



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

PRODUCCIÓN DE α AMILASAS MEDIANTE FERMENTACIÓN SUBMERSA
DE *ASPERGILLUS NIGER* PARA SU EMPLEO EN PROCESOS
DE PANIFICACIÓN

Autora

Yessenia Magali Cueva Calva

Año
2017



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

PRODUCCIÓN DE α AMILASAS MEDIANTE FERMENTACIÓN SUBMERSA
DE *ASPERGILLUS NIGER* PARA SU EMPLEO EN PROCESOS DE
PANIFICACIÓN

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

Profesora guía
MSc. Mayra Fernanda Chico Terán

Autora
Yessenia Magali Cueva Calva

Año
2017

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con la estudiante, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación.

Mayra Fernanda Chico Terán

Máster en Biotecnología

C.I: 1003327044

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

Declaro haber revisado este trabajo, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación.

Wilson David Tapia López

Magíster en Gestión y Planificación Ambiental

C.I: 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 respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.

Yessenia Magali Cueva Calva

C.I: 1105756470

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi madre y padre por todo su apoyo y comprensión a lo largo mi carrera.

Agradezco de todo corazón a mis profesoras guías María Alejandra Cruz y Mayra Fernanda Chico y a mi docente corrector Wilson Tapia López, por orientarme con todos sus conocimientos durante la ejecución del presente estudio.

Agradezco a la licenciada Mayra Rojas coordinadora de los laboratorios de la UDLA por permitirme llevar a cabo la parte experimental de mi estudio.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a Dios por ser la luz que ilumina mis días y el guía de mi camino durante toda mi vida.

A mi madre, por ser el pilar fundamental de mi vida y por darme la fortaleza y coraje para no rendirme jamás y culminar mis estudios universitarios.

RESUMEN

Aspergillus niger es el hongo más empleado en la producción de α amilasas comerciales. El incremento de la actividad de esta enzima será de mucha utilidad en la industria de panificación. En el presente estudio se realizó la producción y caracterización de α amilasas a partir de la fermentación submersa de *Aspergillus niger* van Tieghem (ATCC® 6275) en almidón de trigo como sustrato. Se optimizó las condiciones de cultivo mediante la variación de la fuente de nitrógeno y su concentración para alcanzar el rendimiento máximo de la enzima. Se registró la mayor producción de biomasa ($10,57 \text{ g L}^{-1}$) y mejor actividad de la enzima ($6,31 \text{ U mL}^{-1}$ de proteína) luego de 7 días incubación a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ y 160 rpm . Se utilizó un Diseño Central Compuesto (DCC) y el método de superficie de repuesta (MRS) para identificar qué tipo de fuente de nitrógeno generaba la mayor concentración de biomasa y actividad de la enzima. Entre las diferentes fuentes de nitrógeno utilizadas (extracto de levadura, peptona y caseína), la adición de un activador (CaCl_2 $6,36 \text{ mM}$) y la purificación enzimática mediante ultrafiltración y precipitación con sulfato de amonio, se obtuvo el rendimiento máximo de la enzima en condiciones optimizadas. Bajo las condiciones de cultivo optimizadas, es decir a partir del precipitado enzimático de la fermentación con fuente de nitrógeno: 2 g L^{-1} de extracto de levadura (T1) y activador CaCl_2 $6,36 \text{ mM}$, la máxima producción de biomasa fue de $11,21 \text{ g L}^{-1}$ y la mejor actividad de la α amilasa fue de $6,52 \text{ U mL}^{-1}$ de proteína. Las α amilasas purificadas y empleadas en la elaboración de pan de yema mejoraron las características organolépticas de este producto, comprobado mediante la evaluación sensorial y degustación del público.

Palabras clave: *Aspergillus niger*, fermentación submersa, α amilasas, concentración de biomasa, actividad enzimática.

ABSTRACT

Aspergillus niger is the most commonly used fungus in the production of commercial α -amylases. The increase in the activity of this enzyme will be very useful in the baking industry. In the present study, the production and characterization of α -amylases from the submerged fermentation of *Aspergillus niger* van Tieghem (ATCC® 6275) in wheat starch as substrate was carried out. The culture conditions were optimized by varying the nitrogen source and its concentration to achieve the maximum yield of the enzyme. The highest biomass production (10.57 g L^{-1}) and better enzyme activity (6.31 U mL^{-1} protein) was recorded after 7 days incubation at 25°C and 160 rpm. A Central Composite Design (DCC) and surface response method (MRS) were used to identify which type of nitrogen source generated the highest concentration of biomass and enzyme activity. Among the different sources of nitrogen used (yeast extract, peptone and casein), addition of an activator (6.36 mM CaCl_2) and enzymatic purification by ultrafiltration and ammonium sulfate precipitation, the maximum yield of the enzyme Under optimized conditions. Under the optimized culture conditions, that is from the enzymatic precipitate of fermentation with nitrogen source: 2 g L^{-1} of yeast extract (T1) and 6.36 mM CaCl_2 activator, the maximum biomass production was 11.21 g L^{-1} and the best α -amylase activity was 6.52 U mL^{-1} protein. The α -amylases purified and used in the yolk breeding improved the organoleptic characteristics of this product, as evidenced by the sensorial evaluation and tasting of the public.

Keywords: *Aspergillus niger*, submerged fermentation, α -amylases, biomass concentration, enzymatic activity.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Antecedentes	1
1.2 Planteamiento del problema.....	5
1.3 Objetivos	6
1.3.1 Objetivo General.....	6
1.3.2 Objetivos específicos	6
1.4 Justificación de la Investigación	7
2. MARCO TEÓRICO	10
2.1 Generalidades sobre el pan.....	10
2.1.1 Pasos para la elaboración.....	10
2.1.2 Valor nutricional.....	13
2.1.2.1 Pan común	13
2.1.2.2 Pan integral.....	14
2.1.3 Ingredientes utilizados en la elaboración del pan	17
2.1.3.1 El trigo	17
2.1.3.4.1 2.1.3.2 Variedades de trigo	17
2.1.3.3 La harina de trigo	18
2.1.3.4 Características de extensión-tracción de la harina de trigo ...	18
2.1.3.5 Clasificación de la harina de trigo	19
2.1.3.6 Calidad de la harina de trigo	22
2.1.3.7 Clasificación comercial de la harina de trigo	22
2.1.3.8 Composición química de la harina de trigo	23
2.1.3.8 El almidón.....	28
Descripción de la composición química y estructural del almidón	28
Importancia de la gelatinización del almidón	29
El papel del almidón en la panificación.....	30
El aporte del almidón en la fermentación de la masa	31
2.2 Tipos de amilasas.....	31
2.2.1 Las β amilasas	32
2.2.2 Las α amilasas	32

2.2.2.1	Estructura molecular las α amilasas.....	32
2.2.2.2	Modo de acción de las α amilasas	33
2.2.2.3	Aplicaciones de las α amilasas en la industria	34
2.2.2.4	Fuentes de obtención de α amilasas.....	35
2.2.2.5	Morfología de <i>Aspergillus niger</i>	35
2.2.2.6	Fermentación	37
2.2.2.7	Determinación de la actividad enzimática	37
2.2.2.8	Purificación de las α amilasas.....	39
3.	DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL	39
4.	PROCEDIMIENTOS	42
4.1	Población y muestra.....	42
4.2	Materiales y métodos para la obtención de los datos.....	43
4.3	Evaluación estadística de los resultados	64
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	65
6.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	137
6.1	Conclusiones.....	137
6.2	Recomendaciones	137
	REFERENCIAS.....	139
	ANEXOS	159

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

Las industrias de procesamiento de alimentos de todo el mundo, buscan satisfacer cada vez más las exigencias de la creciente demanda del mercado. Además, están enfocadas en mantener principalmente la seguridad alimentaria y el control de calidad de cada uno de sus productos (Floros et al., 2011).

La industria de panificación ecuatoriana, constantemente busca mejorar su calidad para entregar a sus clientes productos más atractivos y conservar su demanda o incrementarla (Boatella, Condo y López, 2012). La calidad del pan depende de la mano de obra, pero también de los ingredientes que se utilizan para su elaboración como: harina de trigo, agua, levadura, huevos, manteca, sal, entre otros (Boatella et al., 2014). La harina de trigo es uno de los ingredientes que define con mayor grado la calidad del pan. Esta requiere un alto contenido proteico de α y β amilasas las cuales hidrolizan los azúcares complejos del almidón de la harina en azúcares sencillos, permitiendo una correcta fermentación por parte de microorganismos como *Saccharomyces cerevisiae* encargados de llevar a cabo este proceso y del correcto leudado de la masa (reposo de la masa a 24-27°C) (Cauvin, 2015).

Una concentración óptima de α amilasas en la harina de trigo permite una mayor hidrólisis de los enlaces α -1,4 glucosídicos de las cadenas de los azúcares (amilosa y amilopectina) del almidón, aumentando considerablemente el volumen y textura del pan luego del horneado, generando además una porosidad de miga más fina que retarda su envejecimiento y mejora las características organolépticas del mismo, por consiguiente, la producción de α amilasas es esencial para la conversión de los almidones en oligosacáridos durante los procesos de gelatinización, dextrinización y sacarificación del pan (Cauvin, 2015; Soares, Távora, Barcelos y Baroni, 2012).

La obtención de α amilasas se ha llevado a cabo utilizando varios tipos de fermentaciones entre las que se más destacan: la fermentación submersa o en estado líquido y la fermentación en estado sólido. La optimización de las condiciones de fermentación, en particular los parámetros físico-químicos en ambos tipos de fermentaciones, son muy importantes para el desarrollo de los procesos fermentativos especialmente para estimular la viabilidad del proceso total y disminuir los costos de producción (Monteiro y Oliveira, 2012). La fermentación submersa a diferencia de la fermentación en estado sólido, permite producir una mayor cantidad de α amilasas de forma más eficiente, debido a que existe una mejor transferencia de materia y energía, además de un mejor control de los parámetros físico-químicos (pH, temperatura, termostabilidad, aireación, agitación y concentración de las fuentes de carbono y nitrógeno) (Kriaa y Kammoun, 2016; Moreno, Moral, García, Pascual y Bernal, 2014).

Gracias a la termoestabilidad de las enzimas α amilasas, se pueden mantener las propiedades requeridas: textura, esponjosidad y flexibilidad de la masa del pan, durante y después del horneado, llegando a soportar incluso temperaturas de 85 a 180 °C (Soares et al., 2012; Sudarram y Krishna, 2013). Es así que, las α amilasas utilizadas en la industria del almidón deben presentar las siguientes características: estar activas, estables a pH bajo y tener un costo asequible para su uso a gran escala, características obtenidas en su mayoría por fermentación submersa a partir de ciertos microorganismos (Soares et al., 2012).

En la actualidad, una gran cantidad de microorganismos se destina a la producción comercial de amilasas aplicadas en la hidrólisis del almidón en procesos industriales de refinamiento de este polisacárido. Las especies como *Aspergillus* y *Rhizopus* son las más importantes dentro del grupo de los hongos filamentosos para la obtención de amilasas. Para la producción a gran escala de estas enzimas, se han utilizado los siguientes microorganismos: *Aspergillus niger*, *A. awamori*, *A. oryzae*, *Humicola insolens*, *Fusarium oxysporum*,

Trichoderma viridae y *Mucor posillus*. Los microorganismos estudiados para la producción de α amilasas son: *Aspergillus niger*, *A. saitri*, *A. fumigatus*, *A. foetidus*, *A. terreus* y *Rizhopus delemar* obteniendo un mayor rendimiento a partir de las especies de *Aspergillus niger*, *A. sp*, *Endomyces* y *Rizhopus* (Gupta, 2016; Soares et al., 2012).

Aspergillus niger ha sido ampliamente utilizado para la producción de enzimas durante siglos, esto se debe a su alta capacidad de proliferación y producción de enzimas extracelulares como es el caso de las α amilasas (Soares et al., 2012). Según Tiwari y otros (2015); *Aspergillus niger* por su poder hidrolítico, su tolerancia a la acidez (pH <3), e inhibición de la proliferación bacteriana, es un excelente candidato para la producción de α amilasas de gran utilidad en la industria de panificación. Dicho hongo no sólo produce α amilasas sino más de 40 enzimas de interés industrial, siendo considerado una de las pocas especies del reino Fungi clasificado como GRAS (generalmente reconocidos como seguros) por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) (FDA, 2012; Soares et al., 2012).

En un estudio realizado por Suganthi y otros (2011); comprobaron la obtención de α amilasas a partir del aislamiento y fermentación líquida de una de las cepas (BAN3E) de *Aspergillus niger* proveniente de desechos industriales ricos en almidón, concluyendo que esta enzima tras su purificación podría utilizarse en la elaboración de productos de panificación.

Estudios realizados por Caballero, Gómez y Roseli (2012); han demostrado que; la adición de enzimas de origen fúngico como las α -amilasas, xilanasas y proteasas, influyen en la correcta hidrólisis del almidón en la red de gluten de la harina, lo que trae consigo un mejoramiento en la textura de la masa, un aumento en el volumen del pan durante el horneado y una estructura de miga más fina que retarda su envejecimiento.

En Ecuador, estudios realizados por Ronquillo (2012); también han podido demostrar que; la adición de α amilasas fúngicas en un pan tipo muffin

elaborado con distintos tipos de harina nacional e importada, han permitido un leve mejoramiento de la textura, volumen y el tiempo de vida útil de este producto.

Un estudio realizado por Varalakshmi y otros (2011); demostró que la optimización de las fuentes de carbono a partir de almidón soluble y nitrógeno a partir de extracto de carne al 1%, incrementaron la actividad enzimática y la producción de α amilasas tanto en la fermentación submersa como en estado sólido de *Aspergillus niger* JGI 24.

Estudios realizados por Khan y Jadav (2011); demostraron que *Aspergillus niger* MJSU1101 identificado luego del aislamiento y fermentación en estado sólido, desarrollado en 4 sustratos: cáscaras de arroz, residuos de maíz, salvado de trigo y residuos vegetales (berenjena, tomate y papa) bajo una temperatura de 28 °C, 150 rpm y pH de 6,2, mostró una mejor actividad con el salvado de trigo ($0,08 \text{ U ml}^{-1} \text{ min}^{-1}$) luego de 7 días de fermentación.

Entre las técnicas de purificación de proteínas fúngicas más destacadas están: las cromatografías de intercambio iónico y filtración en gel (Gulati, Chadha y Saini, 2013). En un estudio Karnchanatat y otros (2011); utilizaron la combinación de las cromatografías de intercambio iónico y filtración en gel para purificar y caracterizar de forma bioquímica una enzima extracelular conocida como beta-glucosidasa a partir del hongo *Daldinia eschscholzii* extraído de madera en descomposición. A pesar de los resultados altamente sensibles y específicos que este tipo de cromatografías ofrece para la purificación de enzimas fúngicas, su costo elevado imposibilita su uso a gran escala, motivo por el cual, la industria de alimentos y bebidas ha optado por utilizar métodos más sencillos de purificación, como la ultrafiltración y precipitación con sulfato de amonio, especialmente para procedimientos en los cuales se emplean microorganismos GRAS como es el caso de *Aspergillus niger* (Rodríguez et al., 2013; Sariyska, Gargova, Koleva y Angelov, 2012; Soares et al., 2012).

Hoy en día especialmente en países desarrollados, un gran número de α amilasas microbianas están disponibles comercialmente y han sustituido casi por completo la hidrólisis química del almidón en la industria de procesamiento de este polisacárido, permitiendo establecer mediante su uso una mejor calidad en las industrias de panificación (Soares et al., 2012). Sin embargo, la utilización de estas enzimas microbianas aún no se emplea en las industrias de panificación ecuatoriana, por lo que sería de gran valor económico implementarlas ya que reduciría la importación de la harina la cual ha aumentado de precio en los últimos años (INEC, 2011).

1.2 Planteamiento del problema

Actualmente, Ecuador importa el 97% de la harina de trigo utilizada para la elaboración de productos de panificación y con su aplicación se consigue un mayor aumento en la calidad que al utilizar harina ecuatoriana, la cual está en desuso a consecuencia de las condiciones climáticas desfavorables del cultivo del trigo en el país (INEC, 2012).

A pesar de que la demanda de los productos de panificación sigue siendo alta en Ecuador, si se ha notado una continua disminución de esta, con el pasar de los años debido a la reducción de la calidad de los productos de panadería y molinería (INEC, 2012). El uso de harina de trigo con un bajo contenido proteico es la causa principal de la reducción de la calidad de los productos de panadería, ya que mientras menor sea la cantidad de enzimas α amilasas en la harina, menor va ser la cantidad de rupturas o hidrólisis de los enlaces α -1,4 glucosídicos en el interior de las cadenas de amilopectina y amilosa del almidón de trigo, imposibilitando la transformación de los azúcares complejos en la cantidad necesaria de azúcares simples o de bajo peso molecular como: la glucosa, maltosa, maltotriosa y α dextrinas, que son más fácilmente asimilables y digeribles por la levadura *Saccharomyces cerevisiae* que se usa para fermentar la masa del pan. Del mismo modo, el bajo contenido de estos azúcares simples durante la fermentación, influyen posteriormente sobre la

textura de la masa haciéndola poco manejable durante el amasado, minimizando el volumen y crocancia del pan luego del horneado, obteniendo una mayor porosidad en la miga, que disminuye el tiempo de vida útil y las características organolépticas (olor, color y sabor) del pan (Fadilah, Rochmadi, Syamsiah y Haryadi, 2015; INEC, 2012; Shihui et al., 2016).

El bajo contenido proteico de la harina de importación, ha obligado a las industrias de panificación ecuatoriana a invertir en mejoradores de las características de la crocancia (puratos), volumen, sabor, apertura de la greña (pliegue en la superficie del pan) y miga, especialmente del pan tipo Baguette, mino Baguette, tostados, rústicos y calados. Se suma, además, el aumento de los costos de producción de los productos de panadería, los cuales se han duplicado desde el año 2007, no solo en el caso de la harina de trigo, sino también en otros ingredientes como: el azúcar, manteca y levadura (FAO, 2012; Flores, 2013; Levapan, 2016). Por tanto, es necesario obtener enzimas α amilasas de bajo costo, en gran cantidad y de forma natural evitando causar daños en el medio ambiente.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Obtener α amilasas del proceso de fermentación submersa de *Aspergillus niger* y su aplicación en el proceso de elaboración de productos de panificación.

1.3.2 Objetivos específicos

Optimizar las condiciones de cultivo de *Aspergillus niger* a partir de la fermentación submersa.

Determinar la producción de biomasa, actividad enzimática y rendimiento celular $Y_{X/S}$ de las α amilasas mediante espectrofotometría UV- Vis.

Purificar las α amilasas mediante ultrafiltración y precipitación con sulfato de amonio.

Comprobar las características organolépticas del pan elaborado con y sin α amilasas mediante una evaluación sensorial y degustación.

1.4 Justificación de la Investigación

Según la Encuesta Nacional de Nutrición, uno de los productos de mayor demanda de la industria de alimentos y bebidas, son los productos de panificación (INEC, 2012). Según datos de la FAO, los productos de panificación ocupan el tercer lugar con respecto a la demanda alimenticia no solo en Ecuador sino, en el mundo entero (FAO, 2012). Exclusivamente los productos de molinería y panadería representan el 9,2% del aporte económico total, percibido anualmente por la industria de alimentos y bebidas (INEC, 2010).

El pan, además de representar un buen aporte económico para el país, es un alimento de gran valor nutricional, ya que es bajo en grasas, rico en hidratos de carbono y una cantidad considerable de fibra (Valverde, 2013). Cada 10 g de pan aportan: 210 calorías, 52 g de hidratos de carbono, 7,5 g de proteínas, 1,3 g de grasas, 35% de agua, 7,5 g de fibra el pan blanco, 13,5 g de fibra el pan integral, aporte de vitaminas (B1, B6 y niacina) y minerales como el selenio, calcio, hierro, fósforo, magnesio y zinc (Valverde, 2013).

Satisfacer las exigencias del cliente siempre ha sido y será prioridad para una industria, es por ello que los productos de panadería deben tener buena calidad. En el país se consume un promedio de 320 000 toneladas de harina de trigo al año, destinadas principalmente a la elaboración del pan (INEC, 2011). En los últimos años las industrias de panificación ecuatoriana en busca de mejorar su calidad, optaron por importar harina de Estados Unidos y Canadá que se considera como una de las mejores harinas del mundo, no obstante, la

aceptación de sus productos no fue completamente satisfactoria (INEC, 2012). Esto se debe al bajo contenido de proteínas de la harina importada, que pesar de ser una de las mejores, presenta un déficit de α amilasas, impidiendo la correcta hidrólisis de los azúcares complejos del almidón en azúcares más sencillos durante el proceso de fermentación de la masa, afectando principalmente las características organolépticas (olor, color, sabor y textura) y la porosidad de la miga del pan (menor tiempo de vida útil) (Cauvin, 2015).

Considerando el alto valor de la harina de trigo, el cual varía entre 49 y 50 dólares los 50 Kg, no es muy rentable que las industrias de panificación inviertan aún más en emulsificantes, conservantes y mejoradores como puratos, para incrementar la calidad de sus productos (Jaramillo y Padilla, 2012).

Una de las alternativas más sencillas que permiten disminuir los costos de producción e incrementar la calidad de los productos de panadería, es el uso de biotecnologías convencionales que emplean una combinación de técnicas de microbiología, bioquímica e ingeniería para la producción de enzimas comerciales de alto rendimiento como; las α amilasas de origen fúngico. La fermentación submersa de microorganismos de origen fúngico como es el caso de *Aspergillus niger* a diferencia de las técnicas de refinamiento artificial para obtención de estas enzimas, han generado una serie de ventajas, entre ellas un mejor control de los parámetros físico-químicos como por ejemplo: el pH, la temperatura y oxigenación durante el proceso de fermentación. La fermentación submersa también permite una disposición continua de nutrientes para el óptimo desarrollo de este tipo de hongos (Khan y Yadav, 2011; Soares et al., 2012).

Aspergillus niger es una de las principales fuentes de obtención de α amilasas, debido a su alta capacidad para hidrolizar los azúcares, su resistencia a pH ácido y el incremento rápido de la biomasa con un bajo consumo de sustrato. Además, este hongo no necesita de medios de cultivo costosos, debido a que por su naturaleza ubicua puede crecer en un sinnúmero de medios de cultivo,

lo que resulta atractivo para la industria de alimentos y bebidas, ya que se mejoraría la hidrólisis de los azúcares del almidón durante la fermentación de la masa del pan y se obtendría las características organolépticas deseadas, además de una textura de miga más fina que se digiere fácilmente en el intestino humano (Mathew, Vazhacharickal, Sajeshkumar y Ashokan, 2016; Monteiro y Oliveira, 2012; Robinson, 2015).

Según Hewa, Hakki, Hero y Goceri (2014); los oligosacáridos y azúcares de cadena corta, tales como la glucosa y la maltosa producidos por las enzimas α amilasas, mejoran las reacciones de Maillard responsables del color dorado de la corteza y el desarrollo de un atractivo sabor de horno.

La producción de α amilasas fúngicas ha llegado incluso a reemplazar al bromato de potasio, un químico que mejora el volumen, textura y disminuye el endurecimiento del pan y que inclusive ha sido prohibido en varios países por sus efectos tóxicos y carcinogénicos (Kurokawa, Maekawa, Takahashi y Hayashi, 2011).

Otra ventaja del uso de enzimas fúngicas en la industria de alimentos y bebidas es que requieren poco procesamiento downstream y no es necesario que presenten una elevada pureza, ya que, a diferencia de otras fuentes microbianas, estas tienen una mayor aceptación y son consideradas GRAS (generalmente reconocidos como seguros) por la FDA (Dehkordi y Javan, 2012; FDA, 2012).

El presente estudio tiene como objetivo establecer un protocolo de obtención de α amilasas de origen fúngico a escala de laboratorio, mediante el uso de técnicas microbiológicas, de fermentación y purificación de la cepa *Aspergillus niger* van Tieghem (ATCC® 6275). Con el empleo de estas enzimas, se prevé mejorar las características organolépticas (color, olor, sabor y textura), volumen y estructura de la miga del pan (mayor perdurabilidad en vitrina), beneficiando directamente a las industrias de panificación y a la industria de alimentos y

bebidas e indirectamente a todas las industrias de procesamiento de alimentos que utilicen enzimas para la elaboración de sus productos.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Generalidades sobre el pan

Desde la Edad de Piedra, el pan ya constituía uno de los principales productos alimenticios en la dieta del ser humano, aunque el pan primitivo de aquel entonces solamente estaba constituido por trigo medianamente triturado y agua (Villanueva, 2015). Su calidad y sabor mejoró en el siglo XIX con el descubrimiento de la levadura industrial, producida por *Saccharomyces cerevisiae*, permitiendo llevar a cabo el proceso de fermentación de la masa, y luego la obtención de una masa madre (Villanueva, 2015). Actualmente el pan sigue siendo uno de los alimentos de mayor consumo en la alimentación humana, debido a su alto valor nutricional, su precio asequible y fácil elaboración (Ortega et al., 2016).

2.1.1 Pasos para la elaboración

La elaboración del pan consta de los siguientes pasos: “amasado, división, boleado, reposo, formado, fermentación y cocción”, como se puede ver en la Figura 1 (Gil y Ruiz, 2013).

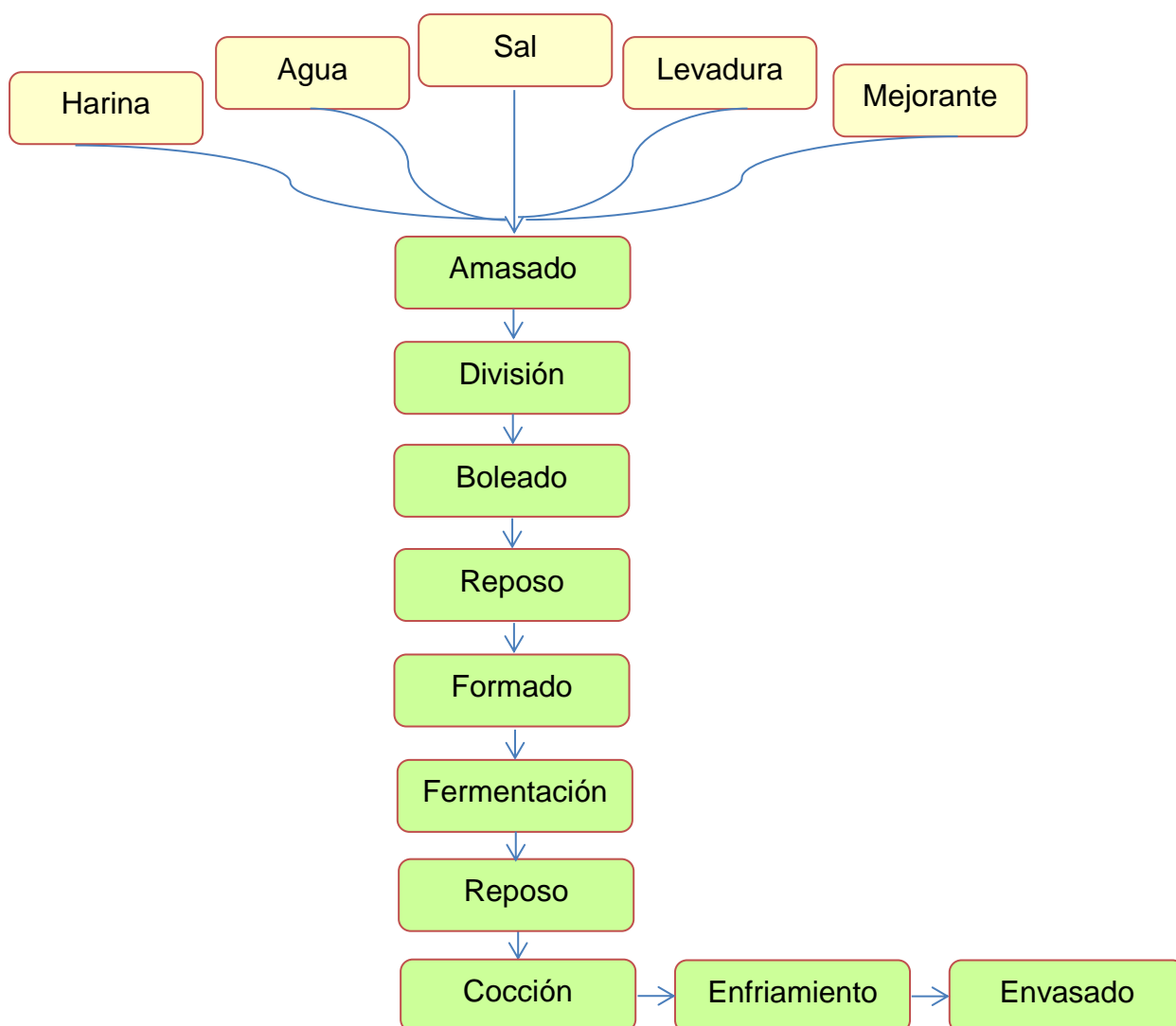


Figura 1. "Diagrama del proceso de elaboración del pan.

Adaptada de Gil y Ruiz, 2013.

El amasado tiene tres finalidades en el desarrollo del pan: la primera es homogeneizar todos los ingredientes (agua, harina, levadura, sal, grasa, leche y azúcar), coadyuvantes y aditivos. La segunda es favorecer la absorción del agua (25% la absorben las pentosanas, el otro 25% las proteínas y la mayor parte, el 50% la absorbe el almidón) (Gil y Ruiz, 2013). La tercera y última finalidad del amasado, es proporcionar aire en la masa para mantener estable la producción de gas carbónico e incrementar la formación de gluten ("red tridimensional integrada por las proteínas insolubles del trigo unidas entre sí por puentes disulfuro, que imposibilitan la fuga del gas carbónico originado

previamente por las levaduras”). El único cereal que constituye una red de gluten es el trigo (Gil y Ruiz, 2013).

El tiempo de amasado depende de la cantidad de cada ingrediente que se haya incorporado, mientras más elevado sea el contenido proteico y de agua, menor tiempo de amasado se va a necesitar (Normahomed, 2011). La temperatura se ajusta de acuerdo a la clase de pan; el pan normal necesita de 24 a 25 °C, el pan automatizado y precocido de 21 a 22 °C y el pan congelado una temperatura de 18 °C (Normahomed, 2011).

El boleado permite extraer el aire de la masa, así como la restauración y formación de una estructura exterior seca y homogénea, que evita que la masa se destrozé al pasar por las máquinas moldeadoras. Un periodo de reposo es fundamental para desarrollo de las características organolépticas (aroma, color, sabor y textura) del pan (Normahomed, 2011).

Mientras ocurre el proceso de fermentación “las enzimas del complejo zimasa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*” (Gil y Ruiz, 2013), se encargan de desdoblar los monosacáridos, produciendo dióxido de carbono (CO₂) y alcohol etílico (fermentación etílica) y en una mínima cantidad ácidos, siendo estos: butírico, acético, y láctico a los que corresponden la fermentación; butírica, acética y láctica, respectivamente, incluyendo además el desdoblamiento de alcoholes y ésteres (Gil y Ruiz, 2013). El CO₂ confiere a la masa la textura y voluminosidad exigida en el mercado y el resto de subproductos otorgan el sabor y aroma característicos del pan (Gil y Ruiz, 2013).

Para que se desarrolle correctamente la fermentación, es indispensable un nivel ínfimo de azúcares y una actividad enzimática apropiada, que permita el inicio y continuidad de las funciones fermentativas de la levadura, además de la reconstitución del almidón dañado por parte de las enzimas sacarificantes (α y β amilasas) (Gil y Ruiz, 2013). Este procedimiento se produce en cámaras

fermentativas a un “pH entre 5,2 y 5,8, una temperatura entre 25 y 30 °C y una humedad relativa del 75%” (Gil y Ruiz, 2013).

