciendo uso del método de gravimetría (g L^{-1}) y el método de absorbancia (nm). Se obtuvo la ecuación de la recta $y=1760,4x+0,5464$. Por otro lado, se presenta un coeficiente de regresión R^2 de 0,9925. Según Rodríguez, Moldes, Teixeira y Oliveira, (2006) en el estudio de los cinéticos de la producción fermentativa de biosurfactantes por cepas de *Lactobacillus* determinaron que el valor del coeficiente de regresión R^2 en su estudio fue de 0,991, valor que se aproxima al obtenido en la presente investigación. Cabe mencionar que dicho valor debe ser mayor a 0,95 para ser un coeficiente que indique una relación lineal exacta, lo que se obtiene en el presente estudio, señalando así que los datos se ajustan a la ecuación de la recta.

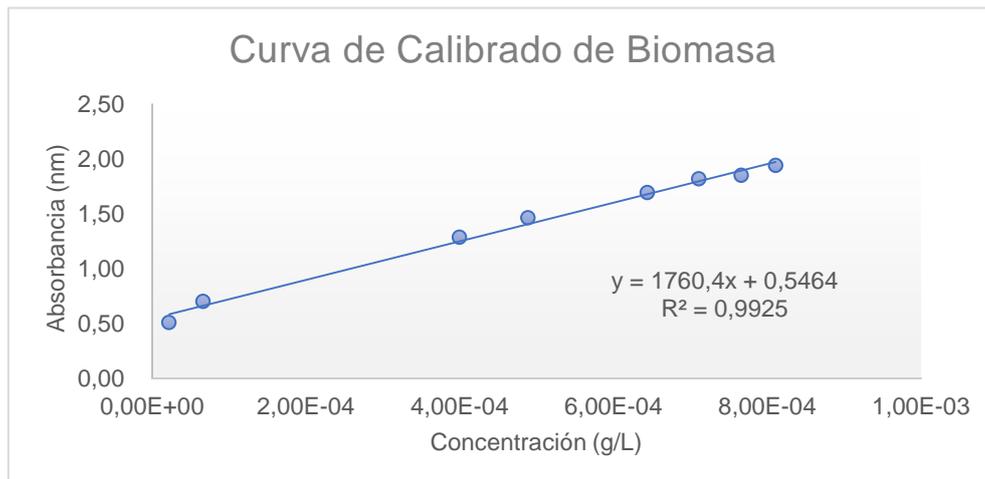


Figura 4. Curva de calibrado de biomasa

5.2.2 Pre-ensayo de crecimiento de biomasa en sustrato alternativo

Se obtuvo una curva de crecimiento en la condición de cultivo del medio con sustrato no óptimo, con el fin de evidenciar el crecimiento de la cepa de la bacteria como se muestra en la Figura 5. Además, se puede observar las diferentes fases de crecimiento de la bacteria medidas cada hora, es decir, desde la hora cero a la hora 10 se observa que la bacteria se estuvo acondicionando, lo cual indica que estuvo en fase de latencia; a partir de la hora 10 hasta aproximadamente la hora 37 la bacteria tuvo su crecimiento exponencial, para posteriormente entrar a fase estacionaria hasta la hora 73. Por último, desde la hora citada hasta las 97 h la bacteria tuvo su fase de muerte.

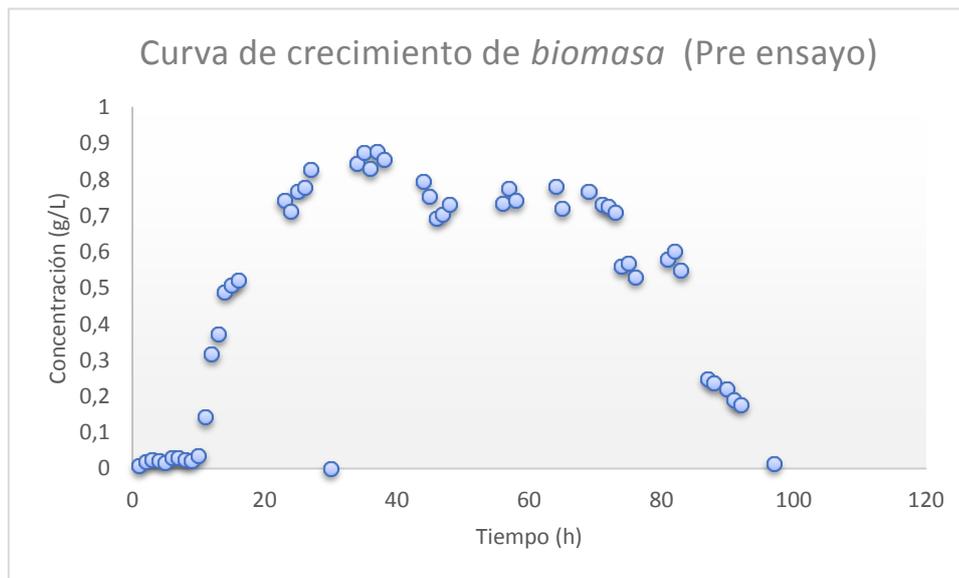


Figura 5. Curva de crecimiento de biomasa (pre-ensayo) en medio alternativo

5.2.3 Curva de crecimiento de biomasa utilizando las condiciones de operación optimizadas

Se obtuvo una curva de crecimiento de *L. casei* (Figura 6), en la cual se estableció la cinética de crecimiento en un periodo de 74 h. La fase de latencia se produjo desde el tiempo 0 a 6 h en donde la bacteria se adaptó al medio de cultivo, mientras que la fase logarítmica se produce a las 6 a 34 h aproximadamente, donde la bacteria creció significativamente. La fase estacionaria se da entre 34 a 83 h en la cual la bacteria consumió todos los nutrientes que se encontraban en el medio y la fase de muerte de 83 a 100 h en la cual la bacteria ya no poseía sustrato que consumir y murió, como se observa en la Figura 6.

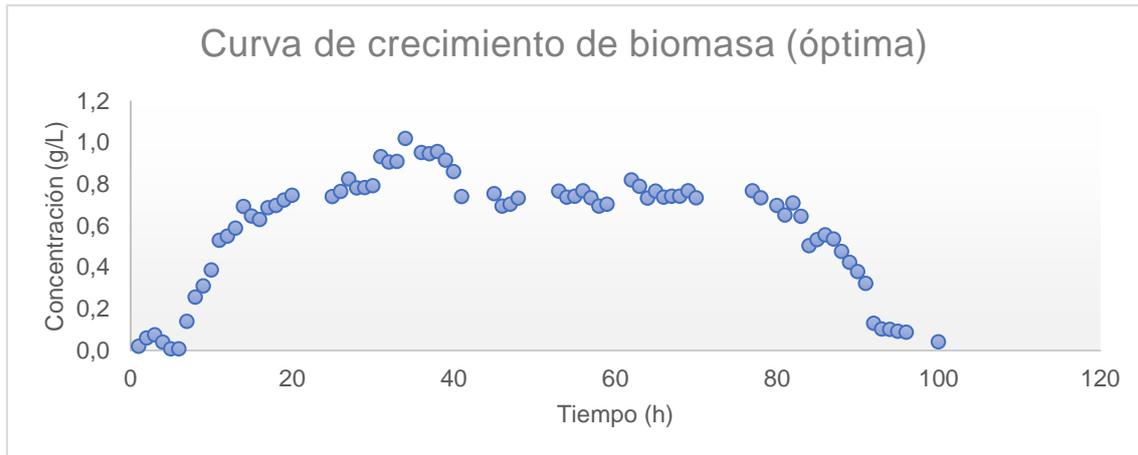


Figura 6. Curva de crecimiento de biomasa (óptimo) en el sustrato alternativo

Según el comportamiento observado de *L. casei* en la curva de crecimiento a escala de laboratorio, se puede aseverar lo obtenido por Velásquez, Giraldo, Padilla y Giraldo, (2015) en el estudio del crecimiento de *Lactobacillus casei* spp. *casei* ATCC 393 en suero clarificado, la misma que presenta la fase de latencia hasta la sexta hora y una fase logarítmica aproximada de 24 h, resultados que se aproximan a los obtenidos experimentalmente en este proyecto.