La fase de cocción se efectúa en rangos de temperatura de 180 a 250 °C. La masa fermentada debe tener una delgada capa seca en su parte más externa (que posibilite la adhesión del vapor de agua al momento del horneado, evitando que la corteza del pan se quemara), para lo cual es necesario un leve reposo antes del horneado (Boatella et al., 2012). Las principales modificaciones que atraviesa la masa, mientras se produce la cocción son; mayor expansión de su volumen, mayor liberación de monóxido de carbono (CO), volatilización del alcohol y el agua, gelificación del almidón, solidificación del gluten (que ayuda a definir la forma del pan) y el desarrollo del color y aroma gracias a “las reacciones de Millard” (Boatella et al., 2012; Gil y Ruiz, 2013).

El pan es un alimento que va perdiendo calidad desde que sale del horno. Las principales causas que generan esta situación son: “el endurecimiento de la miga y la correosidad de la corteza” (Gil y Ruiz, 2013). La correosidad de la corteza es ocasionada por la aglomeración de agua en esta, consecuencia de exponer el pan en zonas muy húmedas o debido al inapropiado enfriamiento de este, antes del empaque. El endurecimiento de la miga en cambio es causado por la retrogradación, que se refiere al envejecimiento de los fragmentos lineales de amilopectina o las ramificaciones de amilosa del almidón. Esta manifestación se reduce si se logra retardar la retrogradación, mediante el uso de harinas con un mayor contenido proteico, o empleando algún producto que hidrolice correctamente los azúcares del almidón (Boatella et al., 2012).

2.1.2 Valor nutricional

2.1.2.1 Pan común

El pan es un alimento de gran valor nutricional para el ser humano, cada 100 g aportan con un alto nivel de calorías que van desde 244 hasta 285 Kcal

dependiendo el tipo de pan, como se puede ver en la Tabla 1. El valor energético viene dado por la dureza de la miga, cuando el pan presenta miga dura tiene un mayor contenido energético que cuando presenta una miga blanda. El almidón es el componente que se encuentra en mayor cantidad en el pan; en el caso del pan de molde el 90% del almidón se digiere a gran velocidad (Wirtz y Macguire, 2013). En el caso del pan blanco la hidrólisis del almidón disminuye de 8,1 a 5,6, a causa de una gelatinización parcial o incompleta de este polisacárido en la corteza. Los ingredientes y los parámetros fisicoquímicos son responsables de la cantidad acumulada de almidón no hidrolizado o resistente, cuya cantidad se incrementa a medida que la temperatura y el tiempo de horneado aumentan y la cantidad de agua disminuye; adicionalmente, durante la fermentación de la masa la hidrólisis del almidón se reduce aún más debido a la presencia del ácido láctico formado, el cual produce interacciones gluten-almidón (Wirtz y Macguire, 2013).

Generalmente el contenido proteico del pan es de 7 a 10%. En el caso del pan precocido o de masas congeladas se debe utilizar harinas de mayor vigor o fuerza para alcanzar dichos porcentajes. El nivel proteico del trigo en Ecuador es muy bajo (3%), además de presentar un déficit de lisina (Wirtz y Macguire, 2013).

2.1.2.2 Pan integral

El pan integral elaborado con harina de trigo posee un valor nutricional más elevado que el pan común, solamente su contenido en fibra es tres veces mayor. Es así, que muchas personas para conseguir un alto porcentaje de fibra en su dieta han reemplazado el consumo de su pan habitual por el integral. El pan blanco posee 3% de fibra, mientras que el pan integral contiene 6% o valores superiores (Mesas y Alegre, 2013). Dependiendo de la calidad de la harina utilizada, el pH, la cantidad de levadura agregada, la temperatura y tiempo del proceso de fermentación, va a variar la disminución de la capacidad de formar complejos enzimáticos desde un 20 hasta un 100%. Sin embargo,

estas pérdidas siempre son menores en el pan integral en comparación con el pan blanco (Mesas y Alegre, 2013).

Tabla 1.

Valor nutricional del pan.

COMPOSICIÓN QUÍMICA APROXIMADA Y VALOR ENERGÉTICO POR CADA 100 g DE PAN							
Componente	Tipos de pan						
	Blanco	Blanco de molde	Integral	Integral de molde	Tostado	Biscotes	Integral tostado
Agua (%)	29-38	32-38	30-37	30-38	7	6	5,2
Energía (Kcal)	244-276	268-285	230-267	248-280	380	392	367
Proteínas (%)	7,3-9	7,8-10	8-9	8,8	10	10	11,8
Lípidos (%)	0,4-1,2	5	1,4-2,2	5	4,3	6,4	4,5
Hidratos de carbono (%)	50-58	48-52	44-53	42-50	75	73,6	69,7
ARD	83-94	89,1		92,3	93,4		93,4
ALD	0,1-9,2	10,7		4,9	2,4		2,5
AR	5,6-8,1	0,2		2,8	4,2		4,1
Fibra (%)	1,6-3,5	3,2-5,2	4,4-9	5,5-7,7	2,7	4	5-6,5
Minerales (%)	1,6		1,7				2,8
Ácido fólico (µg)	0-23	0-27	22-30	39	0,36	0-15	
Calcio (mg)	17-40	25	17-58	23	24	26	
Zinc (mg)	0,6-2	0,6-2	1,8-5	2	2	1,2	
Fósforo (mg)	90	90	195	200		130	
Hierro (mg)	1-1,5	1	1-2,5	2,5		1,30	
Magnesio (mg)	0-30	30	31-90	76	28	18	
Niacina (mg)	1	0,5	3-4	3,9	0,5	1,3	
Potasio (mg)	100-120	100	150-225	220		160	
Riboflavina (mg)	0,03-0,05	0,06	0,09-0,15	0,08	0,08	0,06	
Sodio (mg)	540-650	500-613	500-700	540		350	
Tiamina (mg)	0,09-0,12	0,06	0,25-0,3	0,26	0,1	0,05	
Vitamina B2 (mg)	0,02-0,04	0	0,08-0,2	0,14		0,09	
Vitamina E (mg)	Trazas	0,2	0,2-1	0,2		1,2	
Colesterol (mg)	0	0	0	0	0	0	
AGS (g)	0,2-0,4	1	0,25-0,5	1,3	0,7	1,4	
AGMI (g)	0,1-0,3	0,8	0,19-0,5	1	0,3	1,8	
AGPI (g)	0,4	3,2	0,54-1,1	2,7	1,8	1,1	

Tomada de Gil y Ruiz, 2013.

NOTA: AGMI = ácidos grasos monoinsaturados; AGPI = ácidos grasos poliinsaturados; AGS = ácidos grasos saturados; ALD = proporción de almidón lentamente digerible; AR = proporción de almidón resistente; ARD = proporción rápidamente digerible.

2.1.3 Ingredientes utilizados en la elaboración del pan

Entre los ingredientes usados para el desarrollo del pan, se encuentran la harina, levadura, agua, sal, huevos, manteca, edulcorantes, aditivos y preservantes (Hernández y Majem, 2011). La harina es el principal constituyente del pan, esta proviene de la molienda de cereales, siendo la más recomendada: la harina de trigo (Villanueva, 2015).

2.1.3.1 El trigo

Triticum sativum o más conocido como trigo “es un cereal, del orden de las glumíferas, el cual pertenece a la familia de las gramíneas y género *triticum*” (Villanueva, 2015; Pérez, 2016). *Triticum sativum* es una planta monocotiledónea de una altura promedio de 1,2 m y de periodo anual. La estructura de los tallos es firme y hueca entre los nudos (Pérez, 2016).

El trigo junto con el arroz y el maíz, son los cereales de mayor producción en todo el mundo. Esta variedad para su correcto desarrollo requiere de ciertas características climáticas como: una temperatura entre 10 y 24 °C, un nivel de precipitaciones o lluvias entre 400 y 750 L/año y una ubicación geográfica desde 6 hasta 600 m.s.n.m (Pérez, 2016).

2.1.3.4.1

2.1.3.2 Variedades de trigo

Según la organización botánica, el trigo se clasifica en dos tipos:

El primer tipo corresponde al trigo blando cuyas especies representativas son *Triticum aestivum* (trigo blando) y *Triticum spelta* (trigo escanda mayor). La geografía óptima para cultivar estas variedades es en territorios con climas templados o cálidos. Al triturar el grano, presenta una estructura muy harinosa y un exterior compacto y duro en ambas especies. El trigo blando a diferencia del trigo escanda mayor y trigo duro, posee una mayor cantidad de almidón,

vitamina B, fósforo, hierro y grasas, siendo el más útil para la elaboración de los productos de panadería y bollería en Europa, Estados Unidos y América del Sur. Esta variedad es la más usada en la industria de panificación actualmente (Pérez, 2016).

El segundo tipo corresponde al trigo duro cuya especie representativa es *Triticum durum*. Las condiciones ideales para cultivar esta variedad son: territorios moderadamente secos y con escasez de lluvias. Al triturar la parte interna del grano se observa una estructura uniforme y cristalina. En cuanto a su composición química a diferencia del trigo blando, posee una mayor cantidad de calcio y proteínas. Gracias a la conformación del endospermo se libera más fácilmente el salvado y facilita el proceso de cernido. En Europa se usa para elaboración de pastas nutritivas, mientras que en Estados Unidos y América del Sur se usa para la elaboración de panes de densidad media (Peña, 2011; Reynolds, Pask, Multan, Mullan y Chávez, 2012).

2.1.3.3 La harina de trigo

Es el resultado de la trituration del grano de trigo llevado a cabo luego del proceso de molienda (Pérez, 2016). El tipo de harina más recomendado para elaborar pan procede del trigo blando, específicamente de las variedades *Triticum aestivum* o *Triticum vulgare* y su calidad se puede determinar mediante pruebas químicas y reológicas, utilizando para ello varias masas preparadas con agua y harina (Oladunmoye, Akinoso y Olapade, 2011).

2.1.3.4 Características de extensión-tracción de la harina de trigo

En países litorales como Francia y España las características de extensión-tracción se examinan “con el alveógrafo de Chopin” (Gil y Ruiz, 2013); para ello en una placa, se coloca un trozo de masa de tamaño promedio y se induce aire hasta obtener una burbuja que estalle, con este suceso se interpreta la presión

de la masa en función del tiempo para así obtener los valores de extensión (L), tenacidad (P), fuerza (W) y equilibrio (P/L), como se puede ver en la Figura 2 (Codina, Gutt, S., Gutt, G., y Mironeasa, 2011; Gil y Ruiz, 2013).

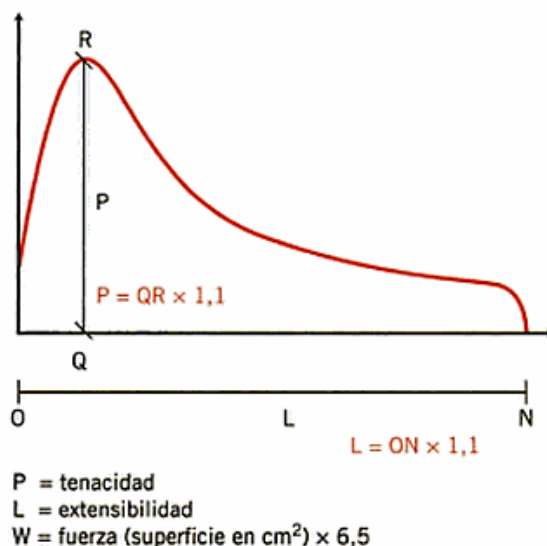


Figura 2. Alveograma de las propiedades extensión tracción de la harina de trigo. Tomada de Gil y Ruiz, 2013.

Las propiedades de gasificación y actividad amilásica se establecen calculando el grado de hidrólisis del almidón por el efecto de las enzimas presentes en la harina (Gil y Ruiz, 2013). Para calcular el grado de hidrólisis del almidón, se debe determinar el falling number o índice de caída, midiendo el porcentaje de resistencia que genera la masa al entrar una aguja perforada en ella, o también, se puede determinar el índice de maltosa al medir la cantidad total de maltosa obtenida (Codina et al., 2011).

2.1.3.5 Clasificación de la harina de trigo

La Tabla 2, reúne varios datos sobre la clasificación de la harina de acuerdo a sus características químicas y reológicas, y los productos de panificación que se podrían fabricar. La fuerza de la harina de trigo viene dada por el contenido proteico que presente, por ejemplo, para elaborar productos de panadería que contienen leche o grasa de cerdo, o que necesitan de mucho tiempo para su

elaboración, es necesario utilizar harinas de menor extensibilidad y de mayor tenacidad. En cambio, en etapas de batido de las masas o procedimientos automatizados es imprescindible emplear harinas de menor tenacidad para obtener masas de mayor extensibilidad que faciliten los procedimientos automatizados (Oladunmoye et al., 2011).

Tabla 2.

Clasificación de las harinas de trigo según sus características y usos en la panificación.

Caracteres químicos y reológicos	TIPOS DE HARINA					
	Flojísima	Floja	Floja/alta	Media fuerza	Gran fuerza/baja fuerza	Gran fuerza
Fuerza (W)	80-100	90-110	110-135	150-180	220-250	300-350
Tenacidad (P)	25-40	35-40	40-50	50-60	30-90	100-120
Extensibilidad (L)	60-80	100-110	100-110	110-120	120-130	80-110
Equilibrio (P/L)	0,3-0,5	0,3-0,4	0,3-0,5	0,4-0,6	0,7-0,9	1-1,3
Proteínas (%ss)	10-11	9-13	9-13	11,5-12	11,5-13	13-14
Gluten húmedo (%)	24-30	-25	-25	-27	27-33	27-33
Gluten seco (%)	8-11	8-11	8-11	-9,8	8-11	8-11
Degradación (%)	0-20	<15	<15	<10	<10	<10
Índice de maltosa	1,7-1,9	1,7-2	1,7-1,9	1,7-1,9	2-2,4	2-2,4
Índice de caída (segundos)	250-300	250-300	280-380	325-400	350-450	350-450
Usos	*Pan común en líneas automáticas *Batidos (magdalenas y bizcochos) *Mantecados	*Pan común en barras de tamaño medio	*Panes grandes (hogazas)	*Biscotes *Pan candeal *Colines *Pan de Viena	* <i>Croissants</i> *Hojaldres *Pan chapata	*Ensaimadas *Suizos *Pan integral *Pan de molde

Tomada de Gil y Ruiz, 2013.

2.1.3.6 Calidad de la harina de trigo

Generalmente la calidad de la harina se determina “por la cantidad de CO₂ que produce y por la capacidad de retención que presenta este gas” (Gil y Ruiz, 2013). Para incrementar la cantidad de CO₂ se agregan azúcares como glucosa y sacarosa, o se puede optar por incrementar el poder enzimático con el uso de fermentaciones amilolíticas (uso de amilasas) o harinas de malta, mientras que para mejorar la capacidad de retención de este gas y fortificar su vigor o fuerza se debe agregar ácido ascórbico, pentosas o harina de leguminosas a la masa. La capacidad de retención de CO₂ también se puede potenciar mediante el uso de emulsificantes como lecitinas, mono y diglicéridos de ácidos grasos y ésteres derivados de los diglicéridos, para aumentar la extensión y durabilidad del pan (Gil y Ruiz, 2013). Cuando su calidad o contenido son demasiado bajos incluso se agrega gluten para estabilizar la masa (Codina et al., 2011).

Para corregir el pH requerido en el crecimiento de las levaduras, se usan sensores de acidez como los ácidos: acético, láctico y cítrico o algunas de sus sales (Codina et al., 2011).

Para el desarrollo de pan de larga durabilidad se utilizan conservantes, entre los más empleados están: el sorbato, diacetato sódico y propionatos (Codina et al., 2011).

2.1.3.7 Clasificación comercial de la harina de trigo

En América del Sur, clasifican comercialmente a la harina de trigo de acuerdo a sus ceros siendo estos: “un cero (0), dos ceros (00), tres ceros (000) y cuatro ceros (0000)” (Cortez, Pulido y Vásquez, 2011). Esta clasificación viene dada de acuerdo a la cantidad de gluten (de mayor a menor respectivamente). La harina tres ceros (000) es la más empleada en el desarrollo de diferentes tipos de pan, por presentar el contenido superior de proteínas, que permite una

correcta conformación del gluten y mantiene la forma de la masa. La harina cuatro ceros (0000) en cambio, es más blanca y refinada, y presenta una carencia de conformación de gluten por lo que disminuye la constitución de CO₂, y la forma de los productos de panadería se altera, por ello solo se usa en pastelería y pan de molde (Cortez et al., 2011).

2.1.3.8 Composición química de la harina de trigo

En la Tabla 3 se puede apreciar la composición química de la harina de trigo.

Tabla 3.

Composición química de la harina de trigo.

COMPOSICIÓN QUÍMICA POR CADA 100g DE HARINA DE TRIGO	
Composición química (g/100g)	Extracción de harina (100%)
Almidón (g)	70,9
Almidón resistente (g)	1,14
Azúcares totales (g)	2
Azúcares reductores (g)	0,41
Proteínas (g)	13,21
Fibra (cruda) (g)	10,70
Grasa (g)	0,56
Lípidos (g)	2,50
Humedad (%)	3,10
Cenizas (%)	0,86
<u>Vitaminas:</u>	
Tiamina (mg)	0,50 (46%)
Niacina (mg)	4,96(31%)
Vitamina B6 (mg)	0,41(29%)
Ácido fólico (µg)	44(22%)
<u>Minerales:</u>	
Hierro (mg)	3,60(26%)
Magnesio (mg)	137(37%)
Fósforo (mg)	357(51%)
Potasio (mg)	363(18%)
Zinc (mg)	2,60(26%)

Tomada de García y Pacheco, 2011.

Almidón: es el componente principal de la harina de trigo. Es un carbohidrato, que absorbe aproximadamente el 40% de su peso en agua, además de proporcionar la fuente energética (azúcares) para que las levaduras lleven a cabo el proceso de fermentación de la masa, luego de su transformación en CO₂ (Mancebo, Merino, Martínez y Gómez, 2015).

Proteínas: se clasifican de acuerdo a su solubilidad y funcionalidad (Vega, 2011).

De acuerdo a su solubilidad, se clasifican en: gliadinas, globulinas, gluteninas y albúminas. La Tabla 4 muestra su comportamiento en solubilidad, composición, papel biológico y función (Vega, 2011).

Tabla 4.

Clasificación de las proteínas de la harina de trigo de acuerdo a su solubilidad.

Fracción Osborne	Comportamiento en solubilidad	Composición	Papel biológico	Función
Albúminas	Extraíbles en agua	Proteínas que no pertenecen al gluten (especialmente monoméricas)	Proteínas estructurales y metabólicas	Variable
Globulinas	Extraíbles en sales diluidas	Proteínas que no pertenecen al gluten (especialmente monoméricas)	Proteínas estructurales y metabólicas	Variable
Gliadinas	Extraíbles en soluciones de alcohol	Proteínas del gluten (principalmente gliadinas monoméricas y polímeros de glutenina de alto peso molecular)	Proteínas de almacenamiento de la semilla, tipo prolaminas	Viscosidad a la masa/ extensibilidad
Gluteninas	Extraíbles en ácido acético diluído	Proteínas del gluten (principalmente polímeros de glutenina de alto peso molecular)	Proteínas de almacenamiento de la semilla, tipo prolaminas	Elasticidad a la masa/ tenacidad
Residuo	Sin extraer	Proteínas del gluten (polímeros de alto peso molecular) y otras proteínas poliméricas que no pertenecen al gluten (triticinas)	Proteínas de almacenamiento de la semilla, tipo prolamina (gluten) y tipo globulinas (triticinas)	Variable

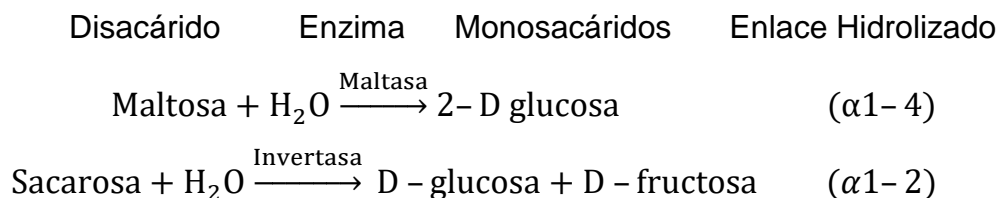
Adaptada de Vega, 2011.

La fracción Osborne, se basa en una secuencia de extracciones sucesivas de separación proteica; con solución de sal diluida, agua, álcalis o ácidos diluidos y alcohol (Vega, 2011).

De acuerdo a su funcionalidad las proteínas de la harina de trigo se organizan en dos clases: proteínas pertenecientes al gluten y proteínas no pertenecientes al gluten. Las pertenecientes al gluten constituyen el 80 a 85% del total del contenido proteico del trigo. Este tipo de proteínas corresponden a la clase de las prolaminas y se ubican en el endospermo del grano de trigo maduro formando complejos en la parte externa de los gránulos de almidón. Se considera que son insolubles en agua o en mezclas de sales disueltas. Estas proteínas se distribuyen en dos grupos: gliadinas (proteínas monoméricas) y gluteninas (proteínas poliméricas), ambas presentan una relación 50/50 en la harina de trigo. Las propiedades reológicas de la masa, como: elasticidad, extensibilidad y viscosidad vienen dadas de acuerdo a los enlaces disulfuro entre las gluteninas (grado de elasticidad), el número de subunidades de gluteninas de bajo peso molecular (tipo B y C) (grado de extensibilidad) y la cantidad de fragmentos monoméricos de gliadinas (grado de viscosidad) (Vega, 2011). Las proteínas no pertenecientes al gluten, en cambio constituyen de 15 a 20% del total del contenido proteico del trigo. La mayoría se localizan en la parte más externa del grano y en pequeñas cantidades en el endospermo. Este tipo de proteínas también se divide en dos grupos: globulinas y albúminas (proteínas monoméricas) y triticinas (proteínas poliméricas). La función de este segundo grupo de proteínas funcionales en el proceso de panificación aún no está definida (Vega, 2011).

Azúcares: igualmente se encuentran en la harina de trigo a manera de maltosa y sacarosa, pero en una pequeña cantidad. Para que estos disacáridos puedan contribuir como fuente energética de las levaduras durante la fermentación, es necesario transfórmalos en monosacáridos (azúcares simples fermentables) (Hernández y Sastre, 2011). Este tipo de reacciones se producen mediante las enzimas maltasa e invertasa que también se encuentran en la harina, las

cuales originan el azúcar invertido, formado por una combinación de fructosa y glucosa (Villanueva, 2015).



Las dextrinas son otros azúcares que también se encuentra en la harina de trigo, en mínima cantidad (0,2 -0,3%). Este azúcar es el responsable del brillo de la corteza del pan (Villanueva, 2015).

Fibra: el porcentaje de fibra en la harina de trigo varía de acuerdo a la cantidad de salvado agregado. Existe una fracción de fibra insoluble y una porción de fibra soluble (2 a 3% del total de fibra) (Hernández y Sastre, 2011). Entre las funciones que desempeña la fibra, se encuentra la digestión humana permitiendo; un incremento en el volumen del residuo de la digestión y disminución de la presión del tracto gastrointestinal gracias a su poder de absorción y retención de agua que favorece el transporte del bolo alimenticio. Al llegar al colón la fibra soluble disminuye al igual que la glucosa y colesterol en la sangre (Hernández y Sastre, 2011).

Grasas: se localizan en la cáscara y el germen del grano de trigo. Durante el declive o envejecimiento de la harina de trigo la cantidad de grasa va disminuyendo progresivamente y se transforma en ácidos grasos que en lugar de contribuir, perjudican la calidad de la harina (Layango et al., 2015).

Material mineral o cenizas: está integrado por algunos elementos como: calcio (Ca), sodio (Na), magnesio (Mg) y potasio (K) que proceden de las capas exteriores del grano de trigo. Para conocer el porcentaje de este material se debe realizar la calcinación de la harina, mientras menor sea el contenido de

cenizas que se obtenga, mayor integridad de la harina se considerará para la masa (Peña et al., 2012).

Vitaminas: se encuentran las vitaminas: E, B1 o tiamina, B2 o riboflavina, B3 o niacina y B6 o piridoxina (Noorfarahzilah et al., 2014).

2.1.3.8 El almidón

Descripción de la composición química y estructural del almidón

El almidón es el componente mayoritario de la harina de trigo. El almidón es un homo-polisacárido formado por dos polímeros de glucosa que se unen entre sí a través de enlaces glucosídicos (estos enlaces se hidrolizan a pH bajo y en pH alto permanecen estables). Dichos polímeros son: la amilosa y amilopectina, los cuales difieren entre sí por su estructura y propiedades, pero especialmente por la forma en la que se unen (tipo de enlace glucosídico) (Asare† et al., 2011).

La amilosa (insoluble en agua fría) es un polímero lineal grande (formado por 6000 unidades de glucosa) que se unen entre sí mediante enlaces α -1,4 glucosídicos, como se puede ver en la Figura 3 (Amira, Abou, Ahmed y Noha, 2012). La amilopectina (soluble en agua) en cambio, presenta una estructura compleja y muy ramificada, debido a la presencia de cadenas lineales y laterales de glucosa; las cadenas lineales son de corta longitud (10 a 60 unidades) y se unen mediante enlaces α -1,4 glucosídicos, mientras que las cadenas laterales son un poco más largas (15 a 45 unidades) y se unen por medio de enlaces α -1,6 glucosídicos; este último tipo de enlace representa del 5 al 6% de las uniones a los puntos de ramificación de la amilopectina, razón por la cual hace que este polímero sea más complejo que la amilosa (cadena lineal), como se puede observar en la Figura 3 (Amira et al., 2012).

Para que las unidades de glucosa del almidón sean mucho más digeribles, es decir que, una cadena ramificada (amilopectina) se transforme en una cadena lineal, o que de una cadena lineal (amilosa) se conviertan subunidades más sencillas, intervienen enzimas denominadas α amilasas, las cuales son capaces de romper o hidrolizar los enlaces α -1,4 glucosídicos presentes en la parte interna de la cadena de amilosa o amilopectina (Asare† et al., 2011).

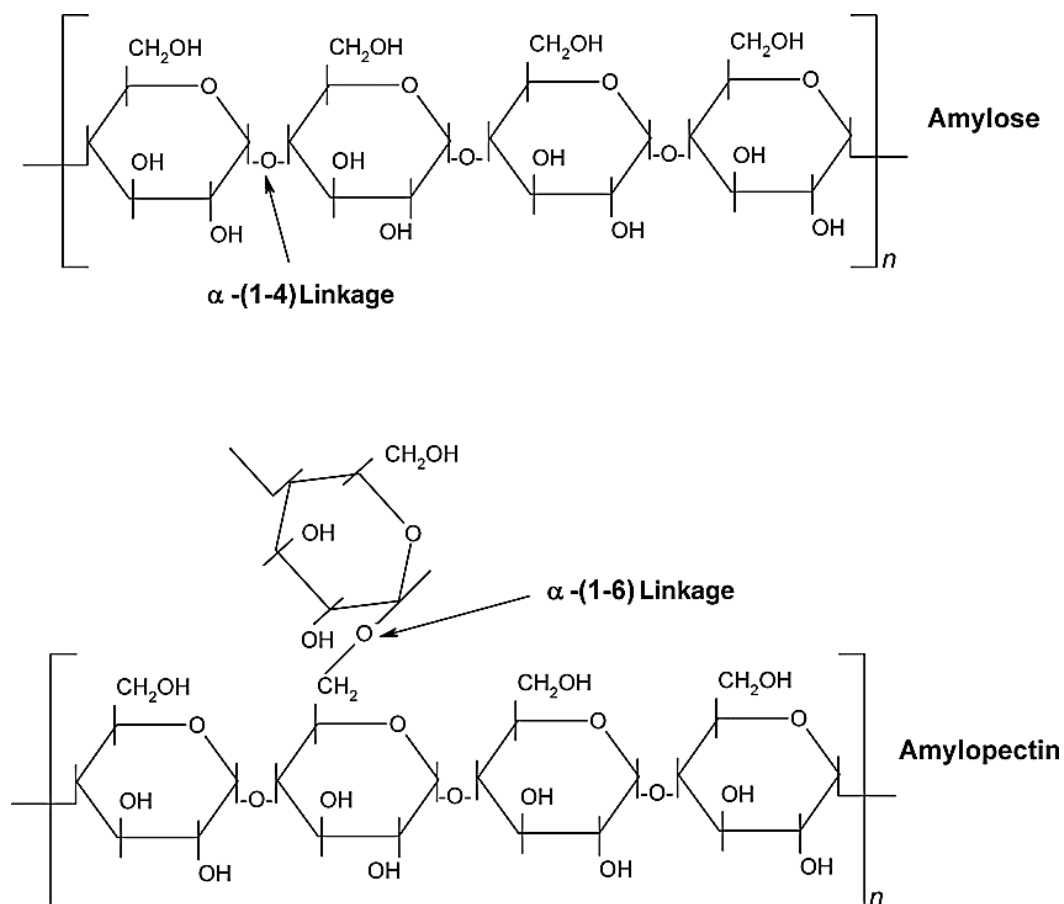


Figura 3. Estructura química del almidón con sus unidades de amilosa y amilopectina.

Tomada de Mathew, Oksman, Thomas, Habibi y Lucian, 2014.

Importancia de la gelatinización del almidón

La gelatinización del almidón es el procedimiento de ruptura de las estructuras organizadas de los gránulos del almidón (insolubles en agua fría). Al inicio los gránulos del almidón absorben cerca del 30 al 40% de agua y

consecuentemente se hinchan. Mientras la temperatura se eleva de 60 a 85 °C, las estructuras de los gránulos del almidón (amilosa y amilopectina) se van destruyendo donde, la amilosa es la primera en destruirse (gelatinización parcial). Un mayor incremento de la temperatura origina la disgregación de los gránulos en fragmentos de menor tamaño y la ruptura de la amilopectina (gelatinización completa tras la pérdida de la estructura cristalina del almidón) (Wianecki y Kołakowski, 2011).

Para evaluar la funcionalidad del almidón o el contenido de dextrinas, se determina la viscosidad del gelificado de almidón; la cual va a depender de la clase de almidón utilizada (tamaño de los gránulos, porcentaje de ácido fosfórico asociado a las estructuras de los gránulos y la cantidad de electrolitos), así como el porcentaje de almidón que presente y la técnica de medición (Wianecki y Kołakowski, 2011).

El papel del almidón en la panificación

Al ser el almidón el componente mayoritario de la harina de trigo (aproximadamente 70,9% del total), se le atribuye también el rol más importante en el proceso de panificación. Muchos estudios realizados, han demostrado que en conjunto las propiedades del almidón generan efectos significativos en la textura y volumen de la masa, así como en la estructura de la miga del pan (miga más fina o gruesa dependiendo del contenido proteico y la hidrólisis del almidón) (Bernabé, 2013).

Las principales funciones que desempeña el almidón en la panificación son las siguientes: funciona como un agente estabilizante, espesante y gelificante de la masa que favorece la formación de la estructura de la miga del pan, las superficies de sus gránulos facilitan la producción CO durante la fermentación de la masa, provee la energía necesaria para el desarrollo de la levadura, promueve la correcta formación del gluten, gracias a su poder absorbente permite estabilizar la cantidad de agua necesaria durante la gelatinización y

debido a la presencia de dextrinas en su estructura, participa también en el desarrollo del color marrón característico de la corteza del pan (Bernabé, 2013).

El aporte del almidón en la fermentación de la masa

En la fermentación alcohólica el almidón aporta la fuente de energía (azúcares o subunidades de glucosa) para el desarrollo de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Dicho microorganismo convierte los azúcares fermentables como la glucosa, maltosa y maltotriosa, en CO₂, etanol y algunos otros subproductos. La finalidad perseguida tras la fermentación, es la producción de CO₂, que luego de su retención en la superficie de la masa, hace que esta, aumente de volumen y adquiera un buen sabor (Mesas y Alegre, 2012). Para que la fermentación permanezca estable, se requiere de un adecuado contenido α amilasas (Bernabé, 2013).

Las α amilasas son una de las principales enzimas utilizadas en la industria de panificación. Estas enzimas hidrolizan las moléculas de almidón en subunidades poliméricas de glucosa, mediante la catálisis de los enlaces glucosídicos de este polisacárido, obteniendo azúcares de bajo peso molecular, los cuales son fácilmente asimilables por las levaduras (Bernabé, 2013).

2.2 Tipos de amilasas

Las amilasas son enzimas que gracias a su estructura tridimensional son capaces de hidrolizar las moléculas del almidón, originando diversos subproductos como unidades más pequeñas de glucosas y dextrinas "(mezcla de polisacáridos de bajo peso molecular, constituidas de 3 a 8 unidades de glucosa y maltosa)" (Sahni y Goe, 2015). Actualmente la comercialización de amilasas microbianas, ha reemplazado casi en su totalidad el procesamiento de hidrólisis química del almidón en la industria (Sahni y Goe, 2015).

Las amilasas se clasifican de acuerdo a la forma en la que atacan el enlace glucosídico pudiendo ser: endo-amilasas (α amilasas) o exo-amilasas (β amilasas), ambos tipos de enzimas son capaces de hidrolizar el almidón ya sea desde su interior (endo-amilasas) o desde su extremo no reductor (exo-amilasas) (Tiwari et al, 2015).

2.2.1 Las β amilasas

Las β amilasas o exo-amilasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces α -1,4 glucosídicos en la parte externa de las cadenas lineales y ramificadas del almidón (extremo terminal no reductor de la amilosa y amilopectina) obteniendo como resultado; azúcares de bajo peso molecular como la maltosa y dextrinas. Sin embargo, dichas enzimas no realizan la hidrólisis completa de los enlaces α -1,6 glucosídicos en la parte externa de las cadenas ramificadas del almidón (amilopectina), produciendo una mala hidrólisis de maltriosa y glucosa. Por tal motivo las β amilasas tienen menor eficiencia que las α amilasas al hidrolizar el almidón (Sahni y Goel, 2015).

2.2.2 Las α amilasas

2.2.2.1 Estructura molecular las α amilasas

Las α amilasas corresponden a la “familia Glycosyl hidrolasa (familia GH-13 de la proteína)” (Tiwari et al., 2015). Cada α amilasa está compuesta por 512 aminoácidos en una única cadena de oligosacáridos con un peso molecular aproximado de 57,6 kDa. Este tipo de enzimas presentan una estructura tridimensional (cadena polipeptídica plegada en tres dominios), capaz de unirse al sustrato y mediante la acción de grupos catalíticos altamente específicos promueve la rotura de los enlaces glucosídicos (α -1,4). Las α amilasas se componen de 3 dominios de plegamiento: A, B, y C. El dominio A es el mayor y más conservado, debido a la constitución de su cadena plegada, en forma de barril; integrada por 8 hélices β paralelas y 8 hélices α (Brayer, Luo y Withers,

2011). Todos los residuos de aminoácidos de las α amilasas se unen con el dominio A, mientras que los residuos de la hidrólisis del sustrato se sitúan en las hélices β del extremo C-terminal y van a presentar un subnivel del dominio A muy conservado. En el dominio B en cambio, se distingue la 3 β y 3 α hélices. Dicho dominio está integrado por residuos de aminoácidos que van de 44 a 133 aminoácidos y permiten la correcta unión del Ca^{2+} y del sustrato. Todas las α amilasas identificadas poseen un sitio conservado de unión al Ca^{2+} ubicado entre el dominio A y B. El Ca^{2+} puede actuar como activador alostérico o como estabilizador de toda la estructura tridimensional de las α amilasas (Brayer et al., 2011). Finalmente, el dominio C, es relativamente conservado, se pliega antiparalelamente en forma de barril con 2 hélices β que se une al dominio A, mediante una cadena polipeptídica simple. La disposición del dominio C con respecto al A, cambia de acuerdo al tipo de α amilasa y su función aún se desconoce (Brayer et al., 2011; Mojssov, 2012; Tiwari et al., 2015).

Visto desde el grado de hidrólisis de los enlaces glucosídicos del sustrato (almidón), las α amilasas se clasifican en dos categorías: α amilasas sacarificantes, cuando han logrado hidrolizar 50 o 60% de los enlaces α -1,4 glucosídicos del almidón y las α amilasas de licuefacción cuando el grado de hidrólisis es menor (30 a 40%). Este segundo grupo posee una acción inmediata en la disminución de la viscosidad (Sivaramakrishnan, Gangadharan, Madhavan, Soccol y Pandey, 2013).

2.2.2.2 Modo de acción de las α amilasas

Las α amilasas o endo-amilasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces α -1,4 glucosídicos en la parte interna (acción endo) de la cadena de amilosa o amilopectina del almidón, obteniendo como resultado azúcares más cortos de bajo peso molecular, como subunidades de glucosa, maltosa y maltotriosa (hidrólisis completa del almidón) (Figura 4) (Sundarram y Thirupathihalli, 2014).

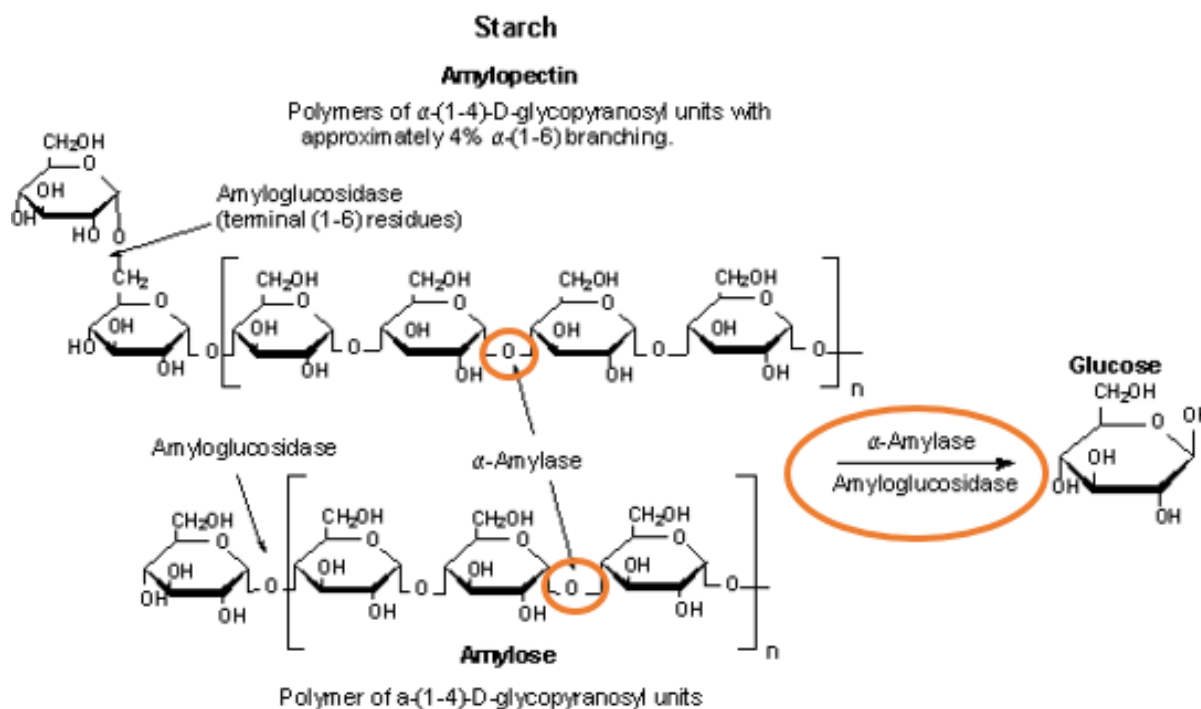


Figura 4. Reacción de hidrólisis del almidón en glucosas, catalizada por la enzima α amilasa.

Tomada de Hachmann y Maffezzoli, 2016.

2.2.2.3 Aplicaciones de las α amilasas en la industria

El almidón se hidroliza en oligosacáridos de menor tamaño por acción enzimática de las α amilasas, esta hidrólisis es uno de los procesos más importantes que desarrollan las enzimas comerciales, especialmente en la industria de alimentos. La composición de los oligosacáridos obtenidos después de la hidrólisis del almidón depende de las condiciones físico-químicas con las que se efectúe este procedimiento y el origen de la enzima. Las propiedades como: especificidad, estabilidad térmica y respuesta al pH por parte de las α amilasas son esenciales para su uso industrial tanto en elaboración y mejoramiento de alimentos, así como de medicamentos y textiles (Mojsov, 2012; Sahm y Goe, 2015; Sundarram y Thirupathihalli, 2014).

2.2.2.4 Fuentes de obtención de α amilasas

Las α amilasas se pueden obtener a partir de fuentes animales, vegetales y microorganismos. Aunque los animales y plantas producen una gran cantidad de α amilasas, las industrias han optado por obtenerlas a partir de fuentes microbianas. Esto se debe a una serie de factores de interés económico y comercial; como una mayor termoestabilidad enzimática, mayor incremento de la productividad y facilidad de cultivo y desarrollo a gran escala (Gurung, Ray, S., Bose y Rai, V., 2013).

Una de las principales fuentes de obtención de α amilasas son los hongos, especialmente aquellos pertenecientes al género *Aspergillus* como: *Aspergillus niger*, *flavus* y *oryzae*. El candidato favorito para la producción de estas enzimas es *Aspergillus niger*, debido su alta capacidad hidrolítica de azúcares, su naturaleza ubicua, bajo requerimiento nutricional, su capacidad para incrementar la producción de biomasa de forma más rápida y eficiente, debido a su crecimiento acelerado y la disminución de los costos de producción, ya que para el crecimiento de este hongo se pueden utilizar medios de cultivo baratos (Gurung et al., 2013). Este hongo produce de forma extracelular no solo α amilasas sino una gran cantidad de enzimas de interés industrial, además que tolera el pH ácido (pH<3) lo que le permite evitar la contaminación bacteriana, además de ser uno de los 21 microorganismos con una mayor aceptación GRAS (Generalmente reconocidos como seguros) por la FDA para la elaboración de alimentos, luego de *Streptomyces natalensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces fragilis*, *Candida utilis* y algunas algas como *Chondrus crispus* y *Chondrus ocellatus* (FDA, 2015; Sundar, Rajila y Suganyadevi, 2012).

2.2.2.5 Morfología de *Aspergillus niger*

Aspergillus niger es un hongo saprofita, filamentoso hialino, que pertenece al filo Ascomycota. Está constituido por hifas hialinas septadas de 3 a 6 μ m de

ancho con tabiques regulares y una estructura uniforme y ramificada arboriformemente, donde las ramas son dicotómicas y crecen formando un ángulo de 45°, como se puede ver en la Figura 5 A. Este hongo se puede reproducir de forma asexual (por conidios) o de forma sexual (por ascosporas) (INSHT, 2012; Tafur, 2013).

Aspergillus niger se diferencia de las demás especies de *Aspergillus*, por sus características fisiológicas como: mayor rapidez de crecimiento, mayor tamaño, textura granular, color negro en las cabezas conidiales y en el micelio, como se puede observar en la Figura 5 B. Este tipo de hongo al igual que el resto de *Aspergillus* producen micotoxinas (metabolitos secundarios de defensa) segregados durante el proceso de degradación del sustrato (INSHT, 2012).

Aspergillus niger se desarrolla en cualquier clase de sustrato, principalmente en materia orgánica e inorgánica en estado de descomposición. Este hongo posee una gran termoestabilidad y puede crecer a temperaturas entre 12 y 57 °C en ambientes naturales (INSHT, 2012).

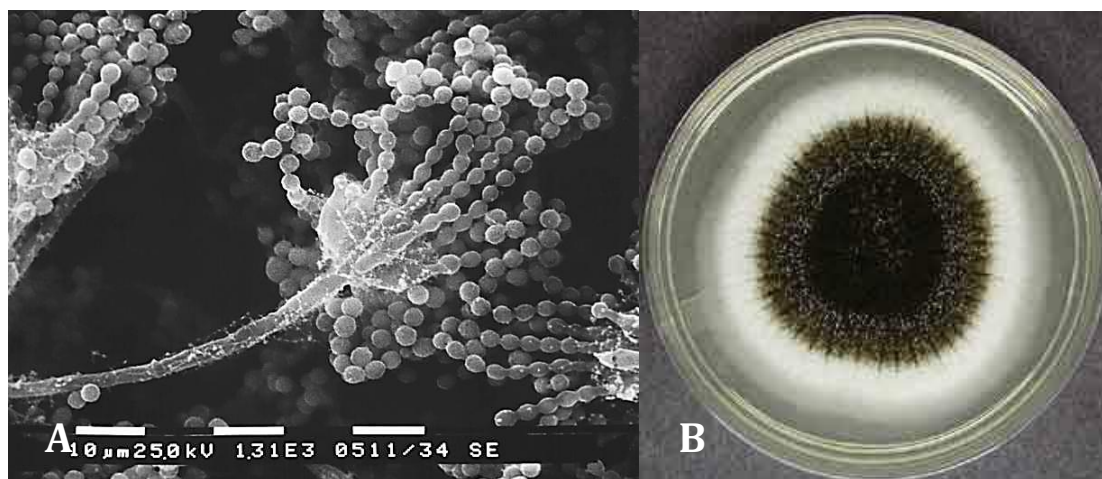


Figura 5. Morfología de *Aspergillus niger*.

A) Micrografía electrónica de la estructura del cuerpo fructífero de *Aspergillus niger*.

B) Características fisiológicas de *Aspergillus niger* aislado en PDA.

Tomadas de Donald, 2013; INSHT, 2012.

2.2.2.6 Fermentación

Existen dos tipos de fermentación, que se utilizan para la producción de α amilasas a escala comercial, estas son: la fermentación submersa (SMF) y la fermentación en estado sólido (SSF). El método más empleado, es el de la SMF, debido a que, al desarrollarse en sustratos líquidos, permite medir más fácilmente, parámetros como: la temperatura, viscosidad, pH, grado de hidrólisis de los azúcares procedentes de la fuente de carbono y estabilidad, así como también permite ajustar de mejor forma la transferencia de O_2 , el pH e ir suministrando algún componente que haga falta en el medio de cultivo, para el correcto crecimiento del microorganismo. Si se quisiera evaluar o controlar estos parámetros en una fermentación SSF sería mucho más complejo, dadas las condiciones del medio de cultivo (Sundarram y Thirupathihalli, 2014).

En la SMF se utilizan sustratos en estado líquido que circulan libremente. Este método es el más adecuado para la fermentación de microorganismos como los hongos, que necesitan un elevado porcentaje de humedad para su crecimiento. La SMF se usa fundamentalmente para la extracción de metabolitos secundarios y proteínas de secreción al medio. Otras ventajas que posee esta técnica son: una fácil purificación de los productos obtenidos, el uso de OGM (organismos genéticamente modificados) en mayor grado que la SSF y un mejor control de los parámetros fisicoquímicos. Los parámetros óptimos de control del proceso varían de acuerdo al tipo de fuente microbiana y el método de fermentación empleado (ManthiriKani y Kumar, 2011; Saranraj y Stella, 2013).

2.2.2.7 Determinación de la actividad enzimática

La actividad de la enzima α amilasa se puede determinar por varios métodos como: el del ácido dinitrosalicílico (DNS), el de Nelson - Somogyi (NS), mediante la actividad de dextrinización, el de Eynon-Lane y la técnica de India Farmacopea (Cărăban, Vasilica, Eugen y Sanda, 2012).

Uno de los métodos más utilizados para determinar la actividad enzimática de las α amilasas, es el método del DNS, que permite cuantificar la concentración de azúcares reductores secretados en el medio (20 - 180 mg/ml), a través de un proceso colorimétrico. resultado de la acción de hidrólisis de las α amilasas sobre los polímeros de amilosa y amilopectina del almidón (Cărăban et al., 2012; Rodríguez, 2014; Xiao, Storms y Tssang, A., 2011).

Fundamento:

El método del DNS consiste en una reacción Redox entre el DNS y los azúcares reductores que se encuentran en la muestra. La sacarosa es un azúcar disacárido, no reductor, pero que luego de ser hidrolizado en el medio de cultivo ácido, se descompone en fructosa y glucosa que sí son azúcares reductores y que ya pueden ser reconocidos por este ácido y entrar en reacción, originando un producto coloreado (cambio de color). La intensidad del color obtenido en la muestra se mide de forma proporcional a la cantidad de sacarosa, mediante la determinación de los valores de absorbancia a 540 nm utilizando espectrofotometría UV-VIS. Dichos valores se representan en gráficas de regresión lineal de Excel, como se puede observar en la Figura 6 (Gusakov, Kondratyeva y Sinitsyn, 2011; Muñoz y Vega, 2014).

$$[Glucosa] = \frac{Abs - 0,004}{0,3084}$$

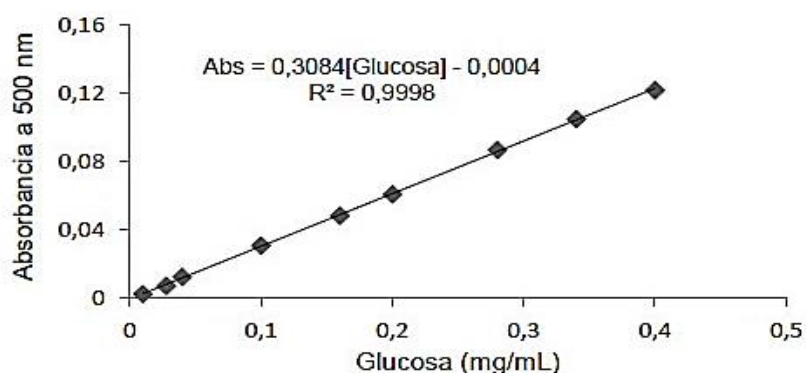


Figura 6. "Curva de calibrado del método analítico DNS para la determinación de glucosa".

Tomada de Acevedo, Granados y Guerrero, 2014.

2.2.2.8 Purificación de las α amilasas

Las α amilasas microbianas de gran producción industrial requieren de poco procesamiento downstream (aguas abajo), considerándose como elaboraciones técnicamente rudimentarias. Este tipo de enzimas por lo general no necesitan de un elevado grado de purificación a diferencia de las amilasas de aplicación farmacéutica las cuales si requieren de una elevada pureza. Se han estudiado varias técnicas de purificación enzimática a escala de laboratorio como las cromatografías de: filtración en gel, intercambio iónico, fase reversa y de interacción hidrofóbica, las cuales explotan principalmente las características de las biomoléculas diana. Para reducir costos, también se han empleado técnicas de purificación más sencillas como la micro y ultrafiltración (Karnchanatat et al., 2011).

El proceso de ultrafiltración ha sido ampliamente utilizado en la industria alimenticia durante los últimos 20 años, debido a sus utilidades sobre los procesos de separación convencionales. Entre las ventajas que presenta esta técnica se encuentran: una elevada selectividad, tratamiento suave del producto, y un menor gasto energético. La ultrafiltración se considera como una tecnología fundamental en procedimientos de separación y concentración de moléculas, de acuerdo al tamaño de poro de la membrana utilizada (Ching, Ying y Gen, 2012).

Para la extracción y purificación de enzimas fúngicas, también se han usado disolventes orgánicos como: acetona, etanol y sulfato de amonio (Freer, 2011).

3. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL

En el primer ensayo se realizó un diseño factorial 3x3, donde se evaluó tres factores dados por las fuentes de nitrógeno (extracto de levadura, peptona y caseína), cada uno con tres niveles definidos por la concentración (2, 1 y 0,5 g

L⁻¹), teniendo un total de 9 tratamientos más un blanco, como se describe en la Tabla 5. Se realizaron tres repeticiones por cada tratamiento.

Tabla 5.

Diseño factorial 3x3 empleado en el presente estudio con respecto a: los factores y niveles.

DISEÑO FACTORIAL 3x3		
Tratamientos	Fuente de N (Factor)	Concentración (g L⁻¹) (Nivel)
T0	Blanco	0
T1	Extracto de levadura	2
T2	Peptona	2
T3	Caseína	2
T4	Extracto de levadura	1
T5	Peptona	1
T6	Caseína	1
T7	Extracto de levadura	0,5
T8	Peptona	0,5
T9	Caseína	0,5

En este ensayo, las variables que se evaluaron son la producción de biomasa (g L⁻¹), consumo de sustrato (g L⁻¹), velocidad específica de crecimiento (μ), tiempo de duplicación (td) y rendimiento celular ($Y_{x/s}$).

Una vez encontrada la mejor fuente de nitrógeno se desarrolló un Diseño Central Compuesto (DCC) utilizando el programa MINITAB, con dos puntos axiales (-1,4; +1,4), un punto inferior y uno superior (+1; -1) y 4 puntos centrales, lo que da en total 12 corridas o experimentos. Las observaciones centrales sirvieron para estimar el error experimental y permitieron probar la correcta adecuación al modelo matemático. Se consideró como variables independientes a la fuente de carbono (almidón de trigo) y a la fuente de nitrógeno la cual se seleccionó previamente, asignando a cada una; valores

codificables a partir del diseño experimental y valores decodificables a partir de la ecuación de la recta de cada valor codificado. Los experimentos (fermentaciones submersas de *Aspergillus niger*) se desarrollaron a una temperatura de 25 °C y agitación horizontal de 160 rpm. Se realizaron tres réplicas por cada corrida y las variables respuesta a obtener son: producción de biomasa (g L^{-1}) y la actividad enzimática de la α amilasa (U mL^{-1}) como se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6.

Diseño Central Compuesto (DCC) para la producción de α amilasas.

VARIABLES INDEPENDIENTES				
	Almidón de trigo (g L^{-1})		Fuente nitrógeno (g L^{-1})	
N° Corrida	Variable Codificada	Variable Decodificada	Variable Codificada	Variable Decodificada
1	-1,0	3,20	-1,0	0,80
2	-1,0	3,20	1,0	1,20
3	1,0	8,80	-1,0	0,80
4	1,0	8,80	1,0	1,20
5	-1,4	2,00	0,0	1,50
6	1,4	10,00	0,0	1,50
7	0,0	6,00	-1,4	0,50
8	0,0	6,00	1,4	2,50
9	0,0	6,00	0,0	1,50
10	0,0	6,00	0,0	1,50
11	0,0	6,00	0,0	1,50
12	0,0	6,00	0,0	1,50

Adicionalmente se optimizó la concentración de un activador cloruro de calcio (CaCl_2) a partir de valores de datos bibliográficos, durante la fermentación de *Aspergillus niger* van Tieghem (ATCC® 6275), empleando un último diseño experimental de un factor con cinco niveles (Tabla 7). Se repitió cada

experimento por triplicado. Se midieron en esta fase las variables: producción de biomasa (g L^{-1}) y la actividad enzimática (U mL^{-1}).

Tabla 7.

Diseño 5¹ de las cinco concentraciones del activador (CaCl₂).

DISEÑO 5¹	
Nº Experimento	Concentración CaCl ₂
1	2,12 mM
2	4,24 mM
3	6,36 mM
4	8,48 mM
5	10,6 mM

Una vez optimizadas las condiciones de producción de α amilasas, se procedió a validar la fermentación, para su posterior purificación enzimática.

4. PROCEDIMIENTOS

4.1 Población y muestra

Considerando todos los tipos de harina existentes para la elaboración de productos de panificación, se seleccionó como primera muestra a la harina de trigo, la cual sirvió como sustrato para el desarrollo y fermentación de *Aspergillus niger*.

Como segunda muestra se seleccionó una cepa comercial de *Aspergillus niger* productora de α amilasas, conocida como *Aspergillus niger* van Tieghem (ATCC® 6275™). Este hongo es uno de los mayores productores de α amilasas.

4.2 Materiales y métodos para la obtención de los datos

El presente estudio se llevó a cabo empleando métodos de inferencia inductivos y deductivos y enfoques de investigación cualitativos y cuantitativos originados del trabajo de experimentación.

Se utilizaron también los siguientes protocolos:

Protocolo de activación de la cepa *Aspergillus niger* van Tieghem (ATCC® 6275™) de Microbiologics (Microbiologics, 2011).

Protocolo de criopreservación de cepas fúngicas de ATCC (ATCC, 2011).

Protocolo de optimización de las condiciones de producción de α amilasas a partir de la fermentación submersa y en estado sólido de *Aspergillus niger*, de la Revista Enzyme Research (Castro, Pereira, Fernandes, y Reis, 2011).

Protocolo de extracción, purificación y caracterización de las α amilasas a partir de *Bacillus cereus* y *Aspergillus niger*, del NCBI (Freer, 2011).

Protocolo de producción y purificación parcial de α amilasas a partir de *Bacillus subtilis* (MTCC 121) y *Aspergillus sp.* mediante fermentación sólida y submersa, de la Revista International Biochemical Research (Raul, Biswas, Mukhopadhyay, Kumar, y Gupta, 2014).

Protocolo de técnicas de fermentación y métodos de conservación de *Aspergillus niger* con actividad amilolítica, de la Revista Science Faculty (Henao, Correa y Marín, 2013).

Protocolo de aislamiento y purificación de α amilasas fúngicas, de International Journal of Nutrition and Food Sciences (Racheal, Ahmed, Ndigwe, y Morakinyo, 2015).

A continuación, se detalla el proceso de obtención de α amilasas a partir de la fermentación submersa de *Aspergillus niger* y su posterior purificación:

1. Primera etapa: activación de la cepa de *Aspergillus niger* van Tieghem (ATCC® 6275™) e inoculación en Agar Sabouraud Dextrosa (SDA) con cloranfenicol

La cepa de *Aspergillus niger* van Tieghem (ATCC® 6275™) productora de α amilasas seleccionada para el presente estudio, fue obtenida de la empresa Microbiologics, como se puede observar en el certificado de análisis en Anexos.

Preparación del medio de cultivo: SDA con cloranfenicol

Antes de proceder con la activación de la cepa, primero se realizó el medio de cultivo. Para ello se suspendió 65 g de la composición total del Agar Sabouraud Dextrosa con cloranfenicol (SDA con cloranfenicol) en 1L de agua destilada, como se muestra en la Tabla 8, luego se calentó a 45 °C con agitación constante de 65 rpm, se dejó hervir durante 1 min. para disolver completamente el medio y se reguló el pH a 6,5. Posteriormente se autoclavó a 121 °C durante 30 min., se dejó enfriar un poco y se dispensó en cajas Petri estériles hasta su gelificación (Acumedia, 2014).

Tabla 8.

Composición del SDA con cloranfenicol.

Fórmula / Litro	
Componentes	Cantidad (g L⁻¹)
Digestivo Enzimático de Caseína	5
Digestivo Enzimático de Tejido Animal	5
Dextrosa	40
Cloranfenicol	0,05
Agar	15

En segunda instancia y bajo condiciones estériles (dentro de una cámara de flujo laminar), se procedió a romper el empaque hermético que contenía la

cepa (Figura 7). Posteriormente se realizó la hidratación y activación del microorganismo (Microbiologics, 2011).



Figura 7. Presentación de la cepa *Aspergillus niger* van Tieghem (ATCC® 6275™).

Una vez activada la cepa, se inoculó inmediatamente por estriado en 6 cajas Petri que contenían SDA con cloranfenicol, como se puede ver en la Figura 8 y se dejó incubar a 25 °C bajo una atmósfera aeróbica durante 7 días (Microbiologics, 2011).

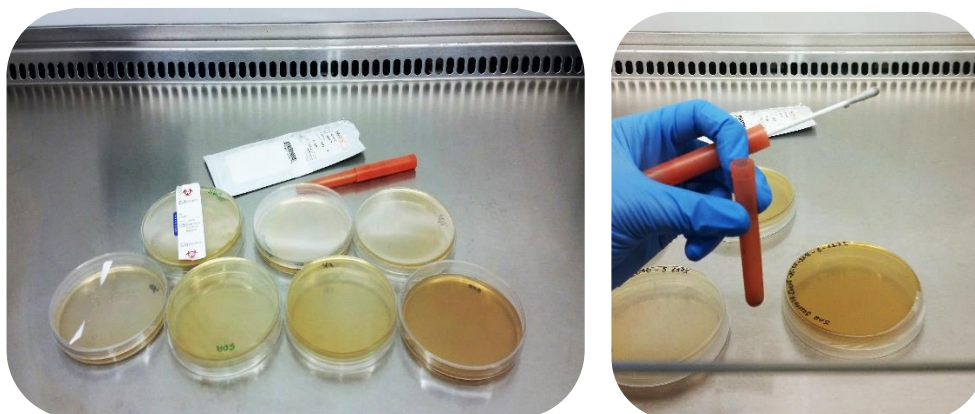


Figura 8. Inoculación de la cepa activa de *Aspergillus niger* van Tieghem (ATCC® 6275™) en SDA con cloranfenicol.

2. Segunda etapa: sub-cultivos seriados y obtención de colonias aisladas de *Aspergillus niger*

Para obtener cultivos más puros se realizaron sub-cultivos seriados, con los resultados obtenidos de la primera etapa; para ello se elaboraron medios de cultivo tanto líquidos: caldo sabouraud dextrosa con cloranfenicol (SDB con cloranfenicol) y peptona salina al 1%, como sólidos: SDA con cloranfenicol.

Preparación del medio de cultivo: SDB con cloranfenicol (solución madre)

Se suspendió 65 g de la composición total del SDB con cloranfenicol (Tabla 9) en 1L de agua destilada, luego se calentó a 45 °C con agitación constante de 65 rpm, se dejó hervir durante 1 min. para disolver completamente el medio y se reguló el pH a 6,5. Posteriormente se autoclavó a 121 °C durante 30 min. y se dejó enfriar (Acumedia, 2014).

Tabla 9.

Composición del SDB con cloranfenicol.

Fórmula / Litro	
Componentes	Cantidad (g L ⁻¹)
Digestivo Enzimático de Caseína	5
Digestivo Enzimático de Tejido Animal	5
Dextrosa	40
Cloranfenicol	0,05

Preparación de la peptona salina al 1%

Se suspendió 0,1 g de peptona salina en 100 ml de agua destilada, se calentó con agitación para disolver completamente el reactivo. Se reguló el pH a 6,5 y se autoclavó a 121 °C durante 30 min. Se dejó enfriar y se dispensó 9 ml en 5 tubos de cultivo estériles.

Preparación de los sub-cultivos seriados y obtención de colonias aisladas de *Aspergillus niger*

Una vez preparados los medios de cultivo, se realizaron los sub-cultivos seriados en una cámara de flujo laminar, para ello se tomó: 100 ml del SDB con cloranfenicol (solución madre) y se inoculó las esporas del hongo *Aspergillus niger* crecido a los 7 días de incubación. A partir de estos 100 ml se realizaron diluciones seriadas 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000 y 1/100000 veces, en peptona salina al 1%.

Finalmente se inoculó por extensión utilizando un triángulo de vidrio estéril, 100 µL de cada dilución seriada de *Aspergillus niger* en SDA con cloranfenicol por duplicado. Se dejó incubar a 25 °C bajo una atmósfera aeróbica durante 7 días.