Una de las causas principales para establecer la cinética del microorganismo es la formulación del medio de cultivo, tal como lo menciona García, Polaina y Hernándo (2016), en el estudio de la producción enzimática de compuestos prebióticos, se asevera que los nutrientes que se administran al medio de cultivo influyen en cada una de las etapas de la fase de crecimiento de la bacteria. Se presume que al añadir con una solución de residuos de espárragos como fuente de carbono, la bacteria obtuvo energía necesaria para la producción de enzimas inulinasas. De igual forma al suplementar con nitrato de amonio como fuente de nitrógeno para la formulación del medio, la bacteria *L. casei* obtuvo los aminoácidos que se necesitan para su crecimiento y a la vez se utilizó un reactivo de menor costo haciendo posible su escalamiento a nivel industrial (Ertan, 2003)

5.2.4 Parámetros cinéticos de *Lactobacillus casei*

Se obtuvo los parámetros cinéticos de la bacteria *L. casei* antes y después de la optimización del medio de cultivo a escala de laboratorio dando los resultados que se muestran en la Tabla 7. Se puede observar que los resultados para el sustrato no óptimo son: velocidad específica de crecimiento de $0,04 \text{ h}^{-1}$; velocidad máxima de crecimiento de $0,18 \text{ h}^{-1}$; tiempo de duplicación de $17,33 \text{ h}$ y productividad global de biomasa de $0,05 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. De igual manera en el sustrato óptimo, dando valores de: velocidad específica de crecimiento de $0,05 \text{ h}^{-1}$; velocidad máxima de crecimiento de $0,23 \text{ h}^{-1}$; tiempo de duplicación de $13,86 \text{ h}$ y productividad global de biomasa de $0,08 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Se determina una productividad global de biomasa de $1,6 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Tabla 7.

Parámetros cinéticos de *L. casei* en el sustrato alternativo no óptimo y el óptimo a escala de laboratorio

	Medio con sustrato no óptimo	Medio con sustrato óptimo
μ	$0,04 \text{ h}^{-1}$	$0,05 \text{ h}^{-1}$
μ_{max}	$0,18 \text{ h}^{-1}$	$0,23 \text{ h}^{-1}$
Td	$17,33 \text{ h}$	$13,86 \text{ h}$
Yx	$0,05 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$	$0,08 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$

Se han realizado investigaciones de la cepa *Lactobacillus casei*, las cuales muestran que la fuente de carbono, es decir, el sustrato influye en la mayor producción de biomasa, como se puede observar en la Tabla 6 en el medio con sustrato no óptimo la velocidad máxima de crecimiento es de $0,18 \text{ h}^{-1}$ ya que no posee la cantidad necesaria de carbono, así mismo para el medio con el sustrato óptimo que dio un valor de $0,23 \text{ h}^{-1}$, este resultado se obtuvo por que en el medio había la cantidad necesaria de sustrato para el crecimiento y

producción enzimática del microorganismo . En el estudio de Jurado, (2014) sobre la determinación de parámetros cinéticos de *Lactobacillus casei* en dos medios probióticos, en los cuales se han realizado la determinación de biomasa con diferentes tipos de sustratos en el medio de cultivo, se ha comprobado que el sustrato, es decir la fuente de carbono, influye en un gran porcentaje para el crecimiento de biomasa.

5.2.5 Consumo de sustrato

Como se puede observar en la Figura 7 se generó una curva de consumo de sustrato, en la cual se tomó una muestra cada hora hasta llegar a las 80 horas en la cual indicaba que ya no había consumo de sustrato por parte de la bacteria. Se presenta un coeficiente de regresión R^2 de 0,9924 generando también una ecuación lineal $Y=0,9978x-0,0124$. Según Marin, (2009) en el estudio de la evaluación de la viabilidad de crecimiento de la cepa nativa *Lactobacillus plantarum* LPBM10 y la cepa comercial *Lactobacillus casei* ATCC 393 en pulpa de uchuva y en solución isotónica de glucosa, determinaron que el valor del coeficiente de regresión lineal para utilizar una curva de calibrado en el caso del consumo de sustrato, utilizando el 95% de confiabilidad en el estudio, y de igual manera se utilizó el mismo porcentaje en el presente estudio obteniendo un coeficiente de regresión de 99,24%,

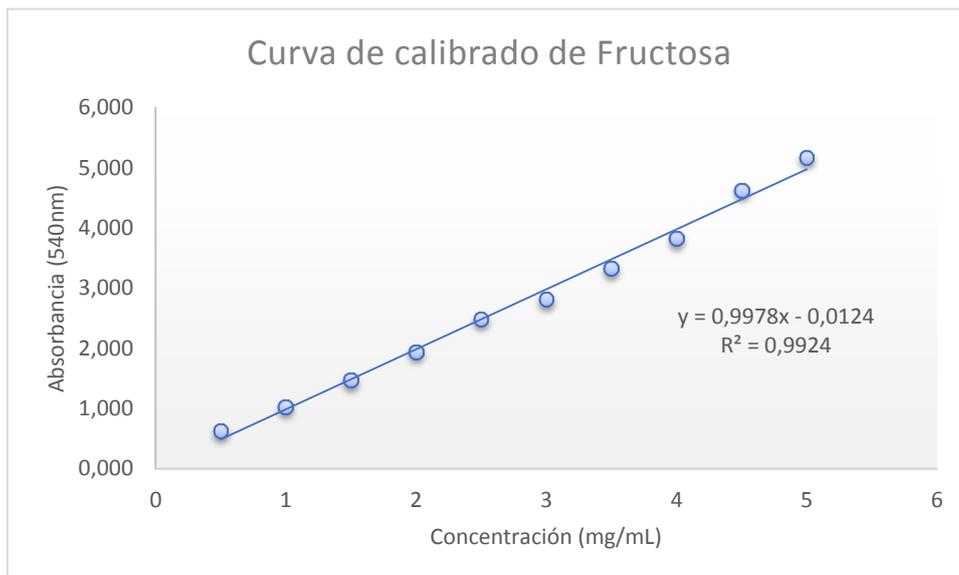


Figura 7. Curva de calibrado de fructosa

Una vez que se realizó la curva de calibrado de fructosa, se obtuvo la gráfica de consumo de sustrato de *L. casei* durante las 80 h de crecimiento de biomasa como se observa en la Figura 8. En la misma se puede observar que el medio empieza con una concentración de $2,020 \text{ g mL}^{-1}$ de sustrato y a medida que transcurre el tiempo las bacterias se acondicionan al medio desde las 0 h hasta las 18 h. Posteriormente las bacterias empiezan a consumir de forma rápida el sustrato hasta las 38 h y es allí donde cesa el consumo de sustrato.

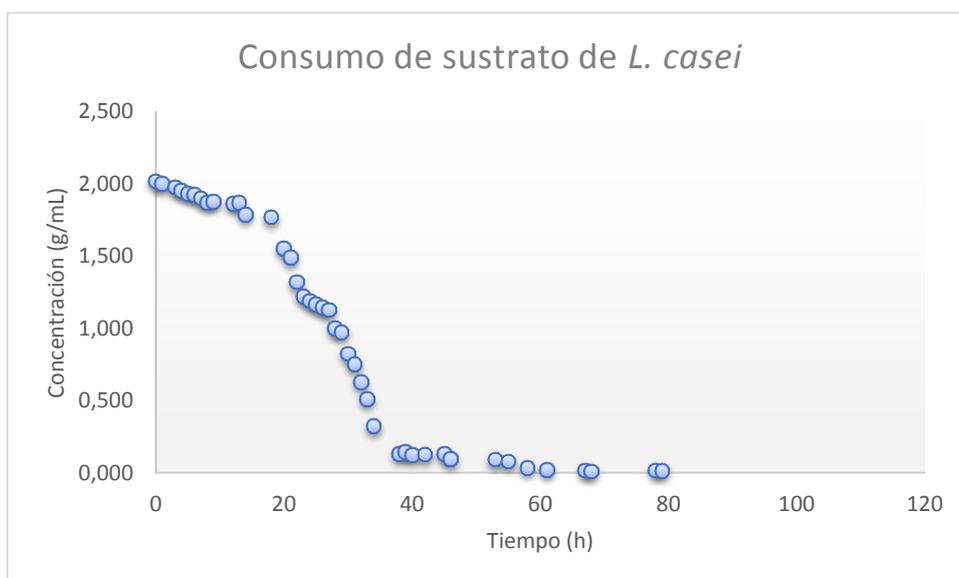


Figura 8. Curva de consumo de sustrato de *L. casei*

Se obtuvo un rendimiento de biomasa/sustrato ($Y^{x/s}$) de 0,04 g/g. El estudio de James, (2017) de Evaluación de las condiciones de cultivo de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei* a nivel de laboratorio, con inulina como fuente de carbono, obtuvieron un mayor rendimiento de 0,24 g/g, sin embargo, este estudio fue realizado con inulina a grado reactivo, es decir, totalmente pura, mientras que en el presente estudio se utilizó residuos de espárragos, es decir, una fuente de carbono que no es pura y por ello el menor rendimiento obtenido.