3. Tercera etapa: prueba cualitativa de degradación del almidón

Se preparó un medio de cultivo que contuvo almidón de trigo y se verificó si existe nuevamente el crecimiento de colonias aisladas con halos de degradación de sustrato, a partir del mejor resultado obtenido de la segunda etapa (dilución 1/100000).

Preparación del medio de cultivo: agar almidón de trigo

Se suspendió 27 g de la composición total del agar almidón de trigo en 1L de agua destilada como se muestra en la Tabla 10, luego se calentó a 45 °C con agitación constante de 65 rpm, se dejó hervir durante 1 min. para disolver completamente el medio y se reguló el pH a 6,5. Posteriormente se autoclavó a 121 °C durante 30 min., se dejó enfriar y se dispensó (HIMEDIA, 2015).

Tabla 10.

Composición del agar almidón de trigo.

Fórmula/ Litro	
Componentes	Cantidad (g L⁻¹)
Digestivo Enzimático de Tejido Animal	5
Almidón de trigo	7
Tetraciclina	0,05
Agar	15

Se realizó el mismo procedimiento de preparación de los sub-cultivos seriados y obtención de colonias aisladas de *Aspergillus niger* de la segunda etapa, a diferencia de que en esta ocasión en los 100 ml de la solución madre del SDB con cloranfenicol, se inocularon las esporas de la mejor dilución (1/100000) de *Aspergillus niger* aislado en la etapa anterior y en lugar de inocular las diluciones 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000 y 1/100000 en SDA con cloranfenicol, se las inoculó en agar almidón de trigo por duplicado y se incubó a 25 °C bajo una atmósfera aeróbica durante 7 días.

Para conocer el tamaño real del halo de degradación de *Aspergillus niger*, se colocó 5 gotas de yodo alrededor de este y se visualizó el resultado de forma cualitativa.

4. Cuarta etapa: optimización y determinación del efecto de la fuente nitrógeno a partir de la fermentación submersa de *Aspergillus niger*

En esta etapa se aplicó el diseño factorial 3x3 propuesto para el primer ensayo, donde se evaluó tres factores (fuente de nitrógeno) cada uno con tres niveles (concentraciones), como se aprecia en la Tabla 5; dando lugar a un total de 9 tratamientos más el blanco.

De acuerdo con este diseño factorial, se realizó una composición diferente para cada fermentación, incluyendo una fermentación blanco (sin fuente de nitrógeno), como se muestra a continuación:

Preparación del caldo de fermentación blanco

Se preparó un caldo de fermentación blanco de acuerdo a la composición de la Tabla 11, una vez preparado se calentó a 45 °C con agitación constante de 65 rpm, se dejó hervir durante 1 min. para disolver completamente el almidón y se ajustó el pH a 6,5. Posteriormente se autoclavó a 121 °C durante 30 min. y se dejó enfriar.

Tabla 11.

Composición de la fermentación blanco.

Fórmula/ Litro	
Componentes	Cantidad g/0,2 L
Almidón de trigo	3g
Tetraciclina	0,001g
Agua destilada	0,2 L

Preparación de los caldos de fermentación con diferentes fuentes de nitrógeno (extracto de levadura, peptona y caseína) y en distinta concentración

Se preparó 9 caldos de fermentación de acuerdo a la composición de la Tabla 12. Una vez preparados, al igual que el caldo de fermentación blanco, se calentaron individualmente a 45 °C con agitación constante de 65 rpm, se dejaron hervir durante 1 min. para disolver completamente el almidón y se ajustó el pH de cada uno a 6,5. Posteriormente se autoclavaron a 121 °C durante 30 min. y se dejaron enfriar.

Tabla 12.

Composición de los caldos de fermentación con variaciones por triplicado de acuerdo a cada fuente de N y su concentración.

Fórmula/ 0,2 L					
N° Tratamiento	Fuente de N	Concentración (g/0,2 L)	Almidón de trigo (g/0,2 L)	Tetraciclina (g/0,2 L)	Agua destilada (L)
T0	Blanco	0	3	0,001	0,2
T1	Extracto de levadura	0,4	3	0,001	0,2
T2	Peptona	0,4	3	0,001	0,2
T3	Caseína	0,4	3	0,001	0,2
T4	Extracto de levadura	0,2	3	0,001	0,2
T5	Peptona	0,2	3	0,001	0,2
T6	Caseína	0,2	3	0,001	0,2
T7	Extracto de levadura	0,1	3	0,001	0,2
T8	Peptona	0,1	3	0,001	0,2
T9	Caseína	0,1	3	0,001	0,2

A continuación, bajo condiciones estériles se inocularon en cada uno de los caldos de fermentación las esporas de la mejor dilución (*dilución 1/100000*) de *Aspergillus niger* obtenidas en la tercera etapa. Luego se incubó a 25 °C todos los tratamientos con agitación horizontal de 160 rpm durante 7 días.

5. Quinta etapa: determinación del efecto de la fuente nitrógeno sobre la producción de biomasa, consumo de sustrato, μ , t_d , $Y_{x/s}$ del blanco y los tratamientos.

Elaboración de la curva de calibrado para la biomasa

A partir de la fermentación inicial, se prepararon diluciones como se muestra en la Tabla 13.

Tabla 13.

Concentración del volumen de la fermentación y el medio de cultivo estéril para la elaboración de la curva de calibrado de la biomasa.

Tratamiento/ Dilución (1 ml)	Medio de cultivo (ml)	Medio de cultivo estéril (ml)	Volumen total (ml)
Blanco	0	10	10
1	9	1	10
2	8	2	10
3	7	3	10
4	6	4	10
5	5	5	10
6	4	6	10
7	3	7	10
8	2	8	10
9	1	9	10

Se colocó 1 ml de cada dilución en una cubeta de medición espectrofotométrica y se midió su absorbancia a 600 nm, anteponiendo un blanco constituido

solamente de medio estéril (1ml), este proceso se repitió con cada una de las muestras cada 5 h durante 7 días (Flores, 2015, p. 6).

Los 9 ml sobrantes de cada dilución se centrifugaron durante 13 min a 13 500 rpm, terminada la centrifugación, se retiró el sobrenadante y se realizaron 3 lavados, resuspendiendo el pellet en 1 ml de agua destilada y centrifugándolo. En el último lavado se descartó 500 µL del sobrenadante y en los 500 µL sobrantes se resuspendió el pellet y se agitó en el vórtex. Se colocó la muestra en un recipiente de aluminio (previamente pesado), luego se secó a 95 °C en una estufa durante 24 h, una vez completamente seca la biomasa, se retiró el recipiente de la estufa, se lo colocó en un desecador hasta que alcanzó la temperatura ambiente y se pesó (Flores, 2015, p. 7). Finalmente se realizó los cálculos para obtener el valor del peso seco de la biomasa en unidades de g/ml, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Peso seco} \left(\frac{g}{ml} \right) = \frac{(\text{Peso Recipiente} + \text{Muestra Seca}) - (\text{Peso Inicial recipiente})}{\text{Volumen de muestra}}$$

(Ecuación 1)

Se utilizó 14 muestras de *Aspergillus niger* van Tieghem (ATCC® 6275) de cada tratamiento más el blanco y se cuantificó el peso en intervalos de 5 horas durante 7 días (Flores, 2015, p. 7).

Procesamiento de los datos del blanco más los 9 tratamientos para la elaboración de la curva de calibrado de la biomasa

Se graficó la curva de calibrado de biomasa en una hoja de cálculo de Excel, colocando en el eje X los valores de peso de los tratamientos y en el eje Y los valores de las absorbancias medidas a 600 nm. Con la ecuación de la recta ($y = mx + b$), se convirtió los datos de absorbancia, en datos de concentración de biomasa (Flores, 2015).

Curva de crecimiento

Se graficó la curva de crecimiento con los datos de absorbancia a 600 nm vs el tiempo en h.

Elaboración de la curva de calibrado de la glucosa (sustrato)

A partir de una solución estándar de 0,05 g de glucosa suspendidos en 50 ml de agua destilada, se prepararon las diluciones que se muestran en la Tabla 14 (Flores, 2015, p. 5).

Tabla 14.

Concentración de las diluciones de glucosa para la elaboración de la curva de calibrado.

Dilución de glucosa (g/ml)	Volumen de la solución stock (ml)	Volumen de agua destilada (ml)	Volumen total de la dilución (ml)
0 (0,01)	5	0	5
1 (0,009)	4,5	0,5	5
2 (0,008)	4	1	5
3 (0,007)	3,5	1,5	5
4 (0,006)	3	2	5
5 (0,005)	2,5	2,5	5
6 (0,004)	2	3	5
7 (0,003)	1,5	3,5	5
8 (0,002)	1	4	5
9 (0,001)	0,5	4,5	5
10 (0,0)	0	5	5

Luego de preparar las diluciones de glucosa, se tomó 250 μ L de la dilución total y se colocó en un tubo Eppendorf que contenía 1 ml de DNS, se calentó la mezcla a 95 °C durante 5 min. Se dejó enfriar y se colocó en una cubeta de

medición espectrofotométrica y se midió su absorbancia a 540 nm. Usando la fórmula $C_1V_1=C_2V_2$, se transformó los datos y se graficó la curva de calibrado de glucosa en una hoja de cálculo de Excel, colocando en el eje X los valores de la concentración final de la glucosa y en el eje Y los valores de la absorbancia (Flores, 2015, p. 5).

Evaluación de la producción de biomasa por espectrofotometría

Se utilizó 14 muestras de *Aspergillus niger* van Tieghem (ATCC® 6275) de cada tratamiento más el blanco y se cuantificó la producción de biomasa. Para ello se tomó 1 ml por muestra en intervalos de 5 horas durante 7 días, se lo colocó en una celda de medición espectrofotométrica y se midió su absorbancia a 600 nm colocando previamente un blanco realizado con 750 μ L de agua destilada y 250 μ L de medio de cultivo estéril (Flores, 2015, p. 5).

Evaluación del consumo de sustrato por espectrofotometría

Se usó 14 muestras de *Aspergillus niger* van Tieghem (ATCC® 6275) de cada tratamiento más el blanco y se cuantificó el consumo de sustrato a través de la concentración de glucosa. Para ello se tomó 1 ml por muestra en intervalos de 5 horas durante 7 días, se lo colocó en una celda de medición espectrofotométrica y se midió su absorbancia a 540 nm, colocando previamente un blanco realizado con 750 μ L de DNS y 250 μ L de agua destilada (Flores, 2015, p. 6).

Determinación de la velocidad específica de crecimiento (μ), tiempo de duplicación (td) y rendimiento celular ($Y_{x/s}$) del blanco y los 9 tratamientos

Para calcular el valor de μ se utilizó la siguiente ecuación:

$$\mu = \frac{(\ln x_f - \ln x_o)}{\Delta t} \quad (\text{Ecuación 2})$$

x_f - Concentración celular final

x_o - Concentración celular inicial

Δt - tiempo de crecimiento durante la fase exponencial

Para obtener el t_d , se aplicó la siguiente ecuación:

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (\text{Ecuación 3})$$

Para calcular el rendimiento celular ($Y_{x/s}$). Al inicio del experimento, en la fase de inoculación de *Aspergillus niger* en el medio de cultivo estéril y en el tiempo 0, se midió la absorbancia de una muestra (1ml). Se transformó este dato en una medida de concentración, con la ecuación obtenida de la curva de calibrado para obtener el valor de biomasa inicial. Con el método de peso seco se determinó la cantidad de la biomasa obtenida en el tiempo final. Por otro lado, utilizando el método del DNS se determinó la concentración de glucosa inicial y final a través de su medición espectrofotométrica a 540 nm. Finalmente, con los datos iniciales y finales tanto de la concentración de sustrato (ΔX) como de la concentración de la biomasa (ΔS) se calculó el rendimiento celular utilizando la siguiente ecuación:

$$Y_{x/s} = \frac{\Delta X}{-\Delta S} = \frac{g \text{ células producidas}}{g \text{ sustrato consumido}} \quad (\text{Ecuación 4})$$

6. Sexta etapa: determinación de la actividad enzimática de las fermentaciones por espectrofotometría UV-VIS utilizando DNS y evaluación del efecto del activador CaCl_2 sobre la actividad enzimática de la mejor fermentación.

Luego de 7 días de fermentación, se determinó la actividad amiloglucosidasa de la cepa *Aspergillus niger* van Tieghem (ATCC® 6275™), mediante la cuantificación de los azúcares reductores por el método del DNS (Annamalai, Thavasi, Vijayalakshmi y Balasubramanian, 2011, pp. 224-429; Henao et al., 2013, pp. 51-60).

Para ello primero se preparó la solución sustrato que contuvo: 100 ml de Buffer Tris HCL 50 mM y 1,5 g de almidón de trigo, se calentó a 45 °C con agitación constante de 65 rpm, se dejó hervir hasta disolver completamente el almidón y se ajustó el pH a 6,5 considerado como un pH óptimo para producción de α amilasas. Se dejó enfriar y luego se tomó 10 ml de esta solución sustrato y se le agregó 3 ml de la primera solución de fermentación (fermentación blanco T0), formando el medio de reacción. Al instante se colocó 0,7 μ L de este medio de reacción en 10 tubos Eppendorf que contenían 0,3 μ L de DNS, para detener la reacción enzimática en los tiempos: 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 min. y se calentaron todas las muestras a 95 °C durante 15 min. en un termobloque digital (Annamalai et al., 2011, pp. 224-429; Raul et al., 2014, pp. 1-5).

Se procedió a medir la absorbancia de las 11 muestras de *Aspergillus niger* van Tieghem (ATCC® 6275) y se cuantificó la cantidad de azúcar presente en el sustrato en intervalos de 1 min., durante 10 min., mediante la técnica de espectrofotometría de punto fijo UV- VIS a 540 nm, utilizando como blanco 0,3 μ L de solución sustrato y 0,7 μ L de agua destilada. Finalmente se registraron los valores de absorbancia obtenidos de acuerdo a cada tiempo establecido. Se repitió este mismo proceso para cada una de las fermentaciones preparadas (Raul et al., 2014, pp. 1-5).

Usando la ecuación ($y = mx + b$) de la pendiente de la gráfica de la curva de calibrado de la glucosa, se transformó los datos de absorbancia en datos de concentración de glucosa y se graficó la actividad enzimática en una hoja de

cálculo de Excel, colocando en el eje X el tiempo en min y en el eje Y los valores de la absorbancia a 540 nm (Flores, 2015, p. 5).

Con los datos de concentración de biomasa y actividad enzimática obtenidos, se terminó de elaborar el DCC para validar los resultados adquiridos en el T1.

Determinación de la concentración de un posible activador (CaCl₂) y su efecto sobre la actividad enzimática y producción de biomasa de *Aspergillus niger*

De acuerdo con los resultados obtenidos en cuanto a los parámetros cinéticos: mejor actividad enzimática, mayor concentración de biomasa, menor consumo de sustrato y rendimiento celular superior, se eligió la mejor fermentación, en la cual se probó un posible activador (CaCl₂) de las condiciones de fermentación.

Para ello, se colocaron diferentes concentraciones de CaCl₂ (2,12 mM, 4,24 mM, 6,36 mM, 4,48 mM y 10,6 mM (diseño 5¹ de la Tabla 7), en la mejor fermentación de *Aspergillus niger* y se repitió cada experimento por triplicado. Finalmente, para verificar si el activador optimizó aún más las condiciones de fermentación, se midió la actividad enzimática y la concentración de biomasa por espectrofotometría UV-VIS a 540 y 600 nm respectivamente.

7. Séptima etapa: criopreservación del hongo *Aspergillus niger* van Tieghem (ATCC® 6275™)

Se evaluó un método de conservación para *Aspergillus niger*, el cual consistió en la criopreservación en glicerol al 50% de las esporas de este hongo aislado a los 7 días (cuarta etapa), constatando además que se encontraba en la fase logarítmica, determinada mediante la curva de crecimiento del hongo (la metodología de la curva de crecimiento se especifica en la quinta etapa).

Para ello se prepararon suspensiones de $2,15 \times 10^6$ UFC mL⁻¹ procedentes de las esporas de *Aspergillus niger* desarrolladas en agar almidón de trigo (cuarta etapa), cada suspensión fue colocada en tubos Eppendorf de 1,5 ml que

contenían 500 µl de dos medios de cultivo estériles diferentes: leche al 7% y SDB. Posteriormente se adicionó 500 µl de glicerol estéril al 50% formando una concentración 1:1 hasta completar 10 alícuotas por medio de cultivo, se agitó en el vórtex durante 1 min. y luego se refrigeró a -80 °C durante 2 meses (Sánchez y Corrales, 2010; ATCC, 2011; Perkins, 2015).

Temperatura de congelación

La temperatura de congelación seleccionada para la criopreservación de *Aspergillus niger* en los medios de cultivo leche al 7% y SDB en glicerol fue de -80 °C, para llegar a esta temperatura, previamente se fue acoplado el hongo a temperaturas inferiores cada 24 horas, hasta llegar a la temperatura establecida de acuerdo al siguiente orden: 8 °C, 2 °C, -20 °C y -80 °C como se puede observar en la Tabla 15 y Figura 9 (Perkins, 2015; ATCC, 2011).

Tabla 15.

Datos de la curva de congelación de Aspergillus niger.

Tiempo (h)	Temperatura (°C)
0	8
24	2
48	-20
72	-80

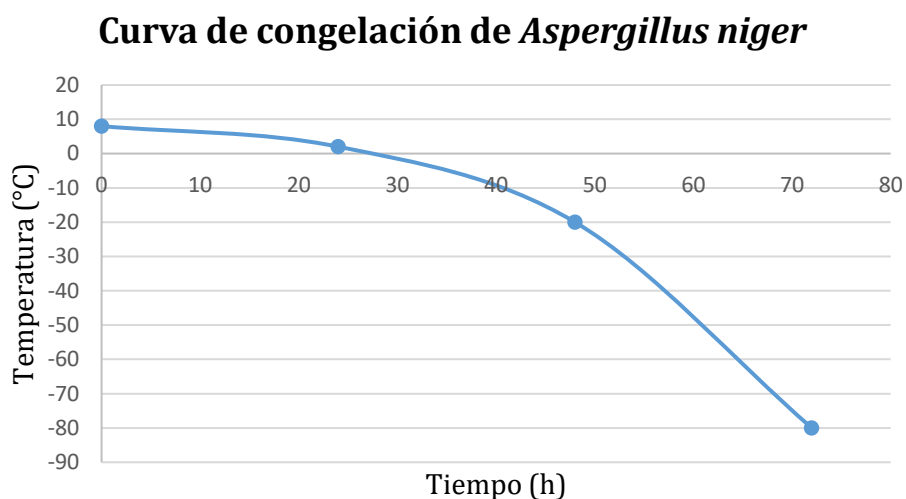


Figura 9. Curva de congelación de *Aspergillus niger* van Tieghem (ATCC® 6275™).

Prueba de viabilidad

Luego de dos meses, se descongelaron dos alícuotas de *Aspergillus niger* una de cada medio de cultivo: leche al 7% y SDB criopreservadas en glicerol al 50%, de acuerdo al tiempo y temperatura descritos en la Tabla 16 y Figura 10.

Tabla 16.

Datos de la curva de descongelación de *Aspergillus niger*.

Tiempo (h)	Temperatura (°C)
0	-80
24	-20
48	2
72	8

Curva de descongelación de *Aspergillus niger*

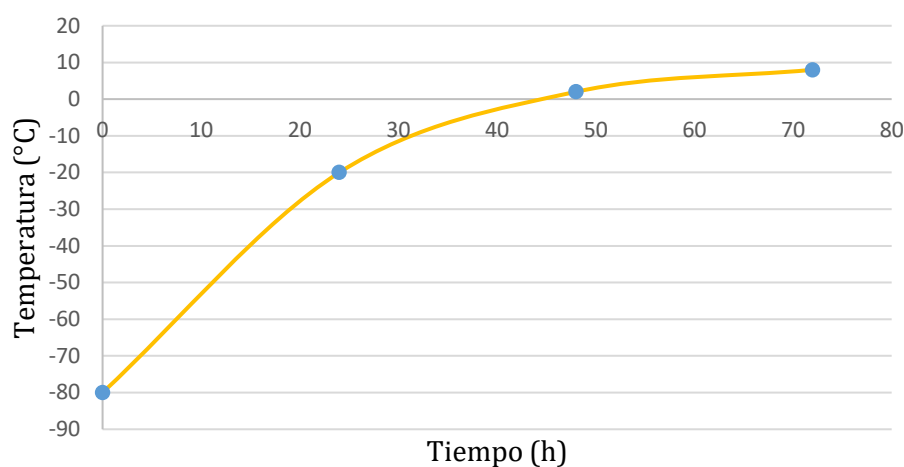


Figura 10. Curva de descongelación de *Aspergillus niger* van Tieghem (ATCC® 6275™).

Se confirmó la viabilidad del hongo, mediante el mayor crecimiento, previa siembra por duplicado de cada alícuota en agar almidón de trigo, incubado a 25 °C durante 7 días y la medición enzimática de cada uno de estos experimentos, utilizando la misma metodología de la sexta etapa (Sánchez y Corrales, 2010; ATCC, 2011).

8. Octava etapa: purificación de la mejor fermentación mediante ultrafiltración y precipitación con sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄) para la obtención de α amilasas

Ultrafiltración del medio de fermentación

En condiciones estériles, se ultrafiltró el extracto crudo de la mejor fermentación con fuente de nitrógeno: 2 g L⁻¹ de extracto de levadura (T1) y activador CaCl₂ 6,36 mM, con microfiltros de membrana de 0,045 μm, como se puede observar en la Figura 11 (Khan y Yadav, 2011).

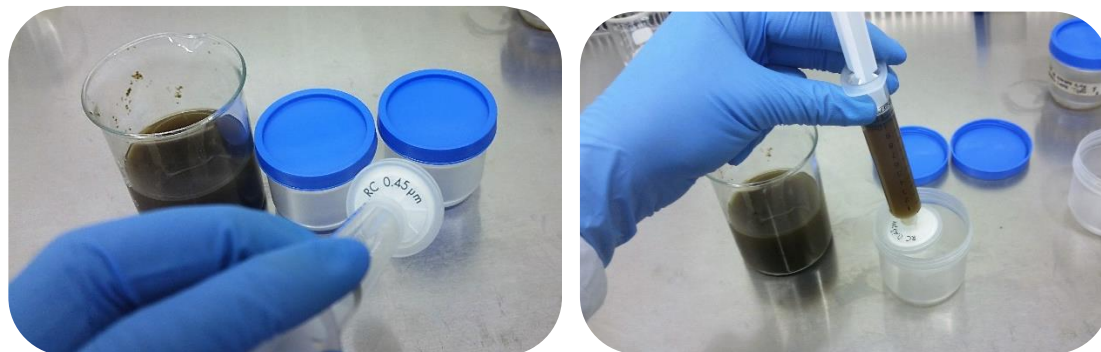


Figura 11. Ultrafiltración del extracto crudo de la fermentación con la mejor fuente de nitrógeno y activador.

Extracción y purificación de la enzima cruda

Una vez ultrafiltrado el extracto crudo de la mejor fermentación, se realizó la extracción y purificación de la enzima bruta por duplicado utilizando 7,5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ por cada 6 ml de medio enzimático ultrafiltrado, con agitación constante de 160 rpm durante 48 horas. Posteriormente se centrifugó cada experimento a 4 °C y 10000 rpm durante 45 min. (Khan y Yadav, 2011; Raul et al., 2014, pp. 10-15).

Terminada la centrifugación, se descartó el sobrenadante de cada tubo Falcón y se resuspendió el precipitado enzimático en 6 ml de buffer tampón fosfato 100 mM, pH 6,5. Se dializó durante toda la noche en el mismo tampón y al día siguiente se midió la actividad enzimática y la concentración de biomasa por espectrofotometría UV-VIS a 540 y 600 nm respectivamente (Khan y Yadav, 2011; Raul et al., 2014, pp. 10-15).

9. Novena etapa: elaboración de pan de yema con y sin α amilasas

La elaboración de pan de yema con y sin α amilasas, se realizó en la panadería y pastelería Bocatta ubicada en la ciudad de Quito, con ayuda del personal de trabajo.

Elaboración de pan de yema con α amilasas

Mientras se batían los ingredientes del pan de yema sin α amilasas, se siguió el procedimiento de elaboración descrito en Anexos, con la única diferencia de que luego de activar la levadura se colocó 5 ml de las α amilasas purificadas como se puede observar en la Figura 12. Se continuó con el procedimiento hasta conseguir dos masas: una sin α amilasas y otra con α amilasas, como se puede observar en la Figura 13.



Figura 12. Adición de α amilasas purificadas luego de la activación de la levadura para la elaboración de pan de yema con α amilasas.



Figura 13. Masa en Reposo.

- A) Sin α amilasas.
- B) Con α amilasas.

Al terminar el reposo de ambas masas, se pesaron bolitas de 6,8 g de cada una y se colocaron en una lata de horneo. Se volvió a poner el papel de cocina para evitar contaminación y se dejó en reposo durante 15 min., como se puede observar en la Figura 14. Transcurrido el tiempo, se dio la forma característica del pan y se horneó a 170 °C durante 10 min. como se muestra en la Figura 15.

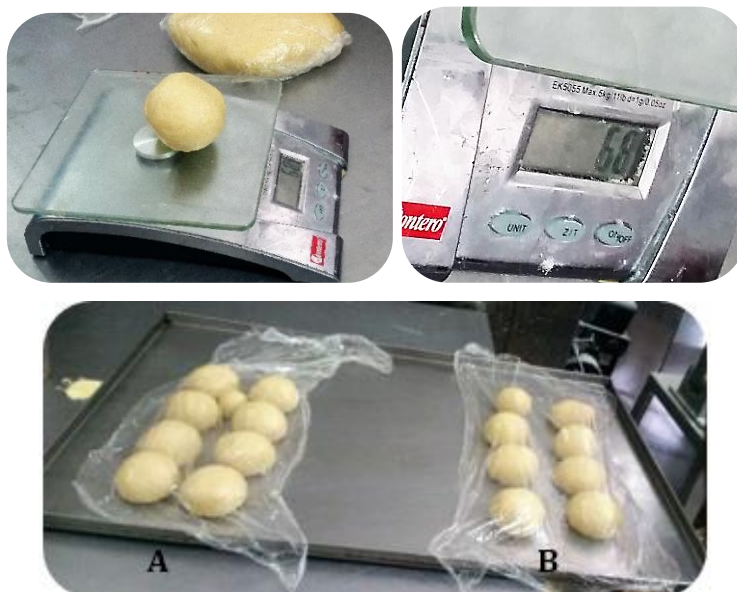


Figura 14. Pesaje y reposo de las masas.

A) Sin α amilasas.

B) Con α amilasas.



Figura 15. Moldeado y horneado del pan.

A) Sin α amilasas.

B) Con α amilasas.

Finalmente se realizó una degustación del pan de yema sin y con α amilasas tanto al personal de la panificadora Bocatta, como a 50 personas más del centro comercial Granados Plaza. Posteriormente se realizó encuestas sobre algunas características organolépticas como: sabor, color, textura y porosidad o estructura de la miga, determinando el nivel de aceptación y las diferencias entre cada tipo de pan elaborado.

4.3 Evaluación estadística de los resultados

Para analizar las variables producción de biomasa y actividad enzimática en el primer ensayo se utilizaron dos tipos de evaluaciones estadísticas: análisis de varianza (ANOVA) usando el software Microsoft Excel y una prueba de Tukey utilizando el programa MINITAB y SPSS.

Luego de obtener las variables de respuesta del DCC, se realizó dos tipos de pruebas estadísticas: ANOVA y un análisis de superficie de respuesta utilizando el software STATISTICA como se puede ver en la Figura 16. Esta última prueba se utilizó para comprobar que la cantidad de biomasa y la actividad enzimática obtenidas correspondían a las esperadas según datos bibliográficos.

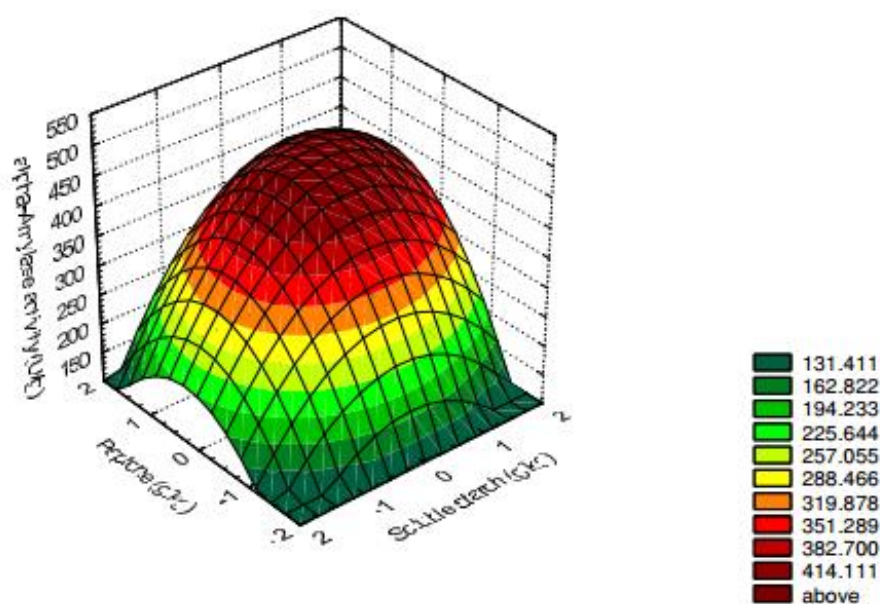


Figura 16. Diseño de superficie de respuesta que muestra el efecto de la variación de pH, concentración de la fuente de carbono y su efecto mutuo sobre la producción de α amilasas.

Tomada de Kunamneni, Santhosh, y Singh, 2013.

Para el análisis de resultados después de optimizar la concentración del activador CaCl_2 , se utilizó un ANOVA y una prueba de Tukey para determinar

diferencias significativas entre experimentos y para realizar un contraste entre pares de medias.

Los resultados de actividad enzimática fueron analizados a través de un ANOVA para identificar diferencias en dicha variable de respuesta de acuerdo a los experimentos. En los análisis estadísticos se trabajó con nivel de significancia (α) de 0,05.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Primera etapa: activación de la cepa de *Aspergillus niger* van Tieghem (ATCC® 6275™) e inoculación en SDA con cloranfenicol

Se obtuvo como resultados el crecimiento y esporulación de la cepa *Aspergillus niger* van Tieghem (ATCC® 6275™), los cuáles fueron más pronunciados en 2 de las 6 cajas Petri inoculadas, luego de 7 días de incubación a 25 °C bajo una atmósfera aeróbica (previa activación y siembra en SDA con cloranfenicol) como se observa en la Figura 17.



Figura 17. Formación de esporas de la cepa *Aspergillus niger* van Tieghem (ATCC® 6275™).

El crecimiento y esporulación de la cepa *Aspergillus niger* van Tieghem (ATCC® 6275™) se logró gracias a condiciones de crecimiento tales como: la composición del medio de cultivo (SDA con cloranfenicol), la temperatura (25 °C) y el pH (6,5). Como se menciona en Acumedia (2014); los componentes del

medio de SDA con cloranfenicol como: el digestivo enzimático de caseína y el digestivo enzimático de tejidos animales proporcionan la fuente de nitrógeno y vitaminas necesarias para el desarrollo del hongo, al igual que la elevada concentración de dextrosa, que actúa como fuente de carbono o energía. Según Aryal (2015); el cloranfenicol el cual forma parte de la composición del SDA, es un antibiótico que inhibe el crecimiento de un gran número de bacterias Gram positivas y Gram negativas. Como afirma Passamani y otros (2014); la temperatura de 25 °C y el pH de 6,5 permiten la esporulación y pigmentación de color negro luego de 7 días de incubación de *Aspergillus niger*.