Formación de producto.

5.2.6 Actividad enzimática

5.2.6.1 Efecto de diversos porcentajes de carbono en la producción de inulinasa por *L. casei*

Se obtuvo como resultado una curva de actividad enzimática en relación con el tiempo como se observa en la Figura 9, a su vez también se observa que a diferentes porcentajes de carbono la actividad enzimática va a tener un comportamiento distinto a los demás, teniendo una actividad máxima de 1,277 $U\ mL^{-1}\ h^{-1}$

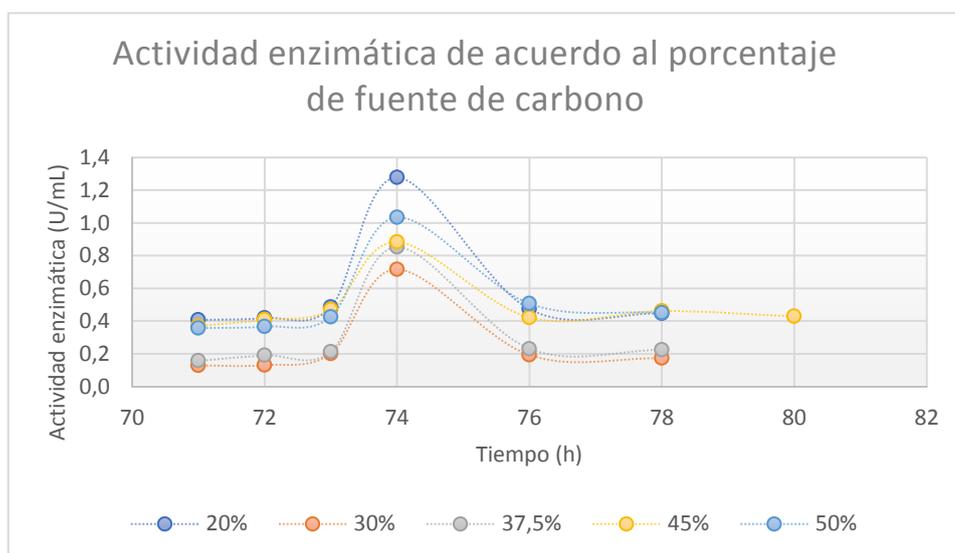


Figura 9. Actividad enzimática a diferentes porcentajes de concentración de la solución de residuos de espárragos.

Según Ayyachamy, Khelawan, Pillay, Permaul y Singh (2007), en el estudio de producción de inulinasas por *Xanthomonas campestris* pv *phaseoli* utilizando

cebolla (*Allium sativa*) y ajo (*Allium sativum*), respectivamente en fermentación de estado sólido, determinaron que existen diversos tipos de fuentes de carbono para la producción de inulinasa a partir de la primera hora hasta las ochenta horas de crecimiento, cuya producción coincide con la obtenida en el presente estudio que fue a las 74 horas y con un porcentaje de 20% de solución de residuos de espárragos.

5.2.6.2 Actividad enzimática en relación con el crecimiento bacteriano

En la Figura 10 se puede observar el comportamiento que presenta la actividad enzimática cada hora, desde la 0 del crecimiento de biomasa. Se observa que la misma no presenta actividad enzimática hasta las 65 h, dando una actividad en dicho tiempo de $1,3 \times 10^{-4}$ U mL⁻¹ y generando una actividad máxima de 0,0027 U mL⁻¹ a las 74 h de fermentación

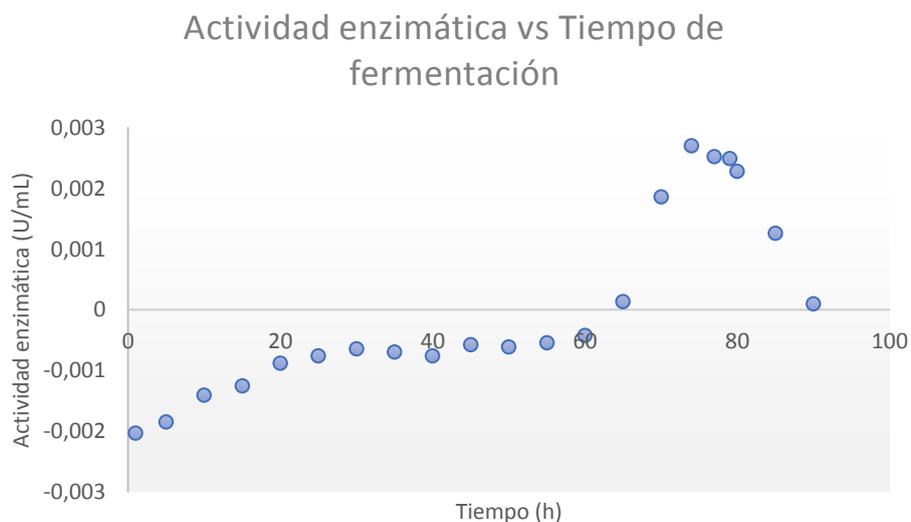


Figura 10. Actividad enzimática vs tiempo de fermentación de *L. casei*

Estudios de Ayyachamy, (2007), en el estudio de producción de inulinasas por *Xanthomonas campestris* pv *phaseoli* utilizando cebolla (*Allium sativa*) y ajo (*Allium sativum*), respectivamente en fermentación de estado sólido, indican

que se produce mayor actividad enzimática pasadas las 30 h, lo cual se puede comprobó con el presente estudio en el que se produjo actividad enzimática pasada las 50 h y una mayor actividad a las 74 h, con un sustrato orgánico como son los residuos de espárrago.

5.2.7 Determinación de proteínas totales

Se obtuvo una curva de calibrado de Biuret como se puede apreciar en la Figura 11. Además, se obtuvo como resultado la ecuación de la recta $y=0,3878x+0,06$ y un coeficiente de regresión R^2 igual a 0,992 en el cual indica que el 99,2% de los datos se ajustan a una línea exponencial.

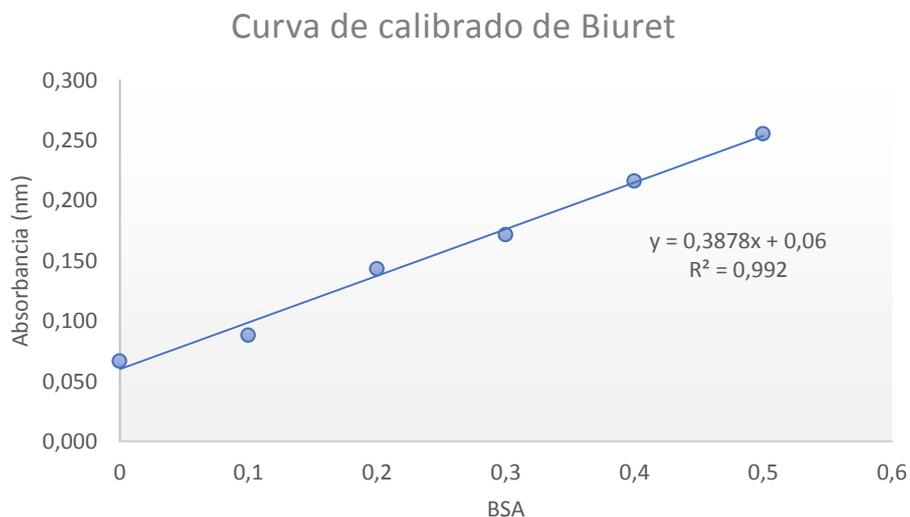


Figura 11. Curva de calibrado de Biuret con suero de albúmina bovina

Una vez obtenidos los datos, para realizar la cuantificación de proteínas totales se procedió a despejar X de la fórmula antes mencionada y se reemplaza a la Y por el valor del promedio de la absorbancia de proteínas que en este caso es 0,531 dando como resultado $X=1,21 \text{ mg L}^{-1}$.