2. Segunda etapa: sub-cultivos seriados y obtención de colonias aisladas de *Aspergillus niger*

Se obtuvo como resultados la formación de colonias: aglomeradas, ligeramente más diferenciadas, aún más diferenciadas, diferenciadas y totalmente diferenciadas y puras (Figura 18 A, B, C, D, E, respectivamente), a partir de la inoculación por extensión en SDA con cloranfenicol de las diluciones 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000 y 1/100000 de *Aspergillus niger* van Tieghem (ATCC® 6275™), respectivamente, luego de 7 días de incubación a 25 °C bajo una atmósfera aeróbica. Cabe destacar que en todos los medios se observó la presencia de esporas y en la última dilución además se evidenció la presencia de halos de degradación del sustrato.

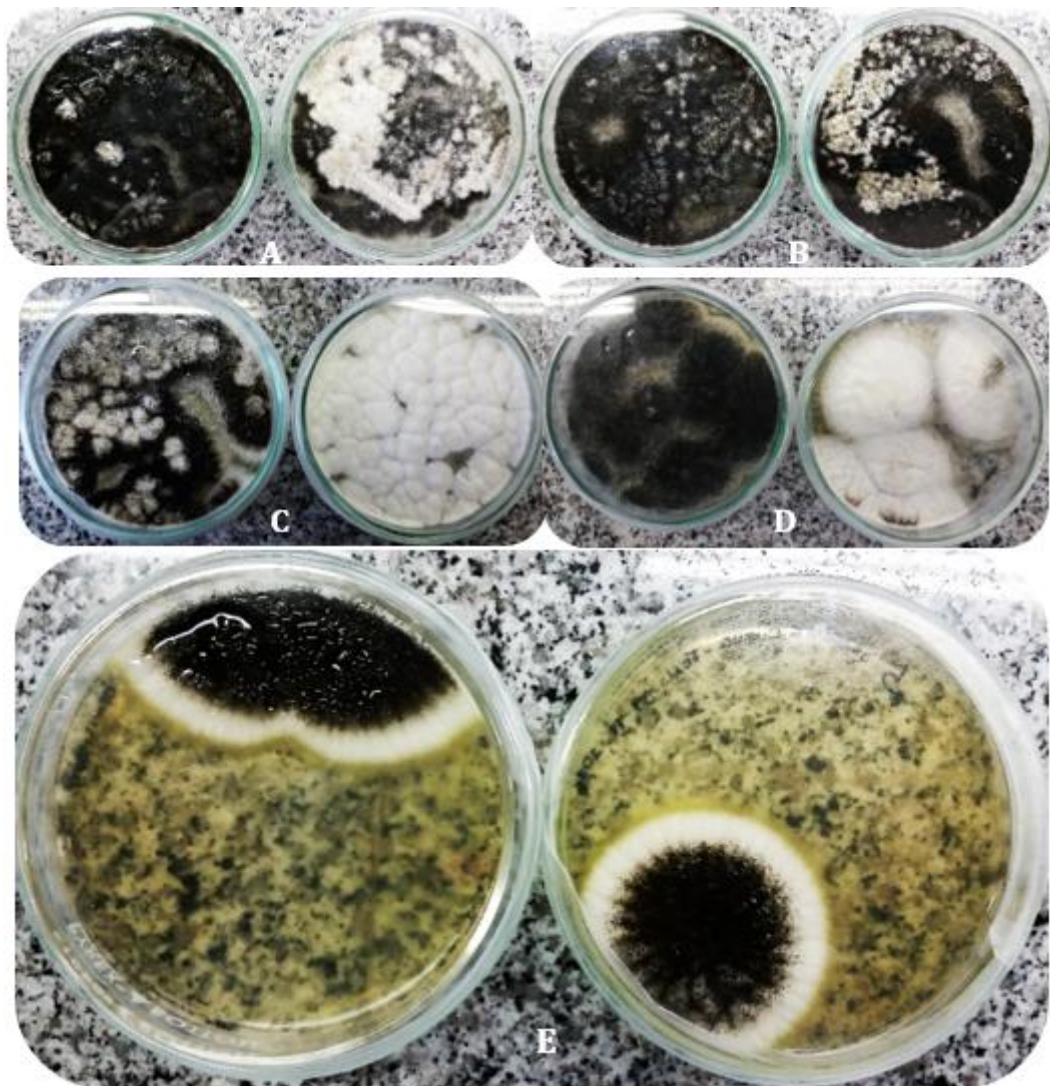


Figura 18. Crecimiento de Aspergillus niger a partir de diluciones seriadas.

- A) Colonias aglomeradas con esporas a partir de la dilución 1/10.
- B) Colonias ligeramente diferenciadas con esporas a partir de la dilución 1/100.
- C) Colonias más diferenciadas con esporas a partir de la dilución 1/1000.
- D) Colonias diferenciadas con esporas a partir de la dilución 1/10000.
- E) Colonias totalmente diferenciadas y puras, con presencia de esporas y halos de degradación del sustrato a partir de la dilución 1/100000.

El mejor resultado de crecimiento a partir de las diluciones seriadas de *Aspergillus niger* van Tieghem (ATCC® 6275™) fue el de la dilución 1/100000 en donde se obtuvo cultivos puros y totalmente aislados (una sola colonia con esporas y halo de degradación definido) luego de su incubación aeróbica a 25 °C (Figura 18 E), Según Vargas (2014); UNAM (2012, p. 81); este fenómeno

se debe a que mientras más se va diluyendo la concentración inicial de *Aspergillus niger* a través de diluciones seriadas como: 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000 y 1/100000, más se va disminuyendo el número de colonias de este hongo. La presencia de colonias blancas en forma de hifas y en una fase más tardía el crecimiento de conidios globulares con esporas de color negro, son características morfológicas propias de *Aspergillus niger* al igual que la presencia del halo de degradación incoloro con un diámetro de 1 mm, que puede extenderse hasta 2 mm de acuerdo al sustrato y las condiciones bajo las cuales haya crecido (Encyclopedia of Life, 2015; Hina, Saleem y Syeda, 2013, pp. 105-107; Silva et al., 2011, pp. 762-766).

3. Tercera etapa: prueba cualitativa de degradación del almidón

Se obtuvo como resultados el crecimiento de esporas a partir de la inoculación por extensión en agar almidón de trigo de las diluciones: 1/10, 1/100, 1/1000 y 1/10000 (Figuras 19 A, B, C y D respectivamente), y el crecimiento de una colonia completamente diferenciada y pura con presencia de esporas y halo de degradación del sustrato a partir de la dilución 1/100000 de *Aspergillus niger* van Tieghem (ATCC® 6275™) luego de 7 días de incubación a 25 °C bajo una atmósfera aeróbica (Figura 19 E).

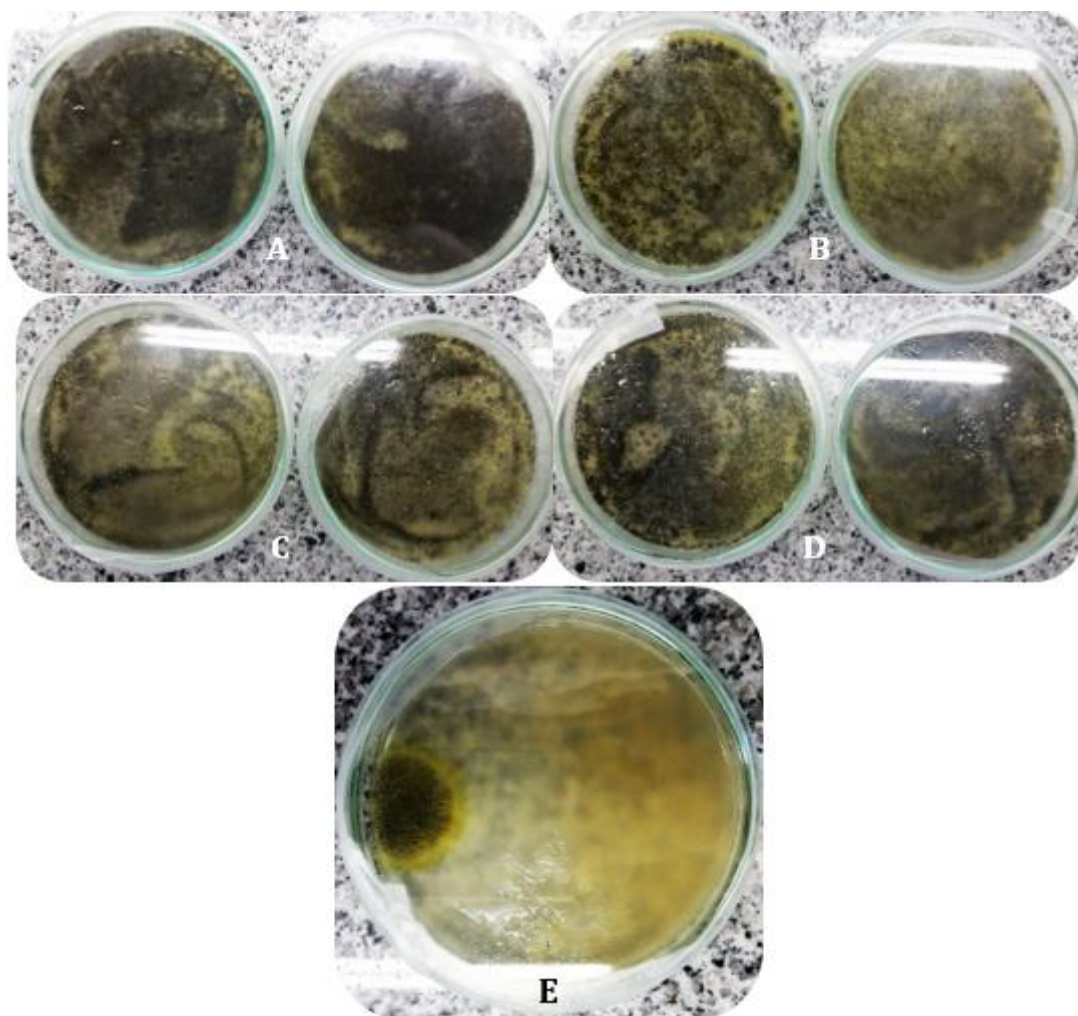


Figura 19. Crecimiento de *Aspergillus niger* en agar almidón de trigo a partir de nuevas diluciones.

A) Dilución 1/10.

B) Dilución 1/100.

C) Dilución 1/1000.

D) Dilución 1/10000.

E) Formación de Colonia completamente diferenciada y pura con presencia de esporas y halo de degradación del sustrato en la dilución 1/100000.

Nuevamente la dilución 1/100000 de *Aspergillus niger* van Tieghem (ATCC® 6275™) esta vez inoculada en agar almidón de trigo, mostró el mejor crecimiento del hongo (colonia aislada con esporas y halo de degradación del almidón) luego de su incubación aeróbica a 25 °C (Figura 19 E), lo que se debe a la disminución de la concentración del número de colonias a través de las diluciones seriadas 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000 y 1/100000 de *Aspergillus*

niger (Vargas, 2014; UNAM, 2012, p. 81). Al igual que en la etapa anterior, la presencia de colonias blancas en forma de hifas y en una fase más tardía, el crecimiento de conidios globulares con esporas de color negro, son características distintivas propias de *Aspergillus niger* al igual que la presencia del halo de degradación de color amarillo claro, en esta ocasión con un diámetro de 1,2 cm (Encyclopedia of Life, 2015; Hina, Saleem y Syeda, 2013, pp. 105-107; Silva et al., 2011, pp. 762-766).

Como afirma Shihui y otros (2016, pp. 1-10); el uso de almidón de trigo como única fuente de carbono proporciona las vitaminas y energía necesarias para el óptimo desarrollo del hongo, además de incrementar diámetro del halo de degradación del sustrato, lo que confirma el aumento de este en 0,2 cm. Según Hewa, Hakki, Hero y Goceri (2014, pp. 7-10); el uso de tetraciclina, la cual formó parte del medio almidón de trigo, inhibe el crecimiento de bacterias Gram positivas y Gram negativas. Además, la temperatura (25 °C) y pH (6,5) óptimos posibilitaron el crecimiento selectivo de *Aspergillus niger* estimulando su esporulación y pigmentación de color negro (Shamala, Vijayendra y Joshi, 2012).

Se confirmó la degradación del almidón (sustrato) por acción de la hidrólisis enzimática de *Aspergillus niger* a partir de la mejor dilución: 1/100000, mediante el cambio de color de amarillo claro a azul oscuro del medio de cultivo (agar almidón de trigo) y la presencia de una zona clara alrededor del halo de degradación de la colonia luego de la adición de yodo al medio (Figura 20). Según Asare† y otros (2011); el cambio de color del medio cultivo de amarillo claro a azul oscuro, se debe al acoplamiento del yodo a una de las dos moléculas de glucosa de las cuales está constituido el almidón (amilosa lineal y amilopectina ramificada), en este caso a la amilosa lineal, formando un fuerte complejo de color azul oscuro. Como se puede observar en la Figura 20 no todo el medio de cultivo se tiñó de color azul, hay una zona incluido el halo de degradación que no se tiñeron, sino que mantuvieron su color claro y amarillo. Según Suarez y Manríquez (2014); Ogbonna y otros (2015, pp. 10-16); esto

indica que el complejo formado entre el yodo y los polímeros de la amilosa lineal fueron desintegrados o hidrolizados posiblemente por enzimas α amilasas que son las encargadas de desintegrar los enlaces α -1,4 glucosídicos presentes en la parte interna de la estructura de la amilosa, este procedimiento permite obtener azúcares más simples o de menor tamaño. Además de que *Aspergillus niger* van Tieghem (ATCC® 6275™) es productor de las α amilasas antes mencionadas.



Figura 20. Prueba positiva para la degradación del almidón al añadir yodo al medio, a partir de la dilución 1/100000 de *Aspergillus niger*.

4. Cuarta etapa: optimización y determinación del efecto de la fuente nitrógeno a partir de la fermentación submersa de *Aspergillus niger*

Se obtuvo aglomerados de células a partir de las esporas fermentadas de la mejor dilución: 1/100000 de *Aspergillus niger* van Tieghem (ATCC® 6275™), luego de 7 días de fermentación a 25 °C con agitación continua de 160 rpm, considerando la variación de la fuente de nitrógeno y su concentración de acuerdo a lo planteado en el diseño factorial 3x3, a excepción de la fermentación blanco que no tuvo ninguna fuente de nitrógeno, como se puede observar en las Figuras 21 A, B, C, D, E, F, G, H, I y J.

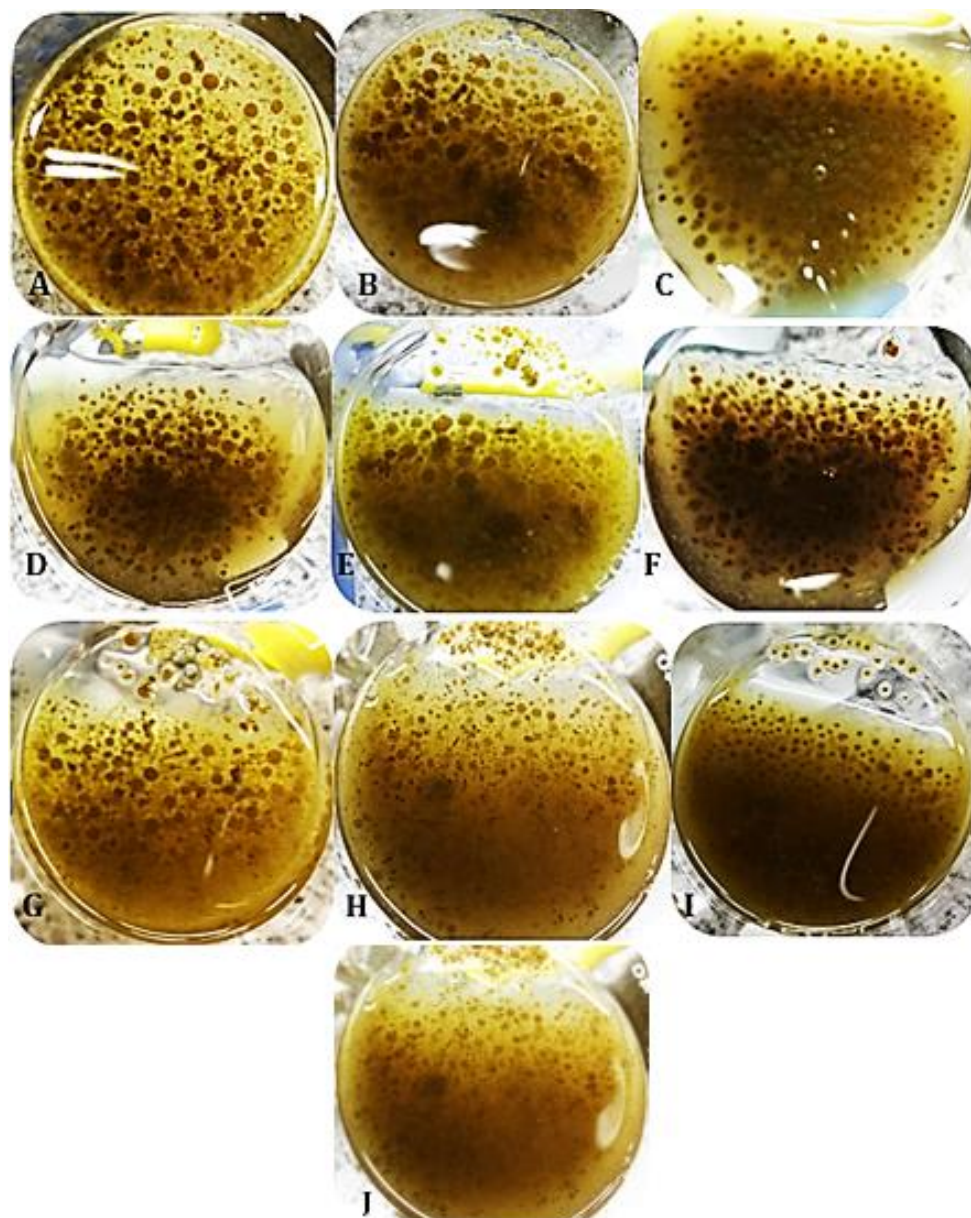


Figura 21. Resultados de las fermentaciones de *Aspergillus niger* al utilizar distintas fuentes de nitrógeno y en diferente grado de concentración.

- A) Cúmulos celulares grandes en el T1.
- B) Cúmulos celulares grandes en el T2.
- C) Cúmulos celulares grandes en el T3.
- D) Cúmulos celulares de tamaño medio en el T4.
- E) Cúmulos celulares de tamaño medio en el T5.
- F) Cúmulos celulares de tamaño medio en el T6.
- G) Cúmulos celulares pequeños en el T7.
- H) Cúmulos celulares pequeños en el T8.
- I) Cúmulos celulares pequeños en el T9.
- J) Cúmulos muy pequeños de células en el T0.

El mejor resultado de fermentación submersa a partir de las esporas de la dilución 1/100000 de *Aspergillus niger* van Tieghem (ATCC® 6275™), considerando la variación de la fuente de nitrógeno y su concentración, fue para la fermentación realizada con fuente de nitrógeno: 2 g L⁻¹ de extracto de levadura, es decir el T1 (Figura 21 A), donde a diferencia del resto de fermentaciones; tuvo el mejor crecimiento y formación de células. La razón para ello se debe a la composición del extracto de levadura, el cual contiene una mayor cantidad de vitaminas y proteínas a diferencia de la peptona y caseína, además de una mejor proporción de péptidos de cadena corta y un mayor rango espectroscópico de aminoácidos (Hakobyana, Gabrielyana y Trchouniana, 2012, pp. 6519–6526; Singh, S, Singh, R, Bali, Sharma y Mangla, 2014).

Como afirman Hakobyana y otros (2012, pp. 6519–6526); la concentración adecuada de la fuente de nitrógeno: 2 g L⁻¹ de extracto de levadura y carbono: 10 g L⁻¹ de almidón de trigo, permiten una mejor hidrólisis de los enlaces α -1,4 glucosídicos en el interior de las cadenas de los polisacáridos, en este caso en el interior de la cadena de amilosa del almidón, y por consiguiente la obtención de moléculas de glucosa de menor tamaño, que son más fácilmente metabolizadas por *Aspergillus niger*, lo que posibilita una correcta germinación conidial en forma celular (formación de hifas que posteriormente se transforman en conidios con esporas encapsuladas). Según Suleimenova, Akhmetsadykov, Kalieva, Mustafin y Saduyeva (2016, pp. 1-6); Colla y otros (2016, pp. 461–467); el extracto de levadura como fuente de nitrógeno, incrementa la cantidad de H₂ que en conjunto con la hidrólisis óptima de los azúcares reductores permite obtener enzimas hidrolíticas de alto rendimiento.

5. Quinta etapa: determinación del efecto de la fuente nitrógeno sobre la producción de biomasa, consumo de sustrato, μ , t_d , $Y_{x/s}$ del blanco y los tratamientos.

Elaboración de la curva de calibrado de la biomasa

La curva de calibrado de la biomasa se aproximó a una regresión lineal entre la absorbancia (600 nm) (eje Y) Vs el peso seco (g L^{-1}) (eje X) por el R^2 de 0,98 obtenido, como se aprecia en la Figura 22.

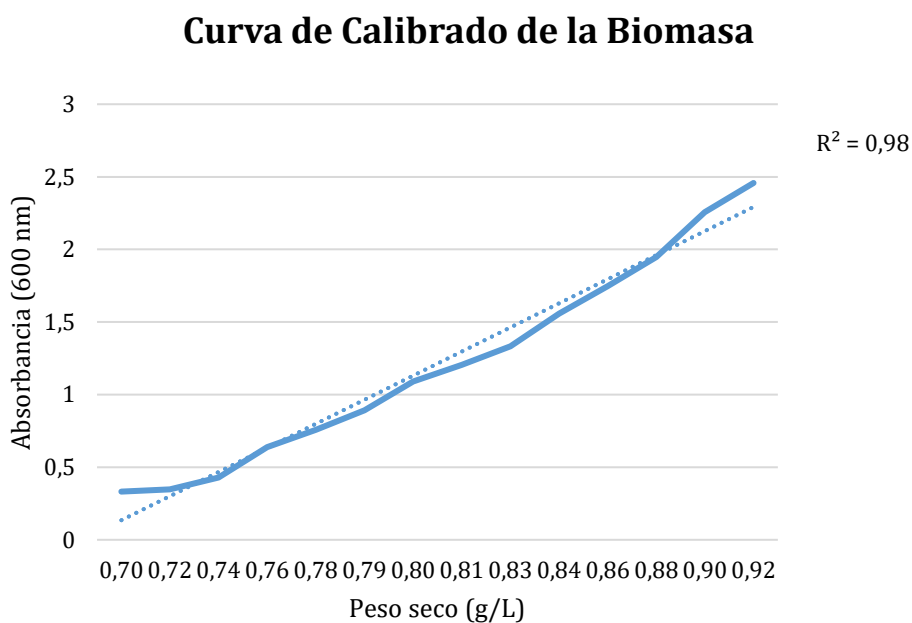


Figura 22. Curva de calibrado de la biomasa de *Aspergillus niger* van Tieghem (ATCC® 6275).

Elaboración de la curva de crecimiento de *Aspergillus niger*

La curva de crecimiento de la *Aspergillus niger* de relación entre la absorbancia de las muestras medidas a 600 nm (eje Y) Vs el tiempo (h) (eje X), permitió establecer la fase exponencial del hongo (máximo crecimiento), de acuerdo con el tiempo de fermentación (7 días), como se puede ver en la Figura 23.

Curva de Crecimiento de *Aspergillus niger*

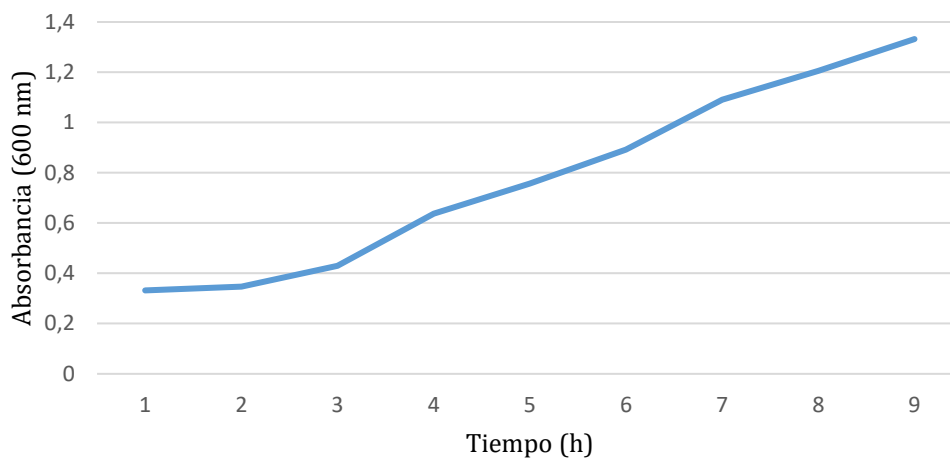


Figura 23. Curva de crecimiento de *Aspergillus niger* van Tieghem (ATCC® 6275).

Elaboración de la curva de calibrado de la glucosa (sustrato)

La curva de calibrado de la glucosa se aproximó a una regresión lineal entre la absorbancia (540 nm) (eje Y) Vs la concentración de la glucosa en la cubeta (g L^{-1}) (eje X) como se verifica por el valor del R^2 obtenido (0,99) (Figura 24).

Curva de Calibrado de la Glucosa

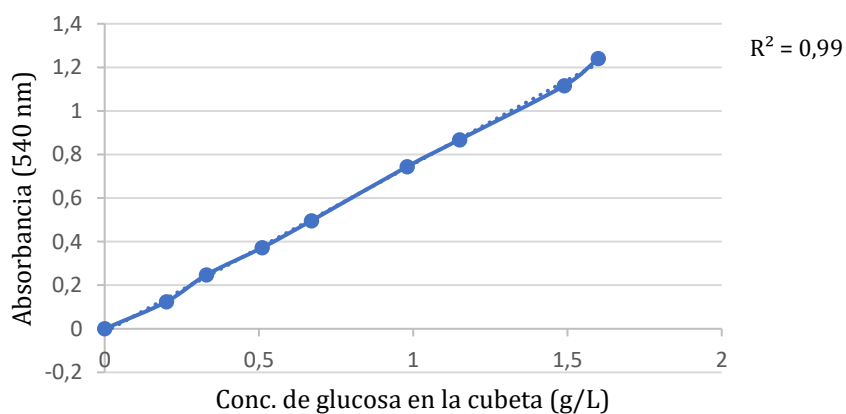


Figura 24. Curva de calibrado de la glucosa de *Aspergillus niger* van Tieghem (ATCC® 6275).

5.1 Fermentación blanco con el T0

Evaluación de la producción de biomasa de la fermentación con el T0

La curva de producción de biomasa en el T0 con un valor de R^2 de 0,94, se aproximó a una tendencia lineal entre la concentración de la biomasa (g L^{-1}) (eje Y) Vs el tiempo (h) (eje X), como se puede ver en la Figura 25.

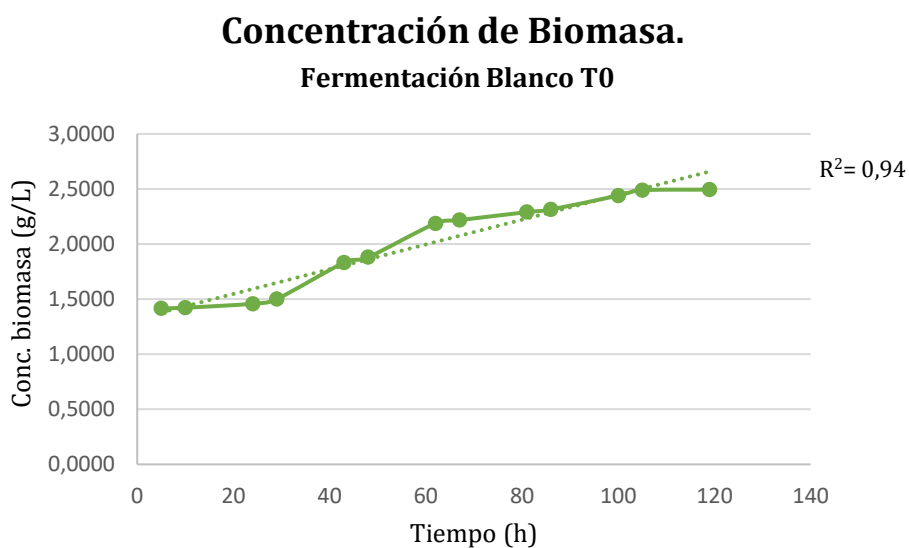


Figura 25. Relación de la concentración de la biomasa (g L^{-1}) Vs el tiempo (h), a partir de la fermentación con el T0.

Evaluación del consumo de sustrato de la fermentación con el T0

La curva de consumo de sustrato de la fermentación blanco se aproximó a una regresión lineal entre la concentración de la glucosa (g L^{-1}) (eje Y) Vs el tiempo (h) (eje X), presentando un valor de R^2 igual a 0,90, como se puede observar en la Figura 26.

Consumo de Sustrato. Fermentación Blanco T0

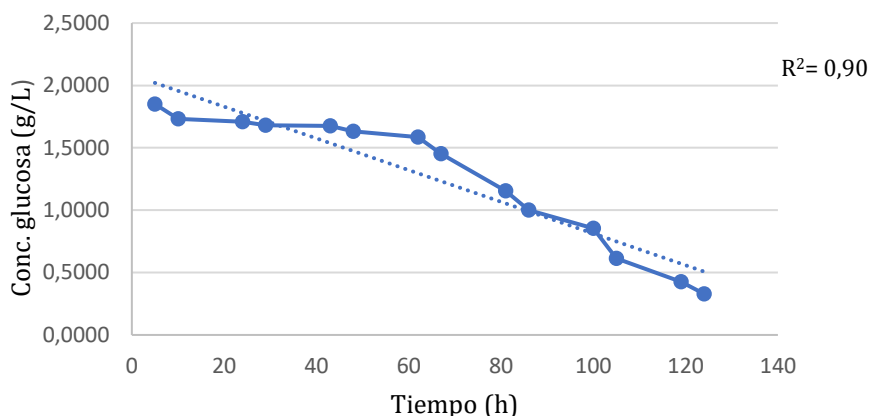


Figura 26. Relación de la concentración de la glucosa (g L^{-1}) Vs el tiempo (h), a partir de la fermentación con el T0.

Existe una relación inversamente proporcional entre la producción de biomasa (crecimiento ascendente) y consumo de sustrato (crecimiento descendente) (g L^{-1}) (eje Y) Vs el tiempo (h) (eje X), a partir de la fermentación con el T0 de *Aspergillus niger*, como se puede ver en la Figura 27.