5.2.8 Producción de proteínas totales en función del tiempo

Como se puede observar en la Figura 12, la obtención de proteínas totales varía a lo largo del tiempo, durante el crecimiento microbiano de *Lactobacillus casei*, de la misma manera la mayor producción de proteínas totales es de 12,08 (mg mL^{-1}) que se producen pasadas las 70 h de crecimiento de la

bacteria, de igual manera antes de las 65 h no hubo presencia de producción de proteínas totales y por esto en la Figura 12 se observan valores negativos las primeras horas.

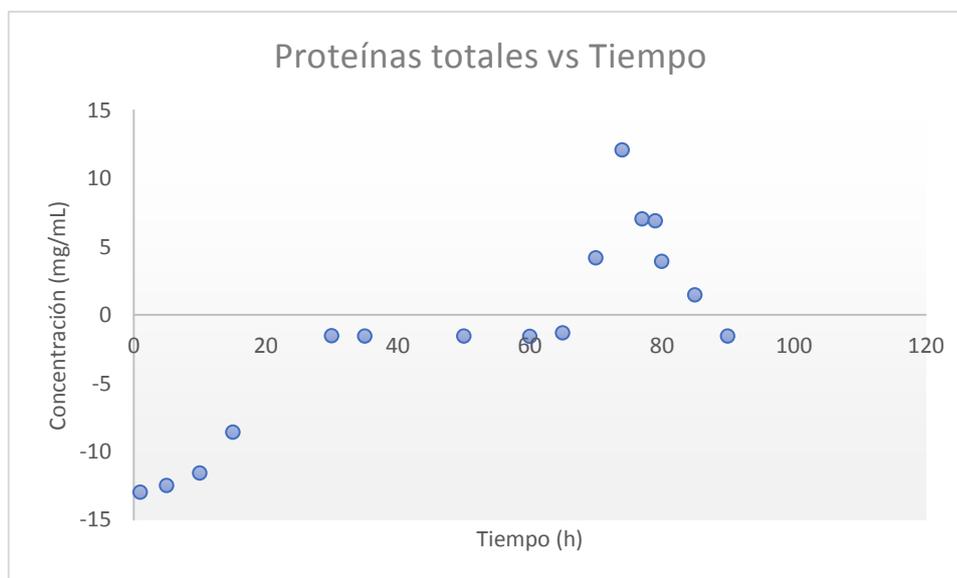


Figura 12. Determinación de proteínas totales en función al tiempo de fermentación de *L. casei*

En el estudio de Aguirre, Ramírez, Aguilar y Álvarez, (2009) en la producción de proteína seca y congelada de *Lactobacillus casei*, se determinó una generación de proteínas totales de la misma bacteria utilizando suero de leche cabra, dando un resultado de 25,97 (mg mL^{-1}) de proteínas totales a diferencia del resultado obtenido en el presente estudio; esto indica que depende de la composición en la que se encuentra el sustrato para tener una mayor obtención de proteínas totales.

5.2.9 Determinación de parámetros cinéticos de *Lactobacillus casei*: K_m y V_{max}

En la Figura 13 se puede observar la gráfica de Lineweaver-Burk que se emplea como herramienta para calcular los parámetros cinéticos de la inulinasa. A partir de la misma se pueden obtener datos que son útiles para el cálculo de K_m y V_{max} , generando así una ecuación de la recta

$y=19,976x+0,6447$ de la cual se pudo calcular los parámetros en el presente estudio.

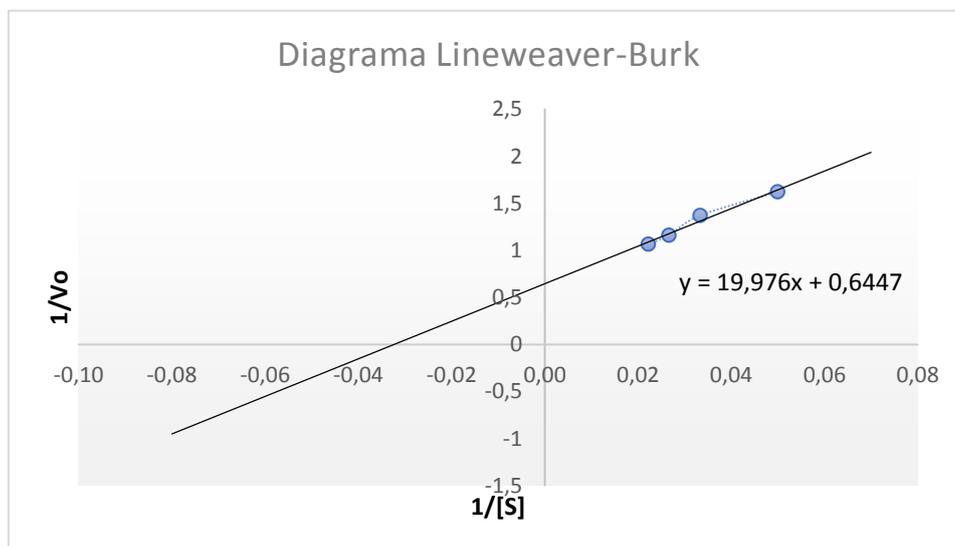


Figura 13. Gráfica de Lineweaver-Burk para la determinación de K_m y V_{max} de la enzima inulinasa

La inulinasa presentó un valor K_m de 30,98 (mol L^{-1}) experimentalmente que según Johnson y Echavarrí, (2011), en el estudio del aislamiento de bacterias productoras de inulinasa del suelo de caña de azúcar, el cual se evidencia que el resultado que ellos obtuvieron de K_m elevado por lo tanto este valor no tiene mayor afinidad al sustrato, al igual que el obtenido experimentalmente en este estudio. Por otro lado, V_{max} corresponde es de 1,55 U mL^{-1} , el mismo que es un valor óptimo para el ya antes mencionado K_m

Tabla 8.

Parámetros cinéticos: K_m y V_{max} de la enzima inulinasa

K_m (mol L^{-1})	V_{max} (U mL^{-1})
30,98	1,55

5.3 Optimización de la producción de inulinasa

5.3.1 Diseño central compuesto

Los resultados de la actividad enzimática se muestran en la Tabla 9. Se visualiza los valores codificados y los decodificados que representan los tratamientos a las diferentes concentraciones de carbono y de nitrógeno.

Tabla 9.

Resultado de la actividad enzimática de la inulinasa dentro del diseño central compuesto

Tratamientos	Respuesta: Actividad enzimática	
	Promedio	Desvest
1	0,181	0,129
2	0,189	0,150
3	0,259	0,135
4	0,154	0,145
5	0,15	0,250
6	0,217	0,156
7	0,609	0,609
8	0,236	0,236
9	0,372	0,433
10	0,364	0,456
11	0,371	0,467
12	0,376	0,468

En la Figura 14, se observa la influencia de la concentración de carbono y la de nitrógeno en la actividad enzimática de la inulinasa, dando como resultado que el mejor tratamiento es el 7, cuya concentración de carbono es del 50% v/v de solución de residuos de espárragos y 1,80 g L⁻¹ de nitrato de amonio como fuente de nitrógeno. Por otro lado, el tratamiento que menor actividad tuvo fue el 5 con una concentración de 15% v/v de carbono y 2,9 g L⁻¹ de nitrógeno, como se observa en la Figura 14.