Concentración de Biomasa Vs consumo de Sustrato. Fermentación Blanco T0

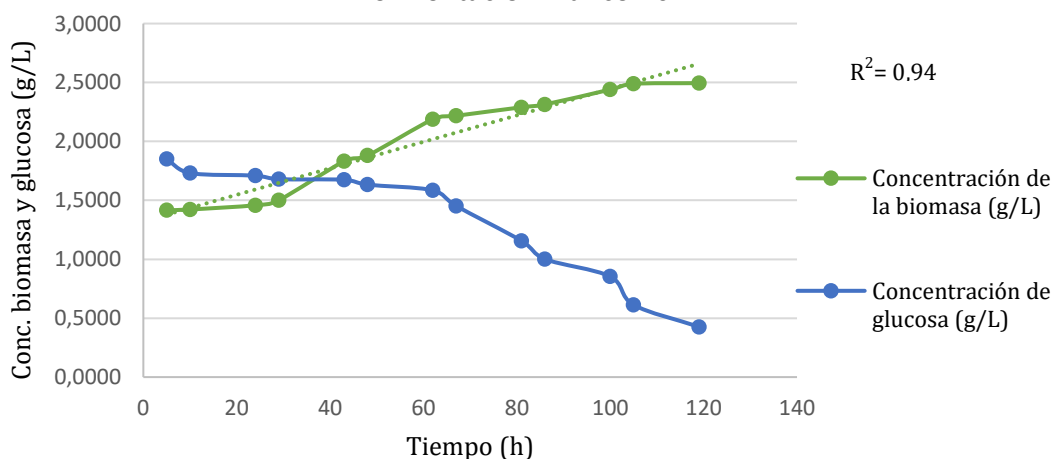


Figura 27. Relación de la concentración de biomasa y glucosa (g L^{-1}) Vs el tiempo (h), a partir de la fermentación con el T0.

5.2 Fermentación con el T1

Evaluación de la producción de biomasa de la fermentación con el T1

La curva de producción de biomasa de la fermentación con el T1 se aproximó a una regresión lineal ($R^2= 0,97$) entre la concentración de la biomasa (g L^{-1}) (eje Y) Vs el tiempo (h) (eje X), como se puede ver en la Figura 28.

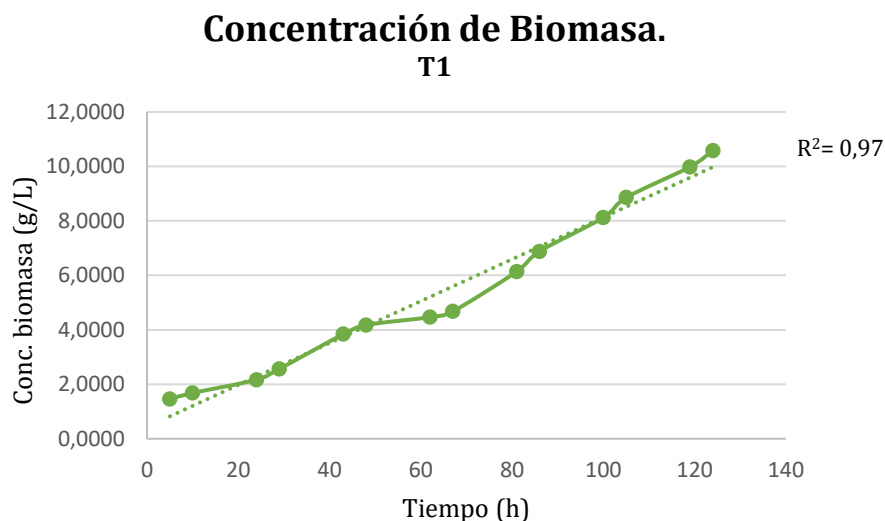


Figura 28. Relación de la concentración de la biomasa (g L^{-1}) Vs el tiempo (h), a partir de la fermentación con el T1.

Evaluación del consumo de sustrato de la fermentación con el T1

La curva de consumo de sustrato de la fermentación con el T1 se aproximó a una tendencia lineal entre la concentración de la glucosa (g L^{-1}) (eje Y) Vs el tiempo (h) (eje X), corroborado con el valor de R^2 (0,89) próximo a 1 (Figura 29).

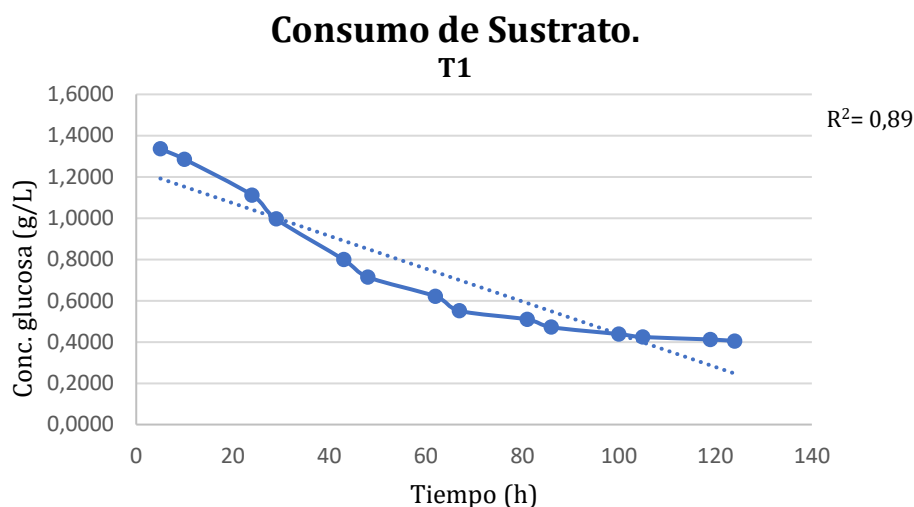
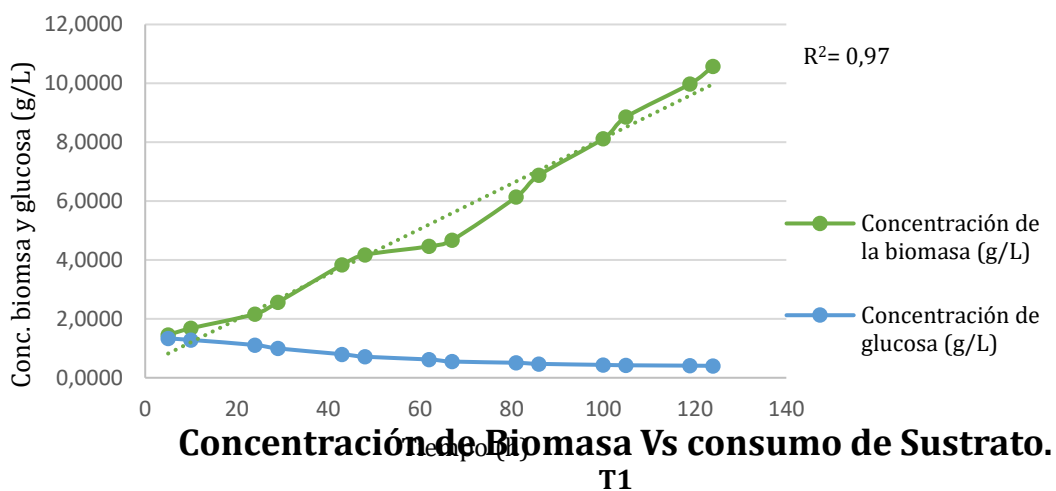


Figura 29. Relación de la concentración de la glucosa (g L^{-1}) Vs el tiempo (h), a partir de la fermentación con el T1.

Existe una relación inversamente proporcional entre la producción de biomasa (crecimiento ascendente) y consumo de sustrato (crecimiento descendente) (g L^{-1}) (eje Y) Vs el tiempo (h) (eje X), a partir de la fermentación con el T1 de *Aspergillus niger*, como se puede observar en la Figura 30.



Concentración de Biomasa Vs consumo de Sustrato.
T1

Figura 30. Relación de la concentración de biomasa y glucosa (g L^{-1}) Vs el tiempo (h), a partir de la fermentación con el T1.

5.3 Fermentación con el T2

Evaluación de la producción de biomasa de la fermentación con el T2

La curva de generación de biomasa en el T2 se aproximó a una tendencia lineal entre la concentración de la biomasa (g L^{-1}) (eje Y) Vs el tiempo (h) (eje X), lo cual se verificó a través del valor de R^2 (0,95), como se puede ver en la Figura 31.

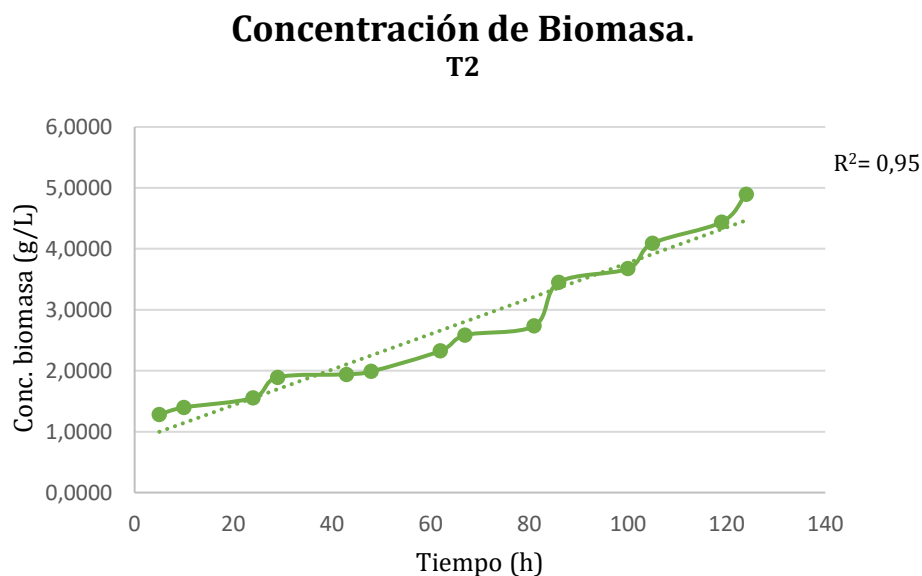


Figura 31. Relación de la concentración de la biomasa (g L^{-1}) Vs el tiempo (h), a partir de la fermentación con el T2.

Evaluación del consumo de sustrato de la fermentación con el T2

La curva de consumo de sustrato en el T2 se orientó hacia a una tendencia lineal entre la concentración de la glucosa (g L^{-1}) (eje Y) Vs el tiempo (h) (eje X) con un valor de R^2 de 0,88, como se puede apreciar en la Figura 32.

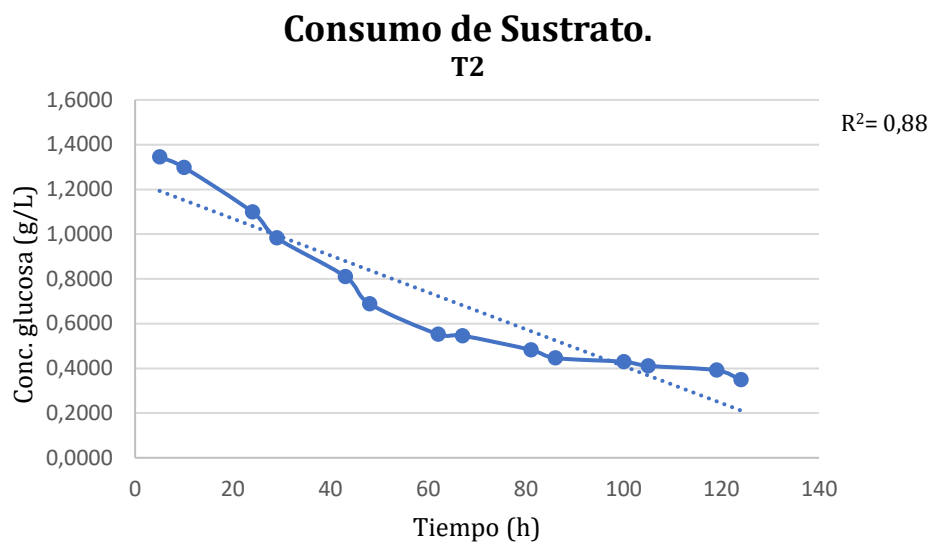


Figura 32. Relación de la concentración de la glucosa (g L^{-1}) Vs el tiempo (h), a partir de la fermentación con el T2.

Se produce una relación inversamente proporcional entre la generación de biomasa (crecimiento ascendente) y consumo de sustrato (crecimiento descendente) (g L^{-1}) (eje Y) Vs el tiempo (h) (eje X), a partir de la fermentación en el T2 de *Aspergillus niger*, como se puede verificar en la Figura 33.

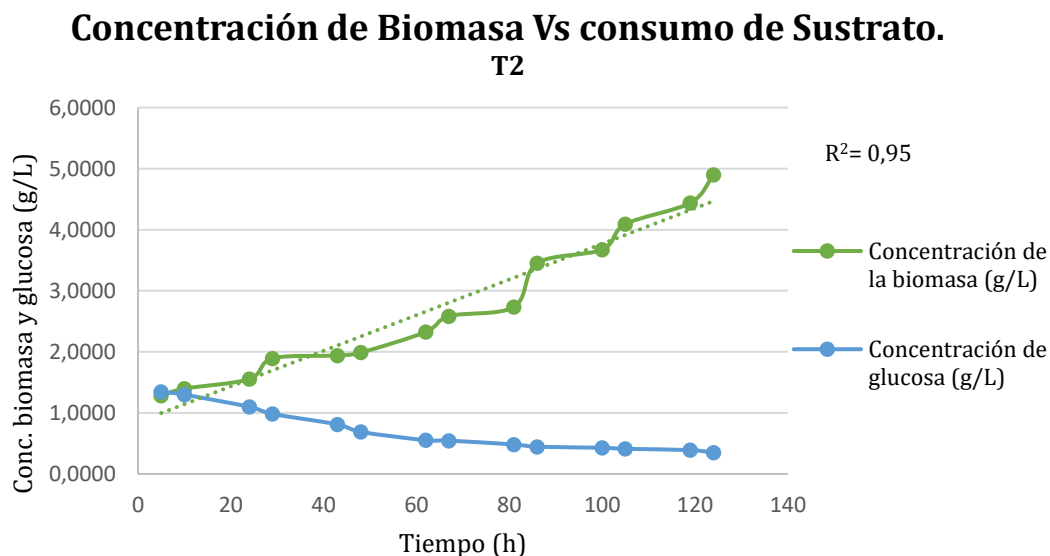


Figura 33. Relación de la concentración de biomasa y glucosa (g L^{-1}) Vs el tiempo (h), a partir de la fermentación con el T2.

5.4 Fermentación con el T3

Evaluación de la producción de biomasa de la fermentación con el T3

La curva de producción de biomasa en la fermentación con el T3 se acercó a una tendencia lineal entre la concentración de la biomasa (g L^{-1}) (eje Y) Vs el tiempo (h) (eje X), observado a través del valor de R^2 obtenido (0,93). (Figura 34).

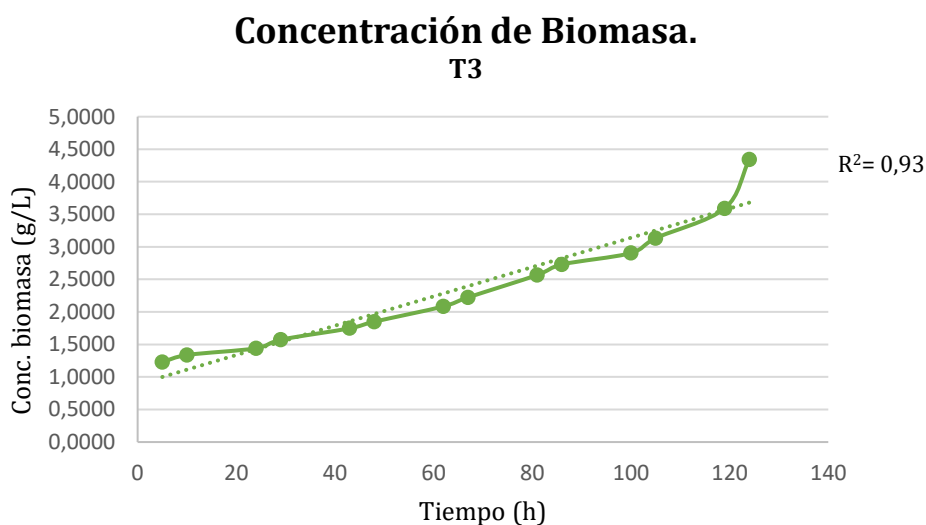


Figura 34. Relación de la concentración de la biomasa (g L^{-1}) Vs el tiempo (h), a partir de la fermentación con el T3.

Evaluación del consumo de sustrato de la fermentación con el T3

La curva de consumo de sustrato en el T3 se aproximó a una regresión lineal entre la concentración de la glucosa (g L^{-1}) (eje Y) Vs el tiempo (h) (eje X), presentando un valor de R^2 próximo a 1 (0,98). (Figura 35).

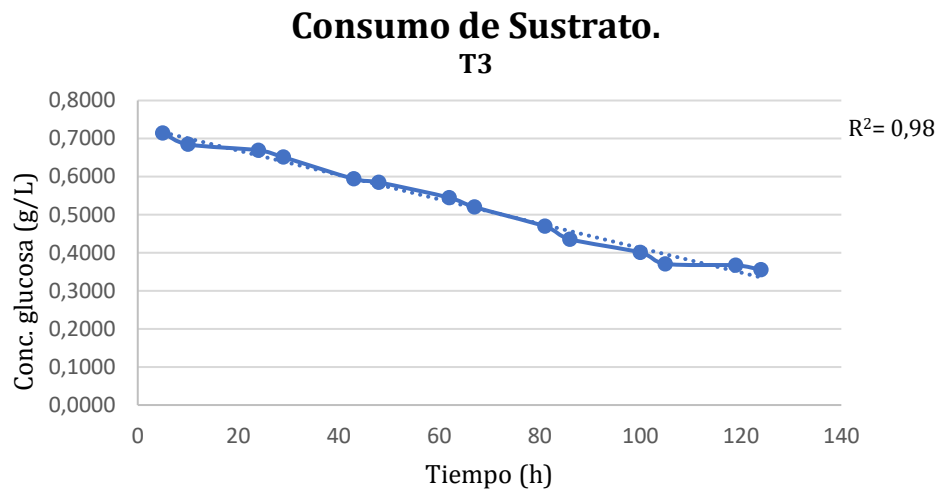


Figura 35. Relación de la concentración de la glucosa (g L^{-1}) Vs el tiempo (h), a partir de la fermentación con el T3

Se puede verificar que existe relación inversamente proporcional entre la generación de biomasa (crecimiento ascendente) y consumo de sustrato (crecimiento descendente) (g L^{-1}) (eje Y) Vs el tiempo (h) (eje X), en el T3 de *Aspergillus niger*, como se puede ver en la Figura 36.

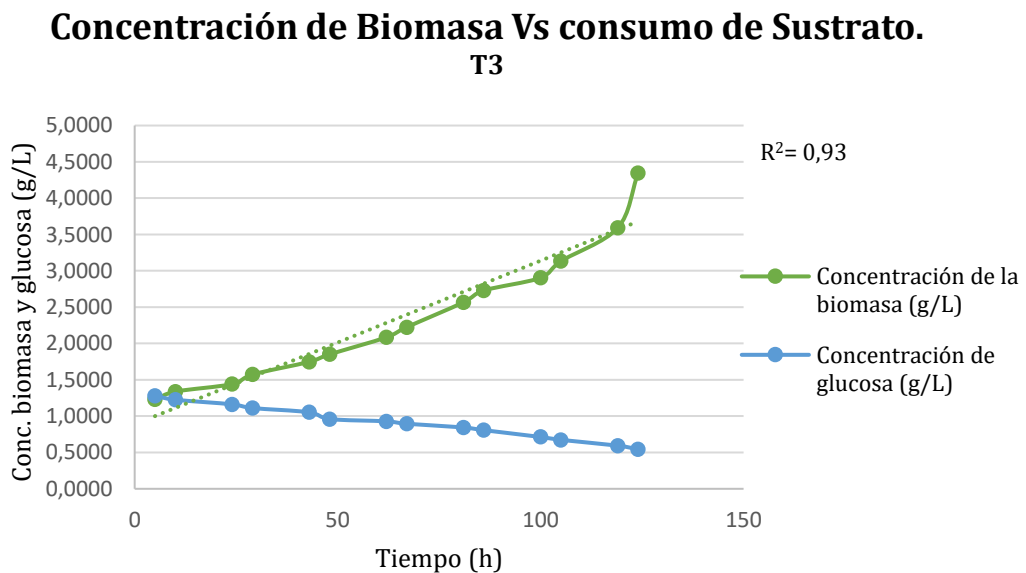


Figura 36. Relación de la concentración de biomasa y glucosa (g L^{-1}) Vs el tiempo (h), a partir de la fermentación con el T3.

5.5 Fermentación con el T4

Evaluación de la producción de biomasa de la fermentación con el T4

La curva de generación de biomasa de la fermentación con el T4 se acercó a una tendencia lineal entre la concentración de la biomasa (g L^{-1}) (eje Y) Vs el tiempo (h) (eje X), dando lugar a un valor de R^2 de 0,94, como se puede ver en la Figura 37.

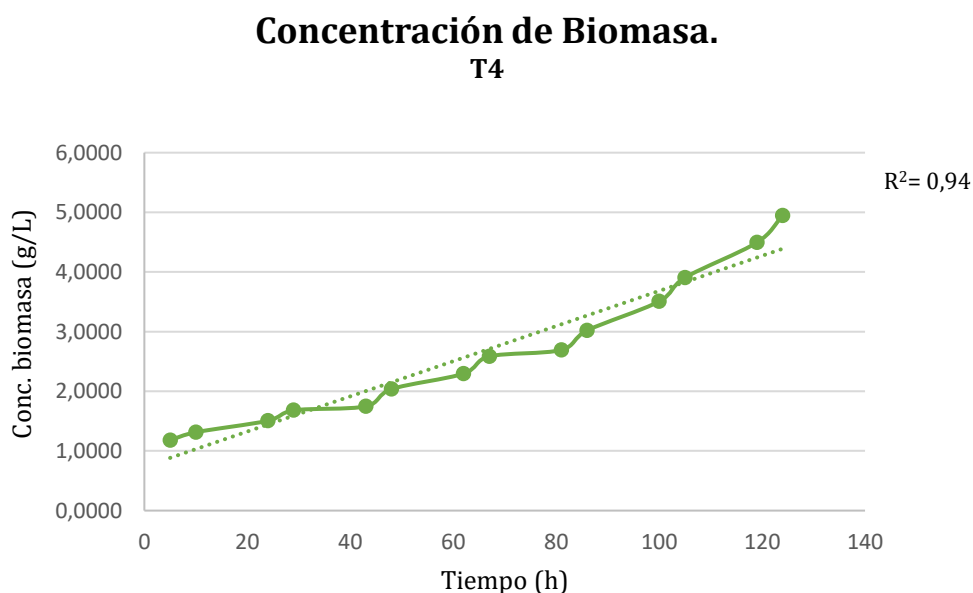


Figura 37. Relación de la concentración de la biomasa (g L^{-1}) Vs el tiempo (h), a partir de la fermentación con el T4.

Evaluación del consumo de sustrato de la fermentación con el T4

La curva de consumo de sustrato de la fermentación con el T4 presentó una tendencia hacia una regresión lineal entre la concentración de la glucosa (g L^{-1}) (eje Y) Vs el tiempo (h) (eje X), generando un valor de R^2 de 0,99, tal como se observa en la Figura 38.

Consumo de Sustrato. T4

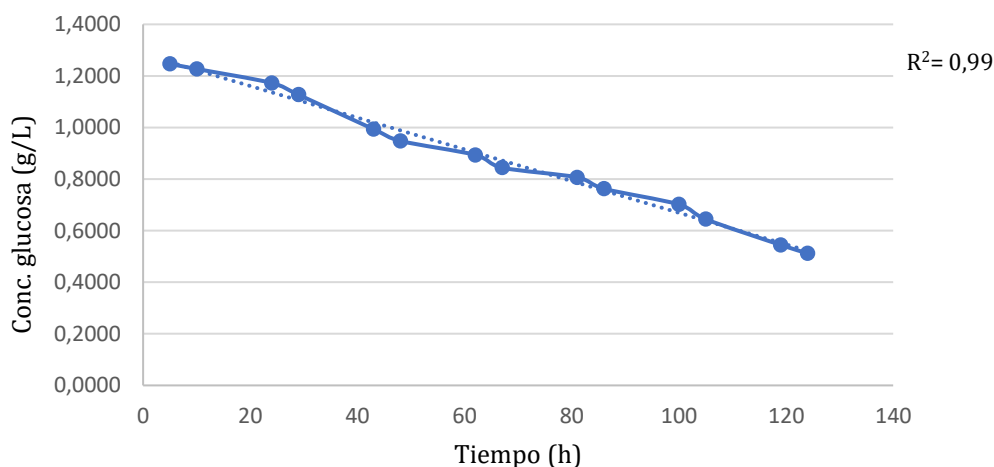


Figura 38. Relación de la concentración de la glucosa (g L^{-1}) Vs el tiempo (h), a partir de la fermentación con el T4.

Se produce una relación inversamente proporcional entre la generación de biomasa (crecimiento ascendente) y consumo de sustrato (crecimiento descendente) (g L^{-1}) (eje Y) Vs el tiempo (h) (eje X), a partir de la fermentación con el T4 de *Aspergillus niger*, como se puede apreciar en la Figura 39.

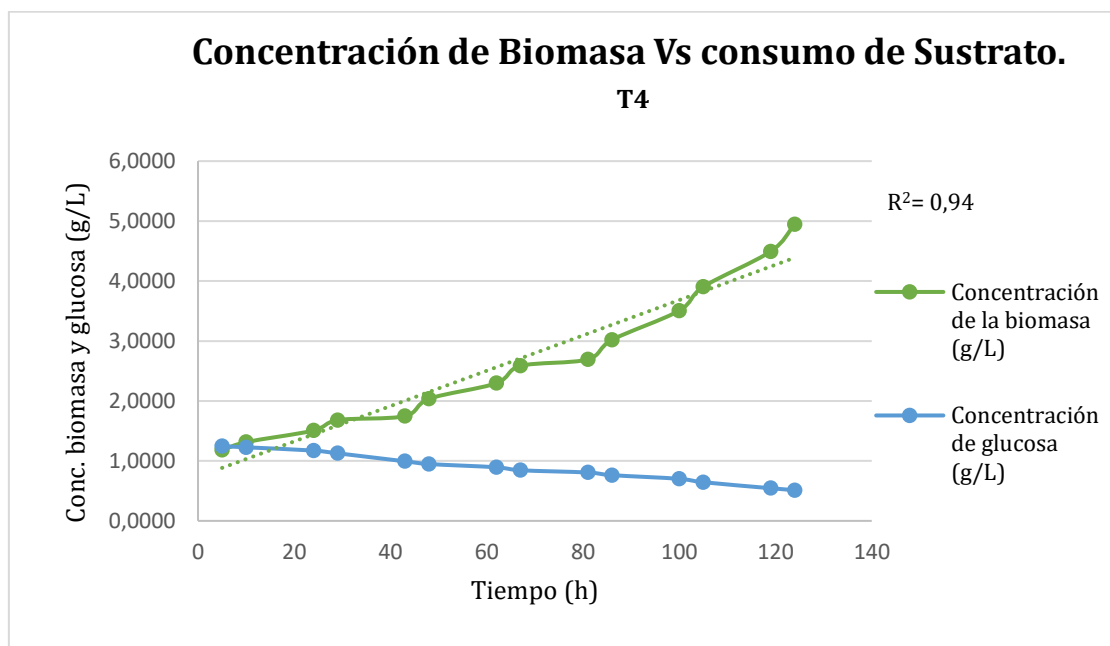


Figura 39. Relación de la concentración de biomasa y glucosa (g L^{-1}) Vs el tiempo (h), a partir de la fermentación con el T4.

5.6 Fermentación con el T5

Evaluación de la producción de la biomasa de la fermentación con el T5

La curva de producción de biomasa de la fermentación con el T5 se aproximó a una regresión lineal entre la concentración de la biomasa (g L^{-1}) (eje Y) Vs el tiempo (h) (eje X), a través de un valor de R^2 de 0,93 (Figura 40).

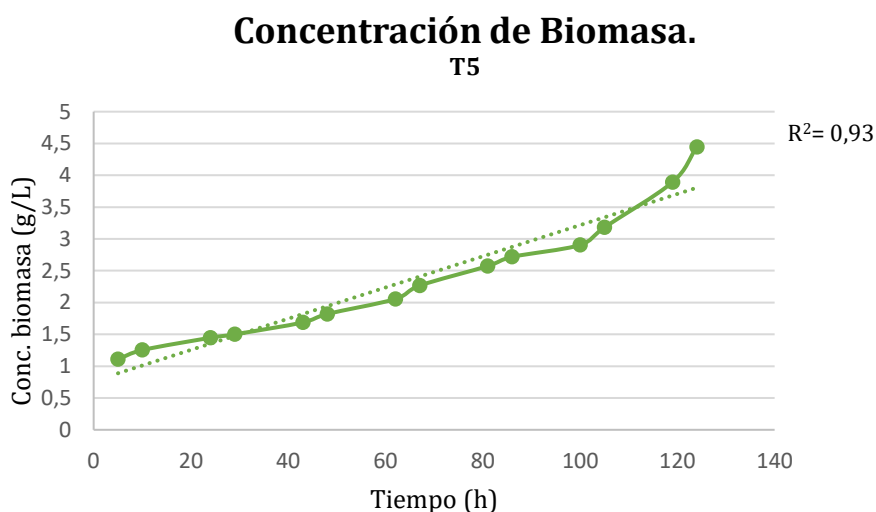


Figura 40. Relación de la concentración de la biomasa (g L^{-1}) Vs el tiempo (h), a partir de la fermentación con el T5.

Evaluación del consumo del sustrato de la fermentación con el T5

La curva de consumo de sustrato de la fermentación con el T5 se aproximó a una tendencia lineal entre la concentración de la glucosa (g L^{-1}) (eje Y) Vs el tiempo (h) (eje X), presentando un valor de R^2 de 0,97, como se puede ver en la Figura 41.

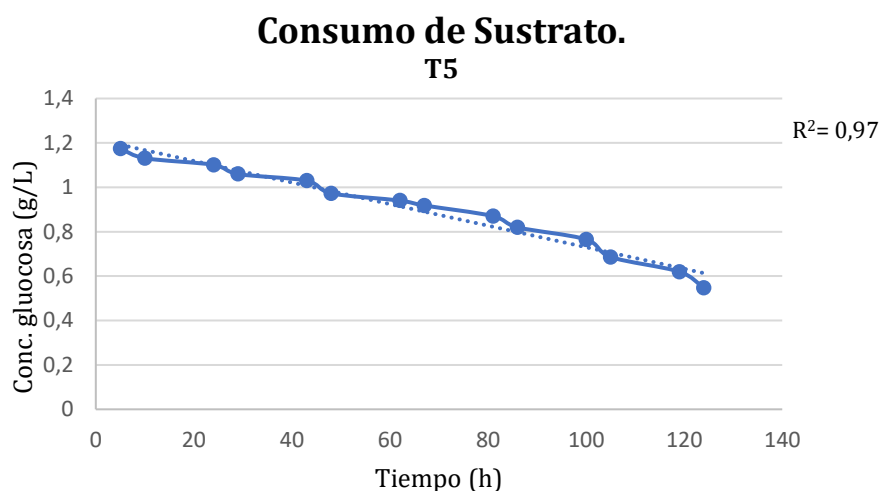


Figura 41. Relación de la concentración de la glucosa (g L^{-1}) Vs el tiempo (h), a partir de la fermentación con el T5.

Existe una relación inversamente proporcional entre la generación de biomasa (crecimiento ascendente) y consumo de sustrato (crecimiento descendente) (g L^{-1}) (eje Y) Vs el tiempo (h) (eje X), a partir de la fermentación con el T5 de *Aspergillus niger*, como se puede observar en la Figura 42.

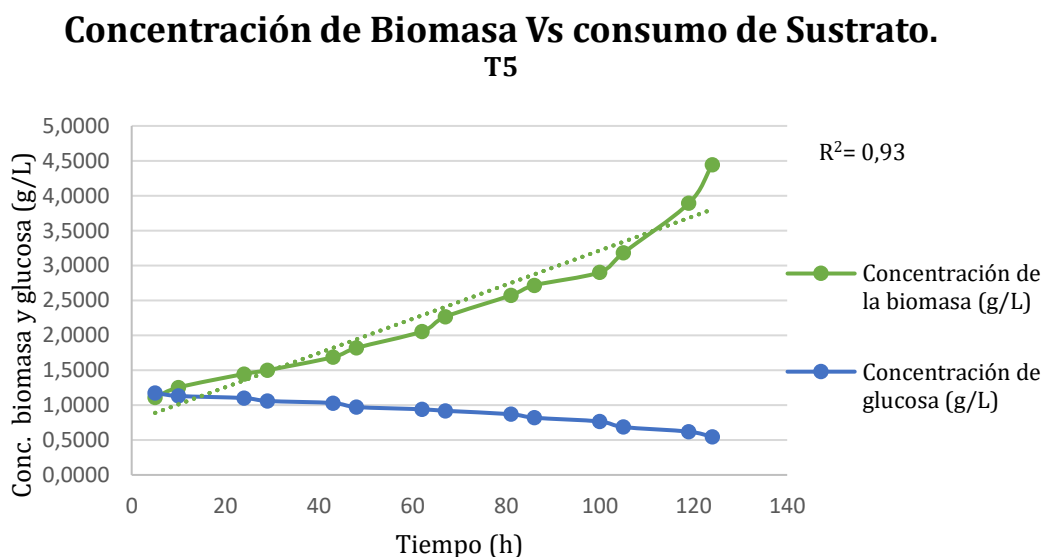


Figura 42. Relación de la concentración de biomasa y glucosa (g L^{-1}) Vs el tiempo (h), a partir de la fermentación con el T5.

5.7 Fermentación con el T6

Evaluación de la producción de biomasa de la fermentación con el T6

La curva de concentración de biomasa de la fermentación con el T6 se verificó que tiene una aproximación a una regresión lineal entre la concentración de la biomasa (g L^{-1}) (eje Y) Vs el tiempo (h) (eje X), presentando un valor de R^2 de 0,93, como se puede apreciar en la Figura 43.

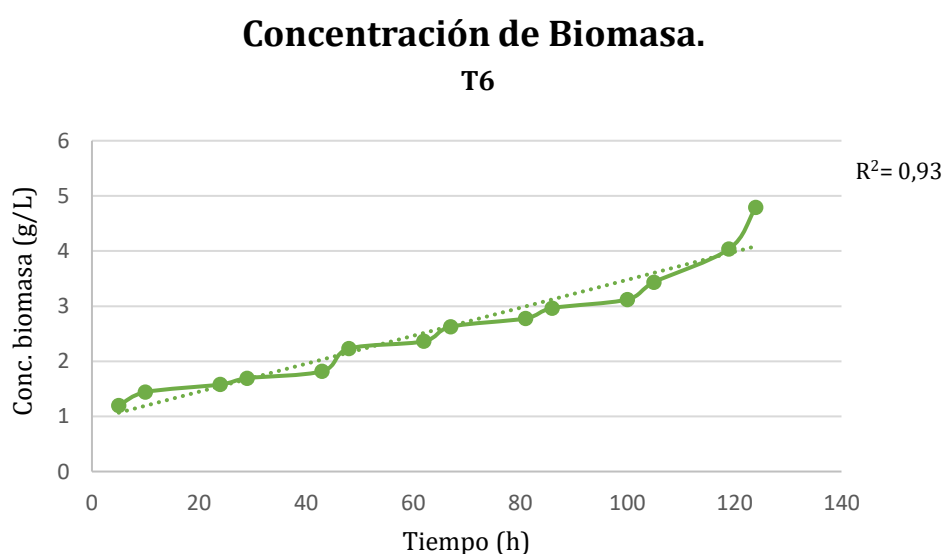


Figura 43. Relación de la concentración de la biomasa (g L^{-1}) Vs el tiempo (h), a partir de la fermentación con el T6.

Evaluación del consumo de sustrato de la fermentación con el T6

Mientras tanto, la curva de consumo de sustrato de la fermentación con el T6 se observó que tiene una aproximación a una regresión lineal entre las variables: concentración de la glucosa (g L^{-1}) (eje Y) Vs el tiempo (h) (eje X), presentando un valor de R^2 de 0,98, como se puede observar en la Figura 44.

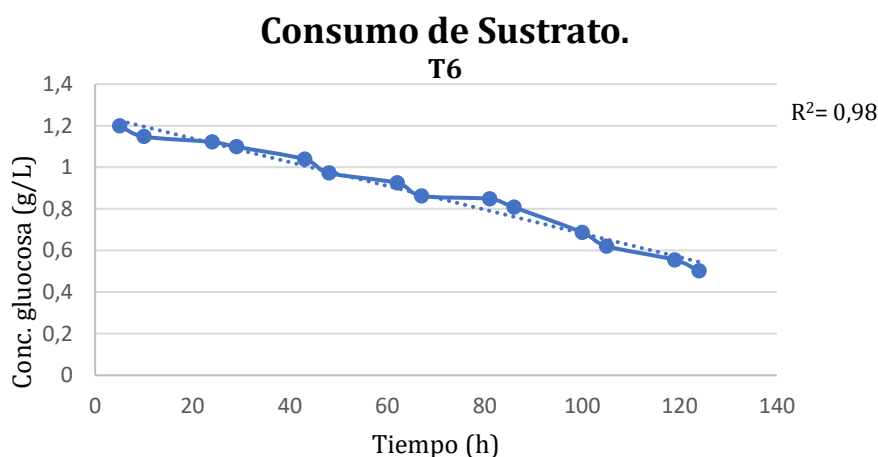


Figura 44. Relación de la concentración de la glucosa (g L^{-1}) Vs el tiempo (h), a partir de la fermentación con el T6.

Se aprecia que existe una relación inversamente proporcional entre la concentración de biomasa (crecimiento ascendente) y consumo de sustrato (crecimiento descendente) (g L^{-1}) (eje Y) Vs el tiempo (h) (eje X), a partir de la fermentación con el T6 de *Aspergillus niger* (Figura 45).

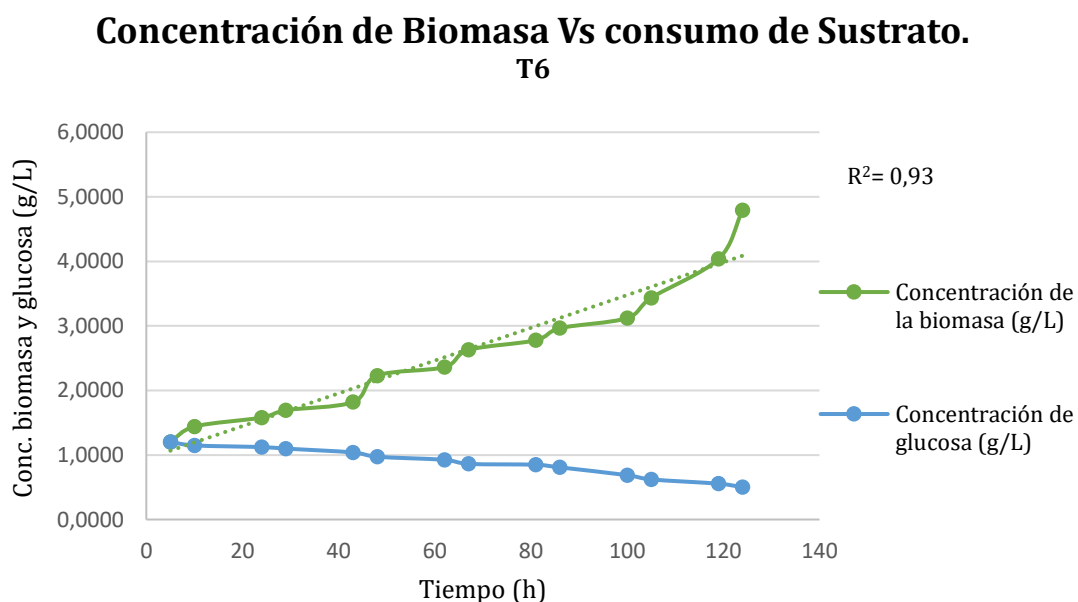


Figura 45. Relación de la concentración de biomasa y glucosa (g L^{-1}) Vs el tiempo (h), a partir de la fermentación con el T6.

5.8 Fermentación con el T7

Evaluación de la producción de biomasa de la fermentación con el T7

La curva de generación de biomasa de la fermentación con el T7 se aproximó a una regresión lineal entre la concentración de la biomasa (g L^{-1}) (eje Y) Vs el tiempo (h) (eje X), a través de un valor de R^2 de 0,93, como se puede observar en la Figura 46.

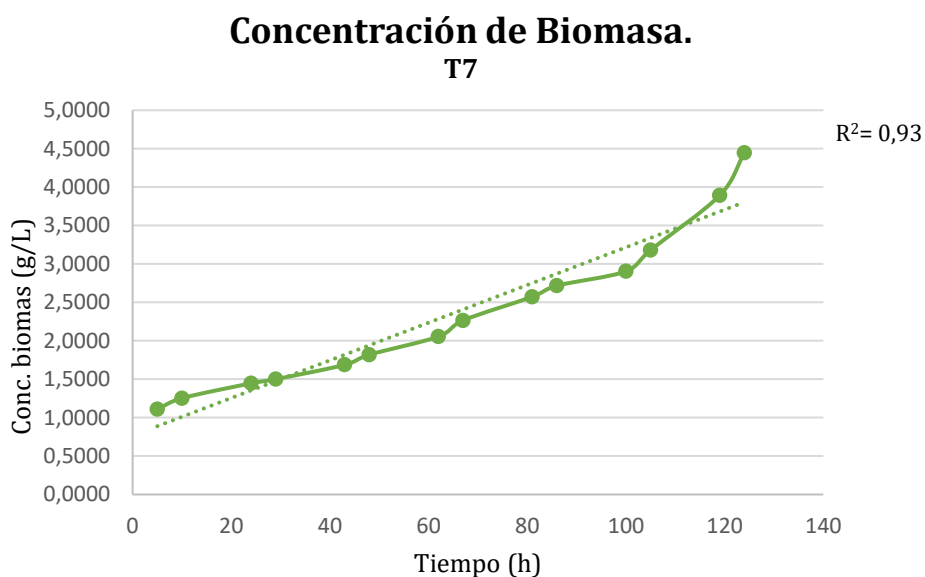


Figura 46. Relación de la concentración de la biomasa (g L^{-1}) Vs el tiempo (h), a partir de la fermentación con el T7.

Evaluación del consumo de sustrato de la fermentación con el T7

En la curva de consumo de sustrato de la fermentación con el T7 se obtuvo un R^2 de 0,97 lo que permite verificar la aproximación a una regresión lineal entre las variables concentración de la glucosa (g L^{-1}) (eje Y) Vs el tiempo (h) (eje X) (Figura 47).

Consumo de Sustrato. T7

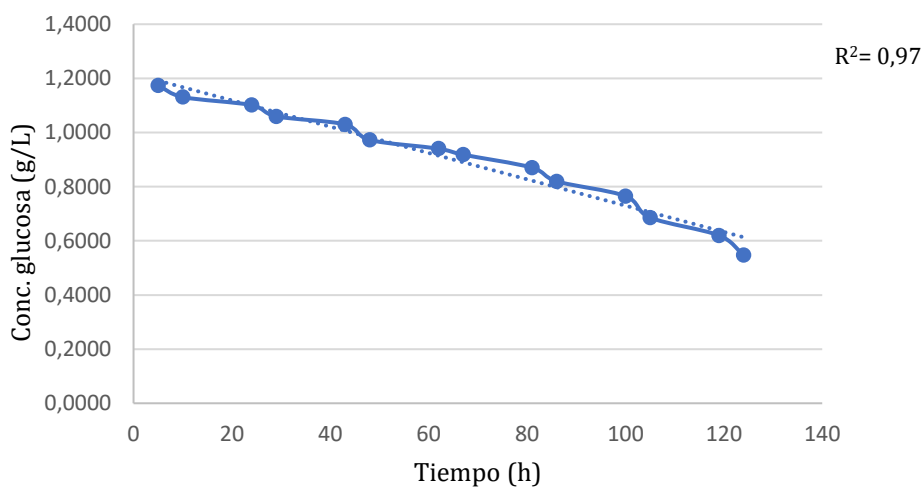


Figura 47. Relación de la concentración de la glucosa (g L^{-1}) Vs el tiempo (h), a partir de la fermentación con el T7.

Se produce una relación inversamente proporcional entre la producción de biomasa (crecimiento ascendente) y consumo de sustrato (crecimiento descendente) (g L^{-1}) (eje Y) Vs el tiempo (h) (eje X), a partir de la fermentación con el T7 de *Aspergillus niger*, como se puede observar en la Figura 48.

Concentración de Biomasa Vs Consumo de Sustrato. T7

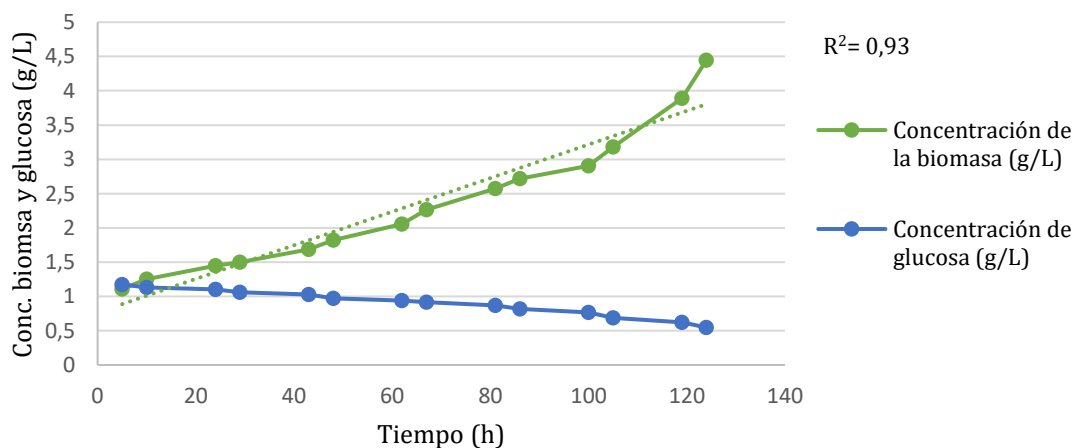


Figura 48. Relación de la concentración de biomasa y glucosa (g L^{-1}) Vs el tiempo (h), a partir de la fermentación con el T7.

5.9 Fermentación con el T8

Evaluación de la producción de biomasa de la fermentación con el T8

La curva de producción de biomasa de la fermentación con el T8 posee una tendencia lineal ($R^2= 0,93$) entre las variables: concentración de la biomasa (g L^{-1}) (eje Y) Vs el tiempo (h) (eje X) (Figura 49).

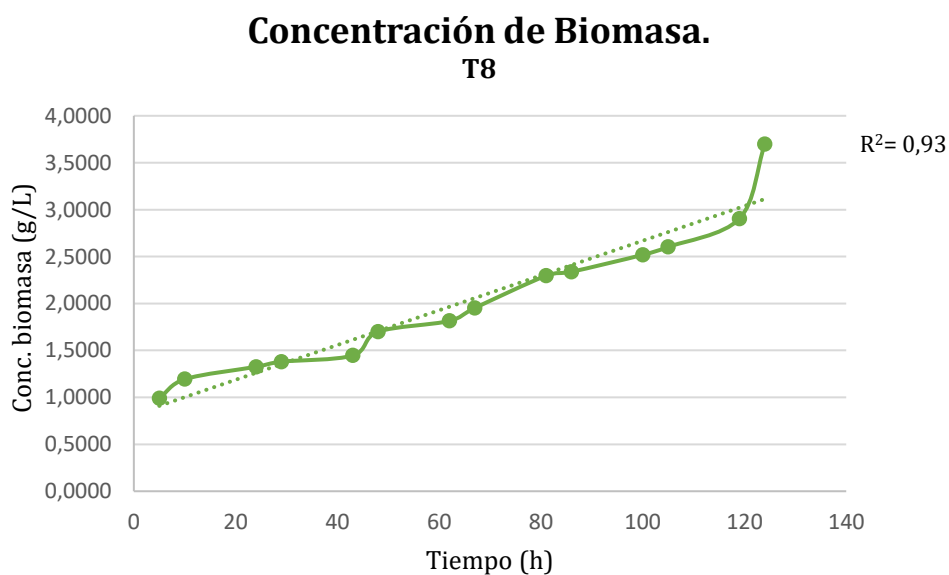


Figura 49. Relación de la concentración de la biomasa (g L^{-1}) Vs el tiempo (h), a partir de la fermentación con el T8.

Evaluación del consumo de sustrato de la fermentación con el T8

Se puede observar que la curva de consumo de sustrato de la fermentación con el T8 se aproximó a una tendencia lineal entre la concentración de la glucosa (g L^{-1}) (eje Y) Vs el tiempo (h) (eje X), presentando un valor R^2 de 0,99, como se puede ver en la Figura 50.

Consumo de Sustrato. T8

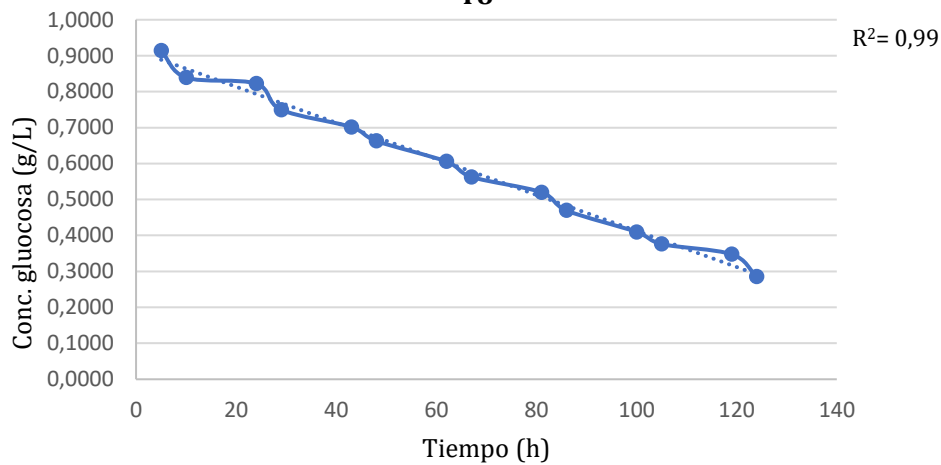


Figura 50. Relación de la concentración de la glucosa (g L^{-1}) Vs el tiempo (h), a partir de la fermentación con el T8.

Existe una relación inversamente proporcional entre la producción de biomasa (crecimiento ascendente) y consumo de sustrato (crecimiento descendente) (g L^{-1}) (eje Y) Vs el tiempo (h) (eje X), a partir de la fermentación con el T8 de *Aspergillus niger*, como se puede apreciar en la Figura 51.

Concentración de Biomasa Vs consumo de Sustrato. T8

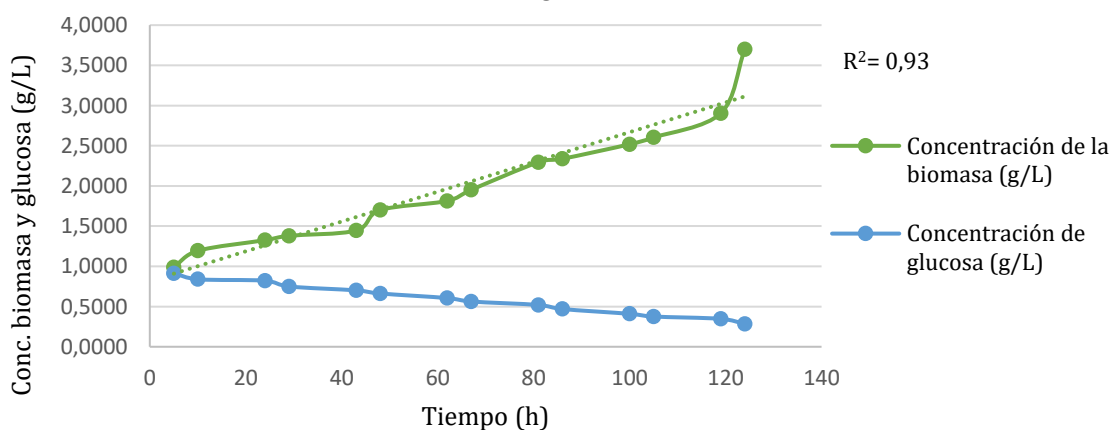


Figura 51. Relación de la concentración de biomasa y glucosa (g L^{-1}) Vs el tiempo (h), a partir de la fermentación con el T8.

5.10 Fermentación con el T9

Evaluación de la producción de biomasa de la fermentación con el T9

La curva de concentración de biomasa de la fermentación con el T9 se acercó a una tendencia lineal entre la concentración de la biomasa (g L^{-1}) (eje Y) Vs el tiempo (h) (eje X), verificado a través de un valor de R^2 de 0,92 (Figura 52).

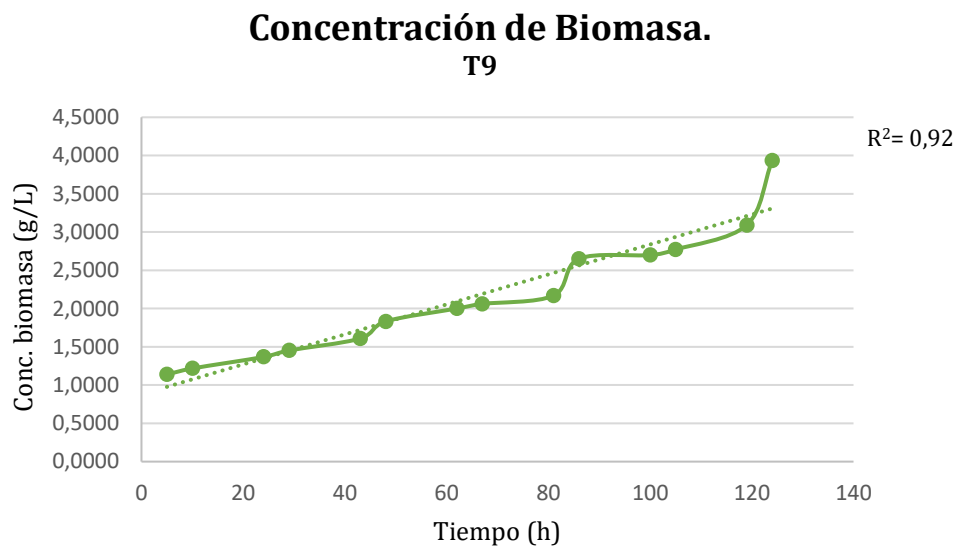


Figura 52. Relación de la concentración de la biomasa (g L^{-1}) Vs el tiempo (h), a partir de la fermentación con el T9.

Evaluación del consumo de sustrato de la fermentación con el T9

La curva de consumo de sustrato de la fermentación con el T9 posee una tendencia hacia una regresión lineal entre la concentración de la glucosa (g L^{-1}) (eje Y) Vs el tiempo (h) (eje X), generando un valor de R^2 de 0,99, como se puede ver en la Figura 53.

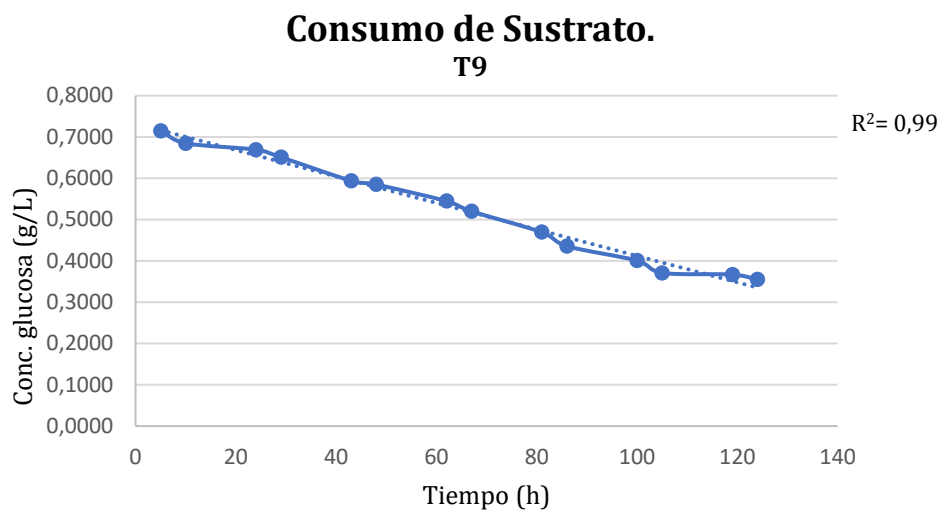


Figura 53. Relación de la concentración de la glucosa (g L^{-1}) Vs el tiempo (h), a partir de la fermentación con el T9.

Existe una relación inversamente proporcional entre la concentración de biomasa (crecimiento ascendente) y consumo de sustrato (crecimiento descendente) (g L^{-1}) (eje Y) Vs el tiempo (h) (eje X), a partir de la fermentación con el T9 de *Aspergillus niger*, como se puede observar en la Figura 54.

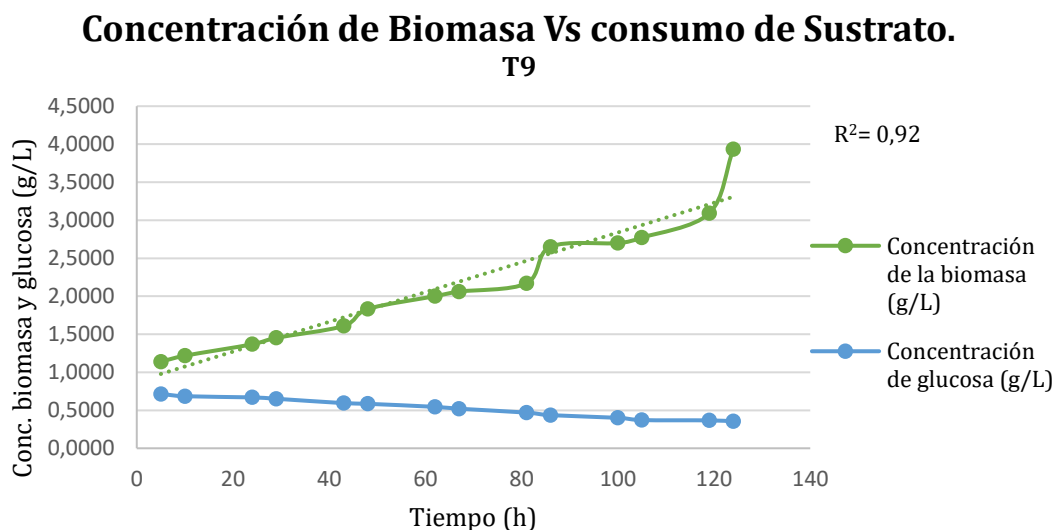


Figura 54. Relación de la concentración de biomasa y glucosa (g L^{-1}) Vs el tiempo (h), a partir de la fermentación con el T9.

Como se puede observar en la Tabla 17, los mejores resultados en producción de biomasa en cuanto a promedio (\bar{x}) y desviación estándar (S) correspondieron a la fermentación con el T1 de *Aspergillus niger* van Tieghem (ATCC® 6275), por lo que se consideraría al mismo como el mejor tratamiento para la variable antes mencionada.

Tabla 17.

Diseño factorial 3x3 de los resultados obtenidos de \bar{X} y S al medir la biomasa en los distintos tratamientos.

Diseño Factorial 3x3			Resultados (g L ⁻¹)	
Tratamiento	Fuente de N	Conc. (g L ⁻¹)	\bar{x}	S
T0	Blanco	0	3,85	0,005
T1	Extracto de levadura	2	10,57	5,77E-05
T2	Peptona	2	4,89	5,77E-05
T3	Caseína	2	4,34	5,77E-05
T4	Extracto de levadura	1	4,94	5,77E-05
T5	Peptona	1	4,44	5,77E-05
T6	Caseína	1	4,78	5,77E-05
T7	Extracto de levadura	0,5	4,44	5,77E-05
T8	Peptona	0,5	3,69	5,77E-05
T9	Caseína	0,5	3,93	5,77E-05

El T1 como mejor tratamiento se debe a dos razones: primero a las condiciones físico-químicas como son: la velocidad de agitación (160 rpm) y el pH (6,5), que promueven una mayor oxigenación, optimizando el consumo de la fuente de carbono (almidón de trigo) y produciendo una mayor cantidad de biomasa en menor tiempo (Mrudula y Murugammal, 2011, pp. 1119–1127). La segunda y más importante razón es la composición del extracto de levadura, que a diferencia de las demás fuentes de nitrógeno tiene un mayor nivel de nutrientes, aminoácidos y vitaminas especialmente complejo B, que optimizan el desarrollo de las células. Esta fuente de nitrógeno, además, actúa “como una

co-enzima de la vía metabólica aeróbica de *Aspergillus niger* para la formación de esqueletos de carbono que a su vez incrementan la biosíntesis de las vitaminas especialmente el complejo B” (Colla et al., 2016, pp. 461–467; Cunhaa, Esperançaa, Zangirolamia, Badinoa y Farinasb, 2012, pp. 461–467).

Al realizar el ANOVA (Tabla 18), se obtuvo un valor de estadístico F de 3634874,88 que al compararlo con el valor crítico (2,39) es mayor, por lo que se puede concluir que existen diferencias significativas entre las concentraciones de biomasa en los diferentes tratamientos incluyendo el blanco.

Tabla 18.

ANOVA de la concentración de biomasa en los distintos tratamientos más el blanco.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>de Grados libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad para F</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	109,14	9	12,13	3634874,88	3,99E-60	2,39
Dentro de los grupos	6,67E-05	20	3,34E-06			
Total	109,14	29				

Después de realizar una prueba de Tukey se puede observar que el T1 es diferente a los restantes tratamientos.

Información agrupada utilizando el método de Tukey

N	Agrupación	
T0	10	B
T1	10	A
T2	10	B
T3	10	B
T4	10	B
T5	10	B
T6	10	B
T7	10	B
T8	10	B
T9	10	B

Los parámetros cinéticos: $\mu = 0,0113 \text{ h}^{-1}$, $td = 61,23 \text{ h}^{-1}$ (considerando la fase exponencial) y $Y_{x/s} = 9,79 \text{ g células/ g sustrato}$ también fueron los mejores para la fermentación con el T1 con respecto a la concentración de biomasa (Tabla 19). Esto se debe principalmente a la elevada cantidad de vitaminas (complejo B) y nutrientes que tiene este estrato, que en concentraciones apropiadas aumentan la velocidad de crecimiento, disminuyen el tiempo de duplicación y potencian el rendimiento celular, optimizando el consumo de sustrato para una mayor producción de biomasa (UNQ, 2015, p.2; Rodríguez, D, Rodríguez, J, Carvalho, Sturma y Soccola, 2011, pp. 10657–10662; Colla et al., 2016, pp. 461–467). Según Castro, Pereira, Fernández, Guimaraes y Reis (2011, pp. 2-5); la velocidad específica de crecimiento para hongos como *Aspergillus niger* va desde $0,0101$ hasta $0,1213 \text{ h}^{-1}$, valores que se relacionan con la μ obtenida en el T1 de la presente investigación. Bai y otros (2013, pp. 528-540); obtuvieron un valor de rendimiento celular en algunas cepas de *Aspergillus* de $7,25 \text{ g células/ g sustrato}$, resultado que se aproxima al obtenido en el presente estudio.