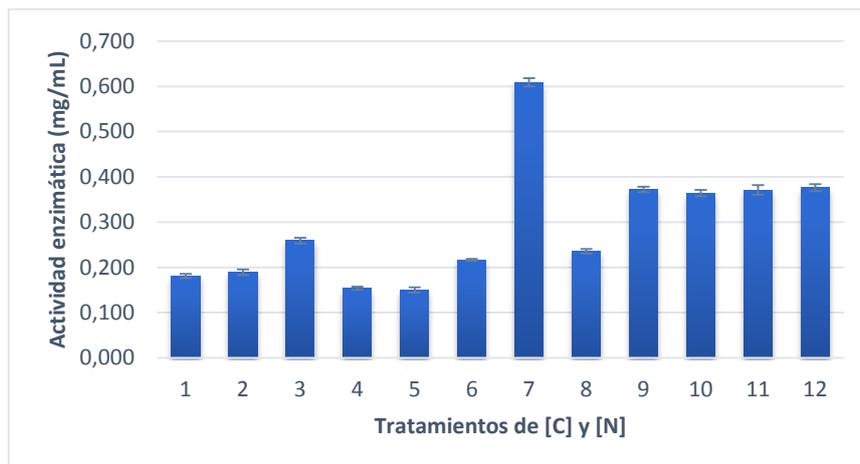


Figura 14. Gráfico de barras con líneas de error de la actividad enzimática de la inulina en los distintos tratamientos.

5.3.2 Gráfico de superficie y respuesta

Se realizó un análisis estadístico (ANOVA) como se puede observar en la Tabla 10, en la cual se determinó que existe una diferencia significativa en el factor fuente de carbono cuadrática y de nitrógeno línea, lo cual significa que la fuente de carbono cuadrática va a tender a ser significativamente dispersa en una relación cuadrática, mientras que a su vez la fuente de nitrógeno va a tener una diferencia significativa de sus resultados en una tendencia lineal, en relación con la actividad enzimática de la inulina. Esto corresponde a que el valor de la probabilidad es menor a 0,05.

El error típico fue de 0,0450, lo que representa un valor aceptable para la evaluación de respuesta en este diseño. Además, se obtuvo un valor del coeficiente de regresión (R^2) de 0,7658, que indica que el 76,58% de los datos se encuentran representados en la regresión cuadrática y gráfica de superficie

Tabla 10.

ANOVA de la variación de la concentración de carbono y concentración de nitrógeno para la producción de inulinasa

ANOVA					
Var: Actividad (U/mL); R-sqr=0,76579					
2 factors, 1 Blocks, 12 Run; MS Residual=0,0075076					
DV: Actividad (mg/mL)					
FACTOR	SS	Df	MS	F	P
(1)Carbono (L)	0,003	1	0,003	0,353	0,574
Carbono (Q)	0,094	1	0,094	12,572	0,012
(2)Nitrógeno(L)	0,046	1	0,046	6,080	0,049
Nitrógeno (Q)	0,000	1	0,000	0,028	0,873
1L by 2L	0,003	1	0,003	0,406	0,547
Error	0,045	6	0,008		
Total SS	0,192	11			

Se obtuvo la gráfica de superficie y respuesta (Figura 15). Mediante este gráfico se puede observar la optimización del diseño experimental, utilizando las variables independientes de la concentración de carbono al 50% v/v y 3,9 g L⁻¹ de la concentración de nitrógeno la cual se puede determinar en la gráfica de color rojo oscuro.

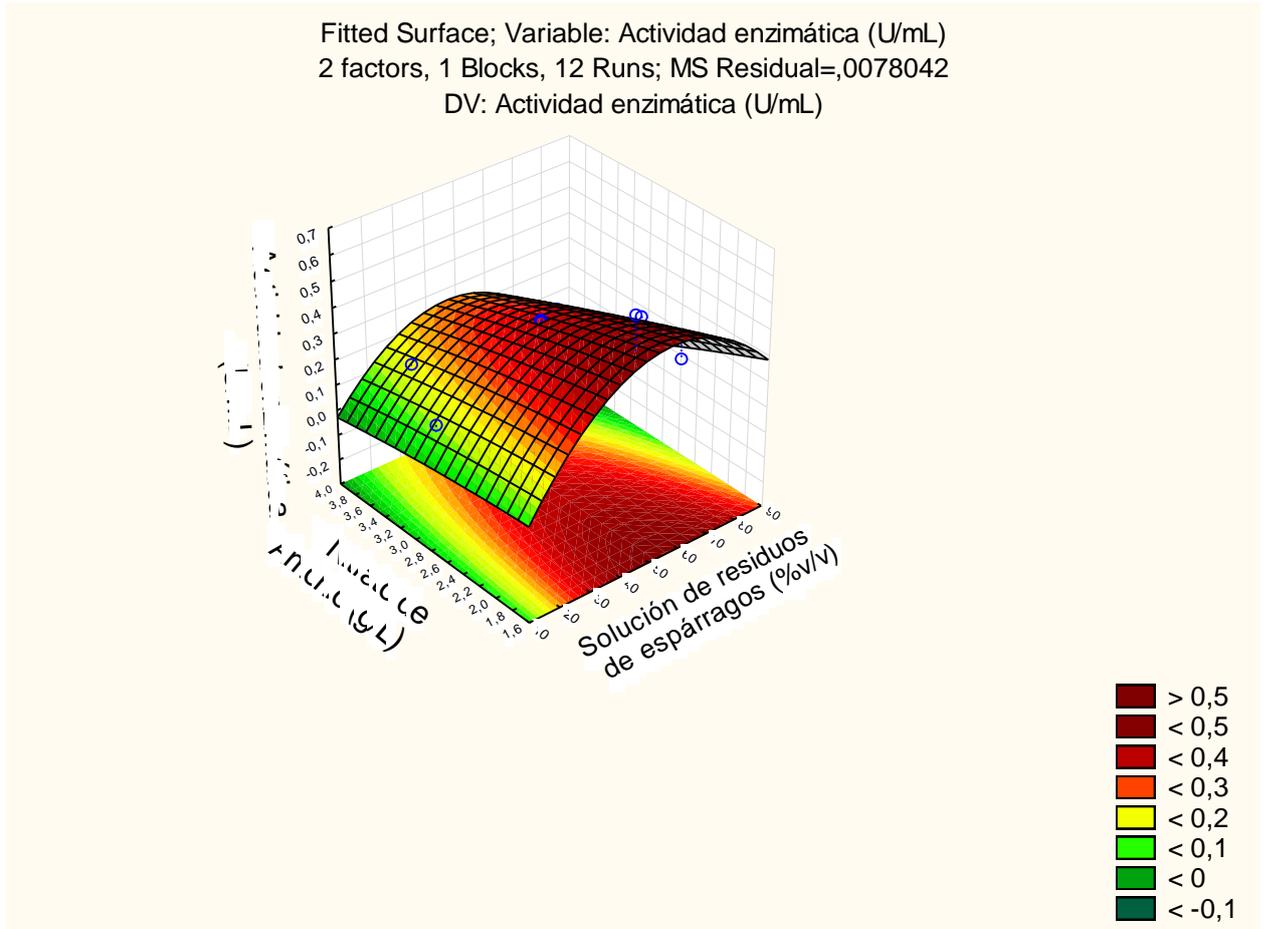


Figura 15. Gráfica de superficie y respuesta: variables independientes (X: concentración de carbón; Y concentración de nitrógeno) variable dependiente (Actividad enzimática de la inulinasa)

También se puede diferenciar gracias a este gráfico que la fuente de carbono es totalmente influyente para la formación de enzimas inulinasa por la forma de la Figura 15; sin embargo, el nitrógeno no afecta en la producción de estas enzimas, como se observa en la forma del gráfico ya que no existe una conexión de la figura en cual indica el valor central del mismo. De acuerdo a Ayyachamy, Khelawan, Pillay, Permaul y Singh, (2007), en el estudio de producción de inulinasas por *Xanthomonas campestris* pv *phaseoli* usando cebolla (*Allium cepa*) y ajo (*Allium sativum*) en cultivo sólido, asevera que la fuente de carbono es indispensable para la producción de enzimas, lo cual se confirma en este estudio en la figura 15 al momento de analizar la forma y colores de la misma.

La regresión multivariable del diseño experimental proporciona también una ecuación cuadrática (Ecuación 9) en la que describe cómo afectan las variables X_1 y X_2 con la variable de respuesta que en este caso es la actividad enzimática.

$$y = f + a X_1 + b X_2 + c (X_1)^2 + d (X_2)^2 + e X_1 X_2 \quad \text{Ecuación 9}$$

Dónde: $f = -0,158$, $a = 0,025$, $b = 0,031$, $c = -0,0002$, $d = 0,002$ y $e = -0,010$; estos valores se determinaron por la derivación parcial de la ecuación anterior en función de cada variable estudiada, obteniendo las siguientes ecuaciones:

$$\frac{\delta y}{\delta X_1} = 0,025 + 2(0,0002)X_1 + (-0,010)X_2 \quad \text{Ecuación 10}$$

$$\frac{\delta y}{\delta X_2} = 0,031 + 2(0,002)X_1 + (-0,010)X_2 \quad \text{Ecuación 11}$$

Con las ecuaciones 10 y 11 se obtuvieron los valores codificados tanto para la variable X_1 como también para la variable X_2 . Utilizando la ecuación 12 y 13 se obtienen los valores óptimos reales.

$$X_1^{\text{real}} = (X_1^{\text{codificado}} * 0,25) + 0,5 \quad \text{Ecuación 12}$$

$$X_2^{\text{real}} = (X_2^{\text{codificado}} * 0,75) + 2,9 \quad \text{Ecuación 13}$$

Una vez empleadas las ecuaciones anteriores se obtuvo una concentración óptima de 50% de la concentración de la fuente de carbono (solución de residuos de espárragos) y 2,92 g L⁻¹ de la concentración de la fuente de nitrógeno (nitrato de amonio). La producción máxima obtenida de enzimas inulinasas fue de 2,85 U mL⁻¹. Experimentalmente el valor obtenido de la actividad enzimática fue de 3,35 U mL⁻¹ que se puede observar en la Figura 15, en la parte roja más oscura.

Según Angel, Kavitha, Vidyadharani y Roy, (2012) la cantidad óptima de sustrato que debe contener un medio para la producción de inulina es de 2% de inulina en el cultivo, cuando se emplea cepas de *Lactobacillus casei*; lo que indica una producción considerable de enzimas. Otro estudio de Ge, Qian, y Zhang, (2009) utilizan cepas de *L. casei*, donde la fuente de carbono son

tubérculos de alcachofa de jerusalem y optimizaron las condiciones cultivo y la producción de inulinasas fue de 50 U L^{-1} y también una producción de ácido láctico, el mismo que se aproxima a la producción de inulinasas que se obtuvieron en el presente estudio.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones

En el presente estudio se obtuvieron las máximas concentraciones de enzima extracelular a las 74 horas de crecimiento de la bacteria *Lactobacillus casei* a escala de laboratorio.

Se concluye que el valor óptimo de la fuente de carbono que se necesita para la producción de inulinasa utilizando una solución de residuos de espárragos es 50% v/v.

Del mismo modo se concluye que el valor óptimo de la fuente de nitrógeno necesaria para la producción de inulinasa utilizando nitrato de amonio es de 1,8 g L⁻¹, estos valores se obtuvieron gracias al uso de un diseño central compuesto.

La actividad enzimática máxima que se obtuvo del proceso de optimización es de 3,35 U mL⁻¹ de la enzima inulinasa, sobre una solución de espárragos rica en inulina. Los parámetros cinéticos fueron de velocidad específica de crecimiento de 0,05 h⁻¹; velocidad máxima de crecimiento de 0,23 h⁻¹; tiempo de duplicación de 13,86 h y productividad global de biomasa de 0,08 g L⁻¹ h⁻¹:

6.2 Recomendaciones

Se sugiere el estudio con otros tipos de sustratos que sean residuos orgánicos para probar una mayor producción de enzimas inulinasas utilizando la bacteria *Lactobacillus casei*

Se sugiere realizar la purificación parcial de la enzima inulinasa y medir la actividad específica después de cada purificación.

Se recomienda realizar un estudio que sea complementario, en el cual se determinen los tipos de proteínas que se encuentran en el extracto, utilizando técnicas de purificación y separación de proteínas.

Para complementar la investigación se sugiere realizar el estudio a escala de banco.

REFERENCIAS

- Acosta Durán, C. M. (2013). Precomposteo De Residuos Orgánicos Y Su Efecto. *Agronomía. Costarricense.*, 37(1), 127–139 ISSN:0377-9424 / 2013 Recuperado el 20 de mayo de 2018 de: <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/agrocost/article/view/10718>
- Aguirre E, Ramírez A., A. J. y À. M. (2009). PRODUCTION OF FREEZE DRIED PROTEIN AND Lactobacillus casei PROBIOTIC, 8(1), 67–76. Recuperado el 10 de abril de 2018 de: www.elsevier.com/locate/biortec
- Arnáiz, C., Isac, L., y Lebrato, J. (2000). Determinación de la biomasa en procesos biológicos. *Tecnología Del Agua*, 45–52. Recuperado el 10 de abril de 2018 de: <http://hdl.handle.net/11441/34261>
- Aruna, K., y Hati, A. (2014). Optimization of Inulinase Production by Bacillus sp . B51f Isolated from Rhizosphere Soil of Agave sisalana. *International Journal of Pure y Applied Bioscience*, 2(3), 161–176. ISSN: 2320 – 7051 Recuperado el 22 de abril de 2018 de: <http://www.ijpab.com/form/2014%20Volume%202,%20issue%203/IJ-PAB-2014-2-3-161-176.pdf>
- Ayyachamy, M., Khelawan, K., Pillay, D., Permaul, K., y Singh, S. (2007). Production of inulinase by Xanthomonas campestris pv phaseoli using onion (Allium cepa) and garlic (Allium sativum) peels in solid state cultivation. *Letters in Applied Microbiology*, 45(4), 439–444. Recuperado el 22 de mayo de 2018 de: <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02222.x>
- Baston, O., y Neagu, C. (2013). Establishing the optimal conditions for fructose production from chicory inulin. *Romanian Biotechnological Letters*, 18(3), 8263–8270. Recuperado el 15 de Junio de 2018 de: <https://www.rombio.eu/vol18nr3/5%20Baston.pdf>
- Battaner Arias, E. (2014). *Compendio de enzimología*: Ediciones Universidad de Salamanca. Recuperado el 15 de Junio de 2018 de: <https://books.google.com.ec/books?id=gdf0AgAAQBAJ>
- Calderón, A. C., y Maggi, R. C. (2010). Scientia Agropecuaria Inulinase production by yeast Kluyveromyces marxianus. *Scientia Agropecuaria*, 1, 235–245. Recuperado el 15 de Junio de 2018 de: <http://revistas.unitru.edu.pe/index.php/scientiaagrop/article/view/46/48>
- Campos, R., Elizabeth, M., Mosqueda, R., Cruz, M., y Claudia, A. G. (n.d.). Evaluación de Lactobacillus casei y Lactobacillus acidophilus como agentes probióticos sobre la resistencia a infecciones, 354–357. Recuperado el 16 de Junio de 2018 de: <https://expeditiorepositorio.utadeo.edu.co/handle/20.500.12010/1230>

- Cando, C. (2014). Estadísticas de Información Ambiental Económica en Gobiernos Autónomos Descentralizados Municipales. *INEC*, 30. Recuperado el 22 de Junio de 2018 de: <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/ambiente/>
- Cartes, P. (2005). Viabilidad de las Cepas de *Lactobacillus casei shirota* y *Bifidobacterium lactis* en un Postre de Leche con Salsa de Cranberry. *Science*, 88. Recuperado el 11 de Agosto de 2018 de: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2005/fac244v/doc/fac244v.pdf>
- Chi, Z., Chii, Z., Zhang, T., Liu, G., y Yue, L. (2009). Inulinase-expressing microorganisms and applications of inulinases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82(2), 211–220. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1827-1>
- Christensen, H. N., y Palmer, G. A. (1980). *Cinética enzimática: curso programado para estudiantes de medicina y ciencias biológicas*. Reverté. Retrieved from <https://books.google.com.ec/books?id=mmgo2fIX50wC>
- Cobo Sanz, J. M., Mateos, J. A., y Muñoz Conejo, A. (2006). Efecto de *Lactobacillus casei* sobre la incidencia de procesos infecciosos en niños/as. *Nutricion Hospitalaria*, 21(4), 547–551. ISSN 1699-5198 Recuperado el 17 de Marzo de 2018 de: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112006000700013
- Douillard, F. P., Ribbera, A., Järvinen, H. M., Kant, R., Pietilä, T. E., Randazzo, C., ... de Vosa, W. M. (2013). Comparative genomic and functional analysis of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus rhamnosus* strains marketed as probiotics. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(6), 1923–1933. Recuperado el 16 de Mayo de 2018 de: <https://doi.org/10.1128/AEM.03467-12>
- Ertan, Tülin, F. y E. (2003). Determination of Optimum cultivation conditions on the production of inulinase from *Rhizoctonia solani*. Pakistan. Recuperado el 29 de Marzo de 2018 de: <https://doi.org/1028-8880>
- García A, Polaina J, H. I. (2016). COMPUESTOS PREBIÓTICOS Trabajo Fin de Máster Universitario en. *Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*. Recuperado el 5 de Abril de 2018 de: <http://w1.iata.csic.es/memoria/Memoria2005/Mem2004-2005.pdf>
- Ge, X. Y., Qian, H., y Zhang, W. G. (2009). Improvement of l-lactic acid production from Jerusalem artichoke tubers by mixed culture of *Aspergillus niger* and *Lactobacillus* sp. *Bioresource Technology*, 100(5), 1872–1874. Recuperado el 26 de abril de: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.09.049>
- Himedia Laboratories. (2010). *Lactobacillus* MRS Broth. *Lactobacillus MRS Broth (MRS Broth)*, 231(5), 2. Recuperado el 02 de Mayo de 2018 de: <http://www.himedialabs.com/TD/M369.pdf>

- Hofvendahl, K., y Hahn–Hägerdal, B. (2000). Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources¹. *Enzyme and Microbial Technology*, 26(2–4), 87–107. Recuperado el 22 de Marzo de 2018 de: [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(99\)00155-6](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(99)00155-6)
- James, M., Velastegui, E., y Cruz, M. A. (2017). Evaluación de las condiciones de cultivo de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei* a nivel de laboratorio , con inulina como fuente de carbono. *Bionatura*, 2(593), 235–240. Recuperado el 3 de Junio de 2018 de: <https://doi.org/10.21931/RB/2017.02.01.4>
- Johnson, E. A., y Echavarri-Erasun, C. (2011a). *Yeast biotechnology. The Yeasts* (Vol. 1). Elsevier B.V. Recuperado el 11 de Febrero de 2018 de: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00003-3>
- Johnson, E. A., y Echavarri-Erasun, C. (2011b). *Yeast biotechnology. The Yeasts* (Vol. 1). Elsevier B.V. Recuperado el 26 de febrero de 2018 de: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00003-3>
- Jurado Gámez, H., Calpa Yamá, F., y Chaspuengal Tulcán, A. (2014). Determinación de parámetros cinéticos de *Lactobacillus casei* en dos medios probióticos. *Veterinaria y Zootecnia*, 8(2), 15–35. Recuperado el 08 de Abril de 2018 de: <https://doi.org/10.17151/vetzo.2014.8.2.2>
- Kamiya. (2011). Effect of probiotics on intestinal infection. *Department of Infectious Diseases, Kyorin University School of Medicine*, 9(3), 171–178. Recuperado el 05 de Junio de 2018 de: <https://doi.org/10.5217/ir.2011.9.3.171>
- Kavitha, Angel, Vidyadharani, Roy, D. (2012). Isolation of Inulinase Producing bacteria from sugarcane soil. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, 3(4). Recuperado el 23 de Mayo de 2018 de: https://pdfs.semanticscholar.org/7de3/efb02be4a2900b17da348a899815d3dc7607.pdf?_ga=2.264541068.2016404167.1536085532-859161132.1536085532
- Koolman, J., y Röhm, K. H. (2005). *Bioquímica: texto y atlas*. Editorial Médica Panamericana. Recuperado el 09 de Mayo de 2018 de: <https://books.google.com.ec/books?id=f61Mvd-vl60C>
- Laowklom, N., Chantanaphan, R., y Pinphanichakarn, P. (2012). Production, Purification and Characterization of Inulinase from a Newly Isolated *Streptomyces* sp. CP01. *Natural Resources*, 03(03), 137–144. Recuperado el 15 de Abril de 2018 de: <https://doi.org/10.4236/nr.2012.33018>
- Lara, M., Lara, P., Pérez, A. y Cortés, I. (2017). Avances en la producción de inulina Advances on the inulin production, XXXVII(2), 352–366. Recuperado el 11 de Abril de 2018 de: <http://revistas.unitru.edu.pe/index.php/scientiaagrop/oai>

- Luján. (2007). Caracterización y estudio de la fagorresistencia " Recuperado el 22 de Mayo de 2018 de: <http://bibliotecavirtual.unl.edu.ar/tesis/handle/11185/128>
- Marin A, Z. T., Cortés R, M., y Montoya C, O. I. (2009). Evaluación de la viabilidad de crecimiento de la cepa nativa *Lactobacillus plantarum* LPBM10 y la cepa comercial *Lactobacillus casei* ATCC 393 en pulpa de uchuva y en solución isotónica de glucosa. *Vitae*, 16(2), 210–217. Recuperado el 27 de febrero de 2018 de: <http://www.scielo.org.co/pdf/vitae/v16n2/v16n2a05.pdf>.
- Meena, G. S., Kumar, N., Majumdar, G. C., Banerjee, R., Meena, P. K., y Yadav, V. (2014). Growth characteristics modeling of *Lactobacillus acidophilus* using RSM and ANN. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57(1), 15–22. Recuperado el 20 de Abril de 2018 de: <https://doi.org/10.1590/S1516-89132014000100003>
- Mejía, Chacón, Guerrero, Balmore, O. y L. (2007). Obtención de cepas de *Lactobacillus*.: Caracterización in-vitro como potenciales probióticas. *Scielo*, 2(17), 178–185. Recuperado el 14 de Abril de 2018 de: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=95917212>
- Miller. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(III), 426–428. Recuperado el 19 de Marzo de 2018 de <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac60147a030>
- Montañez-Soto, J., Venegas-González, J., Vivar-Vera, M., y Ramos-Ramirez, E. (2011). Extracción, caracterización y cuantificación de los fructanos contenidos en la cabeza y en las hojas del *Agave tequilana* Weber azul. *Bioagro*, 23(3), 199–206. Recuperado el 22 de mayo de 2018 de: [http://www.ucla.edu.ve/bioagro/Rev23\(3\)/7.%20Extracci%C3%B3n,%20caracterizaci%C3%B3n%20y%20cuantificaci%C3%B3n%20de%20fructanos.pdf](http://www.ucla.edu.ve/bioagro/Rev23(3)/7.%20Extracci%C3%B3n,%20caracterizaci%C3%B3n%20y%20cuantificaci%C3%B3n%20de%20fructanos.pdf)
- Müller Esterl, W. (2008). *Bioquímica. Fundamentos para Medicina y Ciencias de la Vida*. Editorial Reverté. Retrieved from Recuperado el 01 de mayo de 2018 de: <https://books.google.com.ec/books?id=X2YVG6Fzp1UC>
- Nascimento, D. S., Junior, G. V., Fernandes, P., Ribeiro, G. C. A., Lima, D. M., Góes-Neto, A., ... de Assis, S. A. (2012). Production, characterization and application of inulinase from fungal endophyte CCMB 328. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 84(2), 443–453. Recupero el 1 de mayo de 2018 de: <https://doi.org/10.1590/S0001-37652012005000035>
- Neogen. (2010). *Lactobacillus* MRS Broth. *Acumedia PI*, 231(5), 2. Recuperado de 25 de Marzo de 2018 de: <http://himedialabs.com/TD/M369.pdf>
- Oh, S., Rheem, S., Sim, J., Kim, S., Baek, Y., Oh, S., y Kim, S. (1995).

Optimizing Conditions for the Growth of *Lactobacillus casei* YIT 9018 in Tryptone- Yeast Extract-Glucose M, 61(11), 3809–3814. Recuperado el 20 de Mayo de 2018 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8526490>

- Onyenweaku, F., Obeagu, E. I., Ifediora, A. C., y Nwandikor, U. U. (2016). OF INNOVATIVE AND APPLIED RESEARCH RESEARCH ARTICLE HEALTH BENEFITS OF PROBIOTICS. *International Journal of Innovative and Applied Research*, 4, 21–30. Recuperado el 11 de mayo de 2018 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3544614/>
- P, D. (1995). Enzimas, cinética e inhibición. *Academic Press Limited*, 1(8), 189–210. Recuperado el 10 de Mayo de 2018 de: https://www.upo.es/depa/webdex/quimfis/miembros/Web_Sofia/GRUPOS/Tema%207
- Panesso, G., Pardo, M., y Sepúlveda, L. (2015). Producción de Ácido láctico (*Lactobacillus casei*), Recuperado el 16 de junio de 2018 de: https://www.researchgate.net/publication/278414362_Produccion_de_Acido_lactico_lactobacillus_casei
- Ramírez, J. C., Ulloa, P., Velázquez, M., Ulloa, J., y Arce, F. (2011). Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. Recuperado el 16 de junio de 2018 de: http://www.hablemosclaro.org/repositorio/biblioteca/b_305_bacterias_lacticas_importancia_en_alimentos.pdf
- Rodrigues, L., Moldes, A., Teixeira, J., y Oliveira, R. (2006). Kinetic study of fermentative biosurfactant production by *Lactobacillus* strains. *Biochemical Engineering Journal*, 28(2), 109–116. Recuperado el 11 de junio de 2018 de: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2005.06.001>
- Ros, M., Fernandes, S., y Jiang, B. (2013). Fungal Inulinases as Potential Enzymes for Application in the Food Industry, 5(8), 1031–1042. DOI: 10.19026/ajfst.5.3201. Recuperado el 15 de marzo de 2018 de: https://www.researchgate.net/publication/285993720_Fungal_Inulinases_as_Potential_Enzymes_for_Application_in_the_Food_Industry
- Samaniego Fernandez Luz M., S. del C. M. (2010). *Lactobacillus* spp: Importante promotores de actividad probiótica, antimicrobiana y bioconservadora. *Centro de Estudios Biotecnológicos . Facultad de Agronomía. Universidad de Matanza, reseña*, 34. Recuperado el 05 de mayo de 2018 de: www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_nlinksyref=000108ypid=S1692
- Sánchez, C., Mejía, C., Figueroa, C., Esquivia, M., Agudelo, L., Zapata, N., y Gómez, M. (2005). ESTUDIO DE CEPAS NATIVAS AMILOLÍTICAS. Recuperado el 11 de mayo de 2018 de: <http://www.scielo.org.co/pdf/vitae/v12n2/v12n2a03>

- Sánchez, V., David, R., Urrutia, T., Gastón, R., Escalante, S., Vargas-sánchez, R. D., y Torrescano-urrutia, G. R. (2013). El propóleos : conservador potencial para la industria alimentaria, *38*, 705–711. Recuperado el 1 de junio de 2018 de: <http://www.redalyc.org/html/339/33929482003/>
- Saucedo García, M. (2017). Tópicos agropecuarios, Recuperado el 20 de marzo de 2018 de: <http://www.fao.org/docrep/004/x2919s/x2919s05>
- Shahravy, A., Tabandeh, F., Bambai, B., Zamanizadeh, H. R., y Mizani, M. (2012). Optimizacija produkcije probiotika pomoću soja lactobacillus casei ATCC 334 korijenjem praha urme kao izvora ugljenika. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, *18*(2), 273–282. Recuperado el 5 de Mayo de 2018 de: <https://doi.org/10.2298/CICEQ110709004S>
- Shinde, V., Deshmukh, S., y Bhojar, M. G. (2015). Applications of Major Enzymes in Food Industry. *Indian Farmer*, *2*(6), 497–502. Recuperado el 01 de junio de 2018 de: <http://www.phytojournal.com/archives/2017/vol6issue6/PartAE/6-6-342-439>
- Shoaib, M., Shehzad, A., Omar, M., Rakha, A., Raza, H., Sharif, H. R., ... Niazi, S. (2016). Inulin: Properties, health benefits and food applications. *Carbohydrate Polymers*, *147*, 444–454. Recurado el 17 de Mayo de 2018 de: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.04.020>
- Singh Nee Nigam, P., y Pandey, A. (2009). *Biotechnology for agro-industrial residues utilisation: Utilisation of agro-residues. Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation: Utilisation of Agro-Residues*. Recuperado el 16 de mayo de 2018 de: <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9942-7>
- Singh, P., y Gill, P. K. (2006). Production of Inulinases : Recent Advances, *44*(2), 151–162. Recuperado el 28 de marzo de 2018 de: <http://www.ftb.com.hr/archives/80-volume-44-issue-no-2/444-production-of-inulinases-recent-advances>
- Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., y Kumar, P. (2016). Microbial enzymes : industrial progress in 21st century. *3 Biotech*, *6*(2), 1–15. Recuperado el 15 de mayo de 2018 de: <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0485-8>
- Singh, R. S., y Chauhan, K. (2017). Inulinase production from a new inulinase producer, *Penicillium oxalicum* BGPUP-4. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *9*(June 2016), 1–10. Recuperado el 17 de mayo de 2018 de: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.10.012>
- Smetanková, J., Hladíková, Z., František, V., Zimanová, M., Kohajdová, Z., Greif, G., y Greifová, M. (2012). Influence of aerobic and anaerobic conditions on the growth and metabolism of selected strains of *Lactobacillus plantarum*. *Acta Chimica Slovaca*, *5*(2), 204–210. Recuperado el 20 de marzo de 2018 de:

<https://doi.org/10.2478/v10188-012-0031-1>

- Tharun, S., Guttikonda, K., Vanitha, S., y Anuradha, K. (2017). Screening of inulinase producing bacteria from diverse sources, 8(4), 695–701. Recuperado el 15 de mayo de 2018 de: <https://biosciencediscovery.com/Vol%208%20No%204/Sai695-701>
- Tiptiri-Kourpeti, A., Spyridopoulou, K., Santarmaki, V., Aindelis, G., Tompoulidou, E., Lamprianidou, E. E., ... Chlichlia, K. (2016). Lactobacillus casei exerts anti-proliferative effects accompanied by apoptotic cell death and up-regulation of TRAIL in colon carcinoma cells. *PLoS ONE*, 11(2), 1–20. Recuperado el 17 de 2018 de: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147960>
- Torres, C. y. (2010). IMPLEMENTACIÓN DE DIFERENTES TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE BIOMASA BACTERIANA DE CEPAS *Pseudomonas putida* BIODEGRADADORAS DE FENOL. Vol. 23 Núm. 1 (2010): Revista ION. Recuperado el 02 de marzo de 2018 de: <http://revistas.uis.edu.co/index.php/revistaion/article/view/954>
- VELASQUEZ-TELLEZ, J. A., GIRALDO-GIRALDO, G., PADILLA-SANABRIA, L., y GIRALDO-CASTAÑO, Y. M. (2015a). CRECIMIENTO DE *Lactobacillus casei ssp casei* ATCC 393 EN SUERO CLARIFICADO. *Biología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 13(1), 19–27. Recuperado el 30 de mayo de 2018 de: <http://revistabiologia.unicauca.edu.co/revista/index.php/biologia/article/view/366>
- VELASQUEZ-TELLEZ, J. A., GIRALDO-GIRALDO, G., PADILLA-SANABRIA, L., y GIRALDO-CASTAÑO, Y. M. (2015b). CRECIMIENTO DE *Lactobacillus casei ssp casei* ATCC 393 EN SUERO CLARIFICADO. *Biología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 13(1), 19–27. Recuperado el 02 de junio de 2018 de: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-35612015000100003&lang=pt
- Zapata, hoyos y Q. (2005). Parámetros cinéticos de crecimientos de *Saccharomyces cerevisiae* en presencia de un campo magnético variable de baja intensidad y alta frecuencia. *Vitae, Revista de La Facultad de Química Farmacéutica*, 12(0121-4004), 39–44. Recuperado el 14 de mayo de 2018 de: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0121-40042005000100005
- Zheng, K., Wu, L., He, Z., Yang, B., y Yang, Y. (2017). Measurement of the total protein in serum by biuret method with uncertainty evaluation. *Measurement*, 112(15), 16–21. Recuperado el 23 de mayo de 2018 de: <https://doi.org/10.1016/j.measurement.2017.08.013>