Tabla 19.

Diseño factorial 3x3 de los resultados obtenidos de: μ , td , y $Y_{x/s}$ al medir la biomasa de los distintos tratamientos.

Diseño Factorial 3x3					
Tratamiento	Fuente de Nitrógeno	Conc. N (g L⁻¹)	μ (h⁻¹)	td (h⁻¹)	$Y_{x/s}$ (g cel/ g sust)
T0	Blanco	0	0,08	7,99	1,6
T1	Extracto de levadura	2	0,01	61,23	9,79
T2	Peptona	2	0,01	75,30	3,63
T3	Caseína	2	0,01	40,30	4,25
T4	Extracto de levadura	1	0,01	53,54	5,13
T5	Peptona	1	0,01	39,34	5,33
T6	Caseína	1	0,01	54,90	5,14
T7	Extracto de levadura	0,5	0,01	57,94	5,33
T8	Peptona	0,5	0,01	62,47	4,31
T9	Caseína	0,5	0,01	66,73	4,78

6. Sexta etapa: determinación de la actividad enzimática de las fermentaciones por espectrofotometría UV-VIS utilizando DNS y evaluación del efecto del activador CaCl_2 sobre la actividad enzimática de la mejor fermentación

6.1 Fermentación blanco T0

La curva de actividad enzimática de la fermentación blanco T0, se aproximó a una regresión lineal entre la concentración de la glucosa (g L⁻¹) (eje Y) Vs el tiempo (min) (eje X), obteniendo un R² de 0,78 (Figura 55).

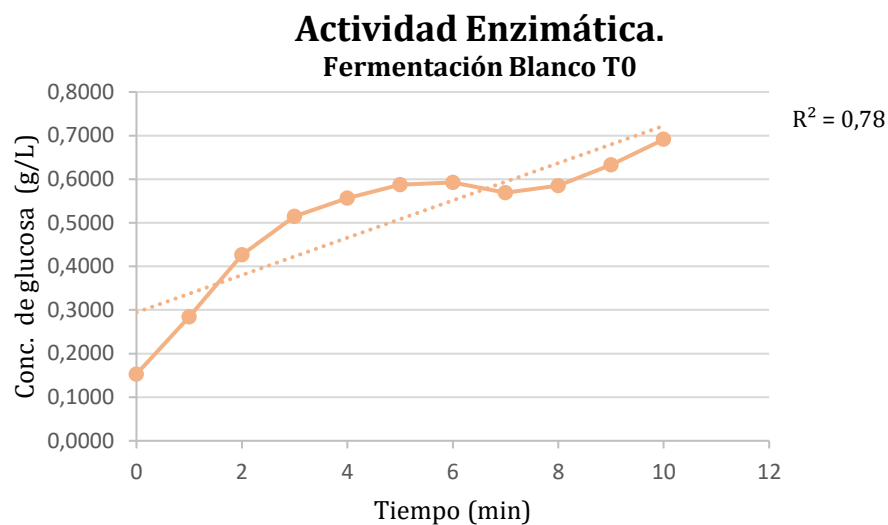


Figura 55. Relación de la concentración de glucosa (g L^{-1}) Vs el tiempo (min), a partir de la fermentación con el T0.

6.2 Fermentación con el T1

En la curva de actividad enzimática de la fermentación con el T1 se observó que se acerca a una tendencia lineal entre la concentración de la glucosa (g L^{-1}) (eje Y) Vs el tiempo (min) (eje X), verificado a través de un R^2 de 0,97, como se aprecia en la Figura 56.

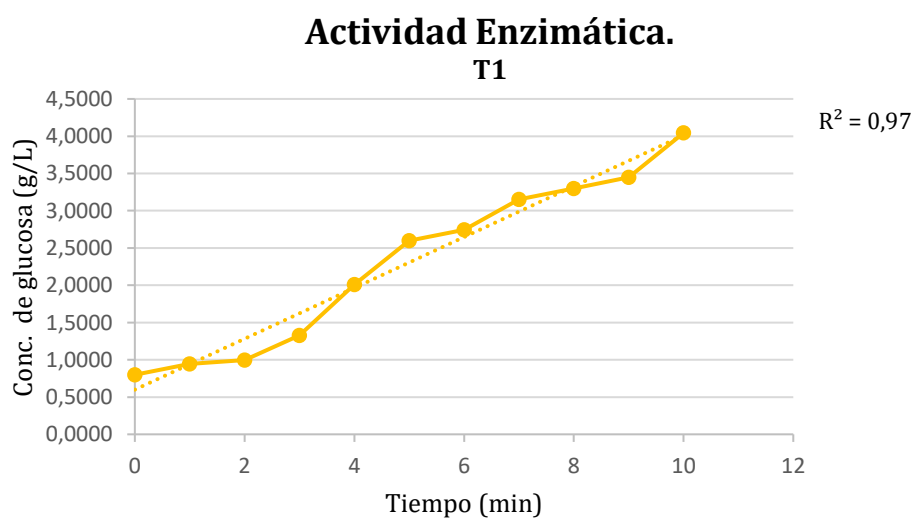


Figura 56. Relación de la concentración de glucosa (g L^{-1}) Vs el tiempo (min), a partir de la fermentación con el T1.

6.3 Fermentación con el T2

Se puede observar que la curva de actividad enzimática de la fermentación con el T2 (Figura 57) con un R^2 de 0,95 se aproximó a una regresión lineal entre la concentración de la glucosa (g L^{-1}) (eje Y) Vs el tiempo (min) (eje X).

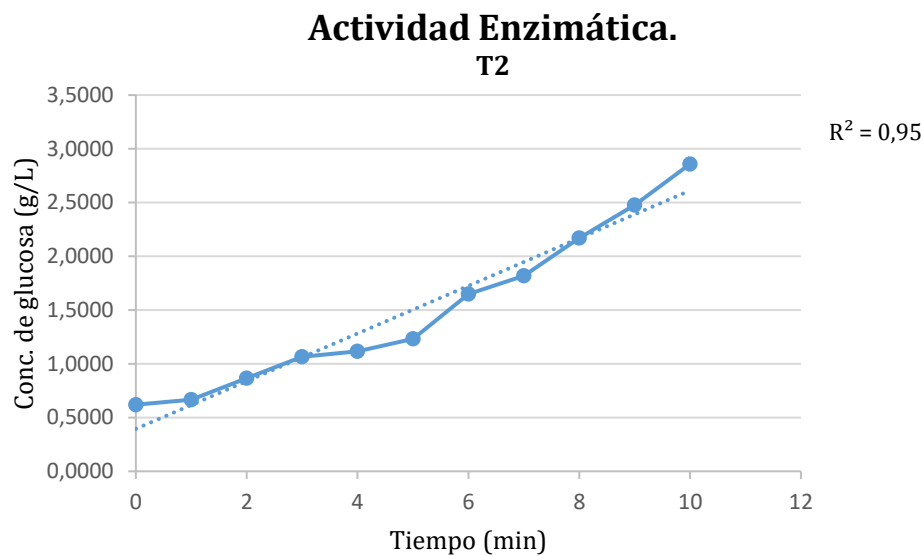


Figura 57. Relación de la concentración de glucosa (g L^{-1}) Vs el tiempo (min), a partir de la fermentación con el T2.

6.4 Fermentación con el T3

La curva de actividad enzimática de la fermentación en el T3 se aproximó a una tendencia lineal entre la concentración de la glucosa (g L^{-1}) (eje Y) Vs el tiempo (min) (eje X), presentando un R^2 de 0,96 (Figura 58).

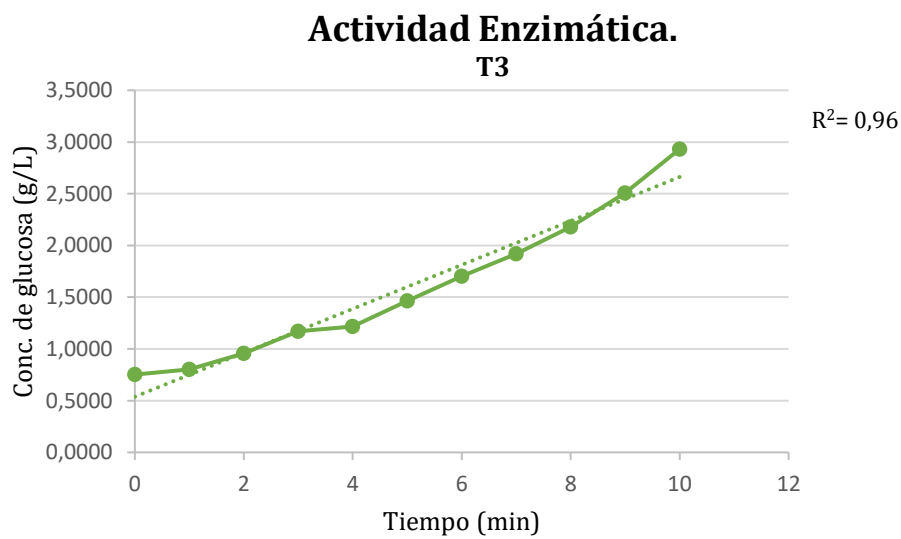


Figura 58. Relación de la concentración de glucosa (g L^{-1}) Vs el tiempo (min), a partir de la fermentación con el T3.

6.5 Fermentación con el T4

En el T4, la curva de actividad enzimática se tendió hacia una regresión lineal entre la concentración de la glucosa (g L^{-1}) (eje Y) Vs el tiempo (min) (eje X) a través de un R^2 de 0,95 (Figura 59).

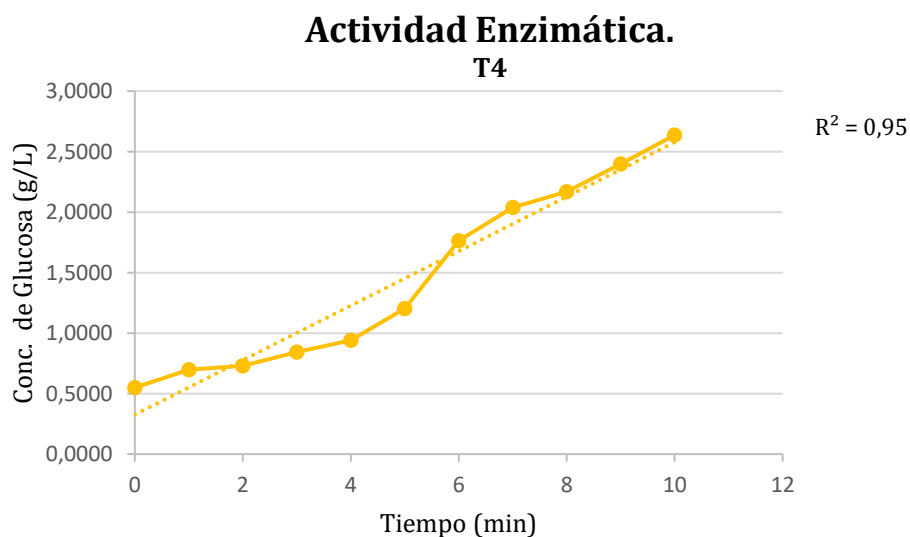


Figura 59. Relación de la concentración de glucosa (g L^{-1}) Vs el tiempo (min), a partir de la fermentación con el T4.

6.6 Fermentación con el T5

La curva de actividad enzimática de la fermentación con el T5 se aproximó a una tendencia lineal entre la concentración de la glucosa (g L^{-1}) (eje Y) Vs el tiempo (min) (eje X), interpretado a través de un R^2 de 0,94, como se aprecia en la Figura 60.

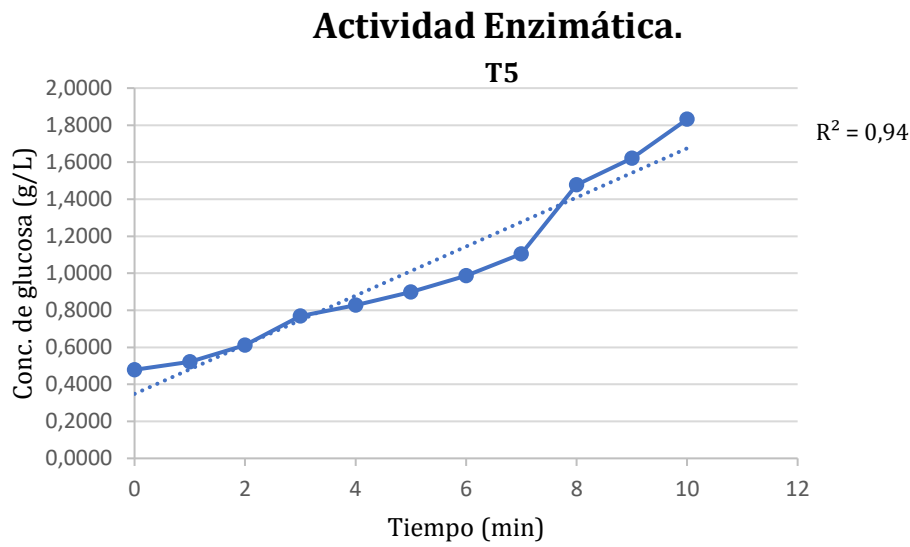


Figura 60. Relación de la concentración de glucosa (g L^{-1}) Vs el tiempo (min), a partir de la fermentación con el T5.

6.7 Fermentación con el T6

En el T6, la curva de actividad enzimática se tendió hacia una regresión lineal entre la concentración de la glucosa (g L^{-1}) (eje Y) Vs el tiempo (min) (eje X), presentando un R^2 de 0,94 (Figura 61).

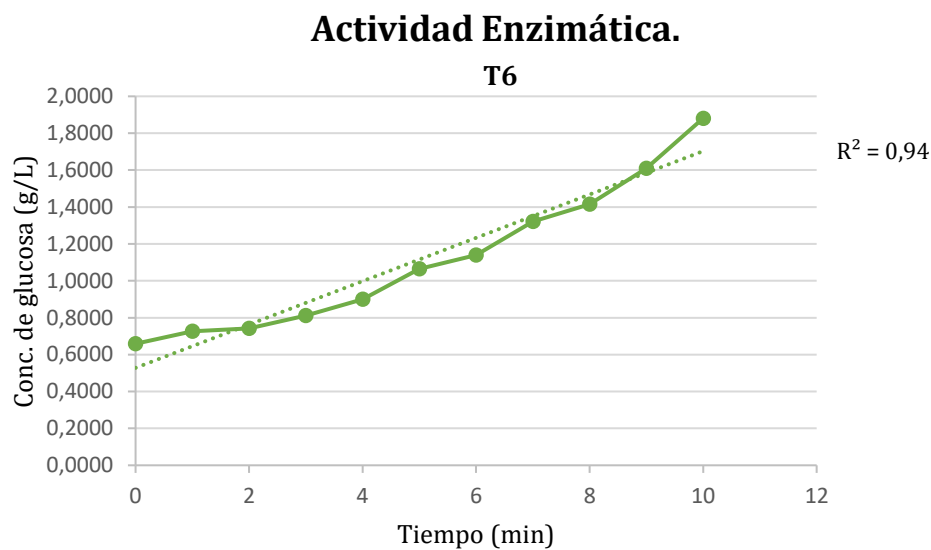


Figura 61. Relación de la concentración de glucosa (g L^{-1}) Vs el tiempo (min), a partir de la fermentación con el T6.

6.8 Fermentación con el T7

La curva de actividad enzimática de la fermentación con el T7 se acercó a una tendencia lineal entre la concentración de la glucosa (g L^{-1}) (eje Y) Vs el tiempo (min) (eje X), presentando un R^2 de 0,93 como se observa en la Figura 62.

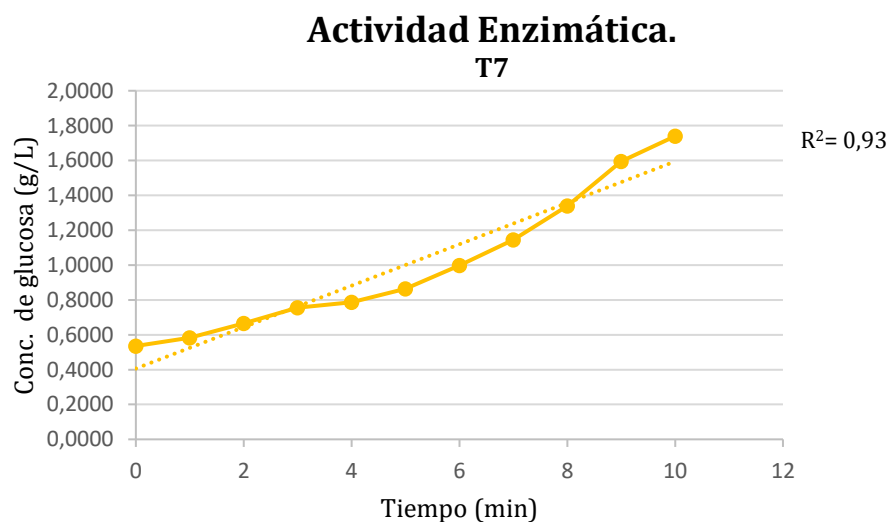


Figura 62. Relación de la concentración de glucosa (g L^{-1}) Vs el tiempo (min), a partir de la fermentación con el T7.

6.9 Fermentación con el T8

En la fermentación del T8, la curva de actividad enzimática a través de un R^2 de 0,92 se aproximó a una regresión lineal entre la concentración de la glucosa (g L^{-1}) (eje Y) Vs el tiempo (min) (eje X), como se puede apreciar en la Figura 63.

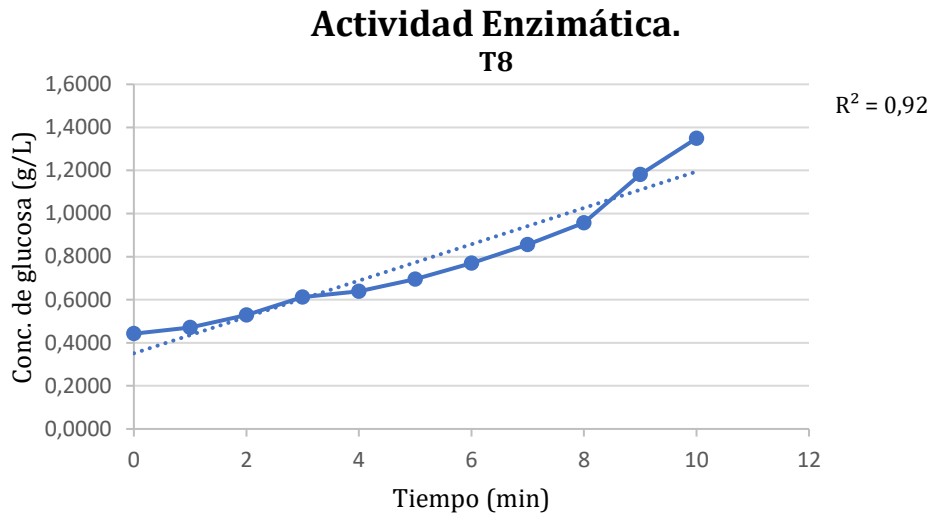


Figura 63. Relación de la concentración de glucosa (g L^{-1}) Vs el tiempo (min), a partir de la fermentación con el T8.

6.10 Fermentación con el T9

La curva de actividad enzimática de la fermentación con el T9 se acercó a una tendencia lineal entre la concentración de la glucosa (g L^{-1}) (eje Y) Vs el tiempo (min) (eje X), presentando un R^2 de 0,93 (Figura 64).

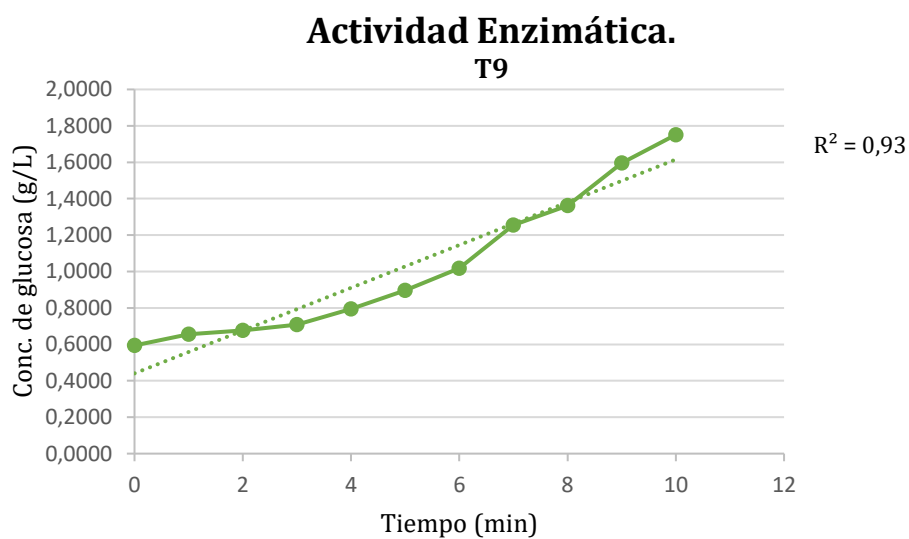


Figura 64. Relación de la concentración de glucosa (g L^{-1}) Vs el tiempo (min), a partir de la fermentación con el T9.

Como se puede observar en la Tabla 20, los mejores resultados se obtienen con el T1 en cuanto a promedio \bar{x} y S, considerando al mismo como el mejor tratamiento.

Tabla 20.

Diseño factorial 3x3 de los resultados de \bar{X} y S al medir la actividad enzimática en los distintos tratamientos.

Diseño Factorial 3x3			Resultados	
Tratamiento	Fuente de Nitrógeno	Conc. N (g L ⁻¹)	\bar{x}	S
T0	Blanco	0	0,68	0,09
T1	Extracto de levadura	2	6,31	5,77E-05
T2	Peptona	2	4,08	0,03
T3	Caseína	2	3,92	0,02
T4	Extracto de levadura	1	4,16	5,77E-05
T5	Peptona	1	2,45	0,0002
T6	Caseína	1	2,17	0,0002
T7	Extracto de levadura	0,5	2,20	0,003
T8	Peptona	0,5	1,52	0,03
T9	Caseína	0,5	2,13	0,03

El T1 obtuvo la mayor actividad enzimática debido a algunas razones. Según Ferrari, Gaber y Fraaije (2014, pp. 7-14); esta fuente de nitrógeno (extracto de levadura) gracias a su fácil metabolismo fúngico, permite que las enzimas α amilasas degraden e hidrolicen con mayor rapidez los enlaces α -1,4 glucosídicos en el interior de la cadena de amilosa del almidón, obteniendo de este modo moléculas de glucosa de menor tamaño.

La hidrólisis de los azúcares reductores del almidón fue detectada rápidamente por el DNS observado mediante un cambio de color de amarillo a anaranjado de la muestra, como se puede ver en la Figura 67.

Según Hewa y otros (2014, pp. 7-8); el DNS es uno de los más utilizados para determinar la actividad enzimática de muestras fúngicas por espectrofotometría UV- Vis. Como afirma Gonzáles y Castellanos (2013); una de las formas más utilizadas para determinar la actividad enzimática de las α amilasas en la

industria, es el método colorimétrico del DNS, el cual determina el contenido de los azúcares reductores excretados en el medio de cultivo de forma cualitativa. Estudios realizados por Sridevi, Sandhya, Ramanjaneyulu, Narasimha, y Suvarnalatha (2016, pp. 140-165); demuestran que existe hidrólisis de azúcares reductores cuando se presenta un cambio de color de amarillo (DNS +muestra) a un color más intenso. El cambio de color también manifiesta la formación de enzimas α amilasas como ocurrió en el presente estudio.

En el ANOVA (Tabla 21), el valor estadístico F corresponde a un valor de 6297,83 el cual es mayor que el valor crítico (2,39) por lo que existen diferencias en los valores de actividad enzimática en los distintos tratamientos más el blanco.

Tabla 21.

ANOVA de la actividad enzimática en los distintos tratamientos más el blanco.

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>de Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>de F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	72,90	9	8,10	6297,83	1,63E-32	2,39
Dentro de los grupos	0,03	20	0,001			
Total	72,93	29				

En la prueba de Tukey se observa que el T1 se diferencia del resto de tratamientos.

Información agrupada utilizando el método de Tukey

N		Agrupación
T0	10	B
T1	10	A
T2	10	B
T3	10	B
T4	10	B
T5	10	B
T6	10	B
T7	10	B
T8	10	B
T9	10	B

Validación de la fuente de nitrógeno: 2 g l⁻¹ de extracto de levadura (t1) para la producción de α amilasas.

En la Tabla 22 se puede apreciar los resultados validados por el DCC en cuanto a producción de biomasa (g L⁻¹) y actividad enzimática (U mL⁻¹), obtenidos a partir de la fermentación con el T1.

Tabla 22.

DCC para la producción de α amilasas con el T1.

DCC para la producción de α amilasas						
	Variables Independientes				Variables Dependientes	
	Almidón de trigo (g L⁻¹)		Fuente Nitrógeno T1 (g L⁻¹)		Resultados	
N° corrida	Variable Codificada	Variable Decodificada	Variable Codificada	Variable Decodificada	Biomasa (g L ⁻¹)	Actividad enzimática (U mL ⁻¹)
1	-1,0	3,20	-1,0	0,80	10,55	6,31
2	-1,0	3,20	1,0	1,20	10,58	6,31
3	1,0	8,80	-1,0	0,80	10,57	6,37
4	1,0	8,80	1,0	1,20	10,59	6,39
5	-1,4	2,00	0,0	1,50	10,58	6,43
6	1,4	10,00	0,0	1,50	10,58	6,47
7	0,0	6,00	-1,4	0,50	10,58	6,50
8	0,0	6,00	1,4	2,50	10,58	6,54
9	0,0	6,00	0,0	1,50	10,57	6,53
10	0,0	6,00	0,0	1,50	10,56	6,55
11	0,0	6,00	0,0	1,50	10,58	6,50
12	0,0	6,00	0,0	1,50	10,59	6,56

La superficie de respuesta de la Figura 65, mediante su curvatura mostró un ajuste cuadrático de las variables respuesta: concentración de biomasa y actividad enzimática de la α amilasa en función del efecto de la fuente de nitrógeno: 2 g L⁻¹ de extracto de levadura (T1) propuesto por el diseño factorial 3x3 inicial, lo cual indica que el DCC se ha planteado correctamente y que la fuente de nitrógeno optimiza la producción de α amilasas (Jia et al., 2015; Izmirlioglu y Demirci, 2015; Mohan, Kumar y Sarathi, 2015, pp. 385-393).

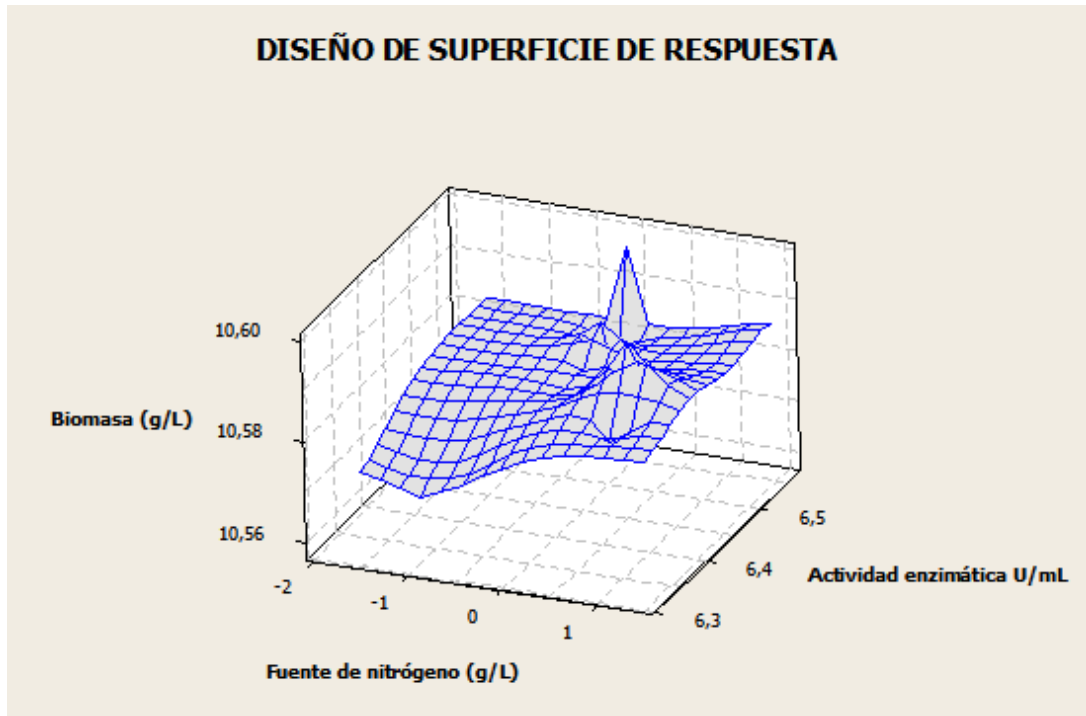


Figura 65. Superficie de respuesta de la concentración de biomasa (g L^{-1}) y actividad enzimática (U mL^{-1}) en función de la fermentación con el T1 de *Aspergillus niger* para la producción de α amilasas, según el DCC.

En la Tabla 23 se presenta los resultados de actividad enzimática obtenidos en las diferentes concentraciones de activador. Se puede observar que en el experimento 3 (6,36 mM) se obtuvo la mayor actividad enzimática con un valor de $6,41 \text{ U mL}^{-1}$, mientras que la concentración de activador 10,6 mM dio lugar al menor registro ($6,26 \text{ U mL}^{-1}$).

Tabla 23.

Diseño 5¹ de las diferentes concentraciones del activador CaCl₂ y los resultados de \bar{X} y S obtenidos al medir la actividad enzimática en cada caso.

Diseño 5 ¹		Resultados (U mL ⁻¹)	
Experimento	Concentración CaCl ₂	\bar{X}	S
1	2,12 mM	6,32	0,02
2	4,24 mM	6,36	0,02
3	6,36 mM	6,41	5,77E-05
4	8,48 mM	6,34	0,02
5	10,6 mM	6,26	0,03

Al realizar el ANOVA para la actividad enzimática (Tabla 24), se obtiene un valor estadístico F de 17,68 que comparado con el valor crítico F (3,48) es mayor, por lo que se concluye que existen diferencias significativas en cuanto a la actividad enzimática en los distintos experimentos dados por las concentraciones del activador.

Tabla 24.

ANOVA de los resultados de actividad enzimática obtenidos a partir del T1 con diferentes concentraciones de activador CaCl₂.

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	de Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	de F	Valor crítico Probabilidad para F
Entre grupos	0,04	4	0,009	17,68	0,0002 3,48
Dentro de los grupos	0,005	10	0,0005		
Total	0,04	14			

Con la prueba de Tukey, se observa que el experimento 1 y 3 (actividad enzimática de 6,32 y 6,41 U mL⁻¹, respectivamente) son diferentes a los demás realizados.

Información agrupada utilizando el método de Tukey

N	Agrupación
E1 5	A
E2 5	B
E3 5	A
E4 5	B
E5 5	B

6.11 Fermentación con el T1 más el activador cacl₂ 6,36 mm

La curva de actividad enzimática de la fermentación con el T1 más el activador CaCl₂ (6,36 mM), se aproximó a una regresión lineal entre la concentración de la glucosa (g L⁻¹) (eje Y) Vs el tiempo (min) (eje X), obteniendo un R² de 0,99 (Figura 66).

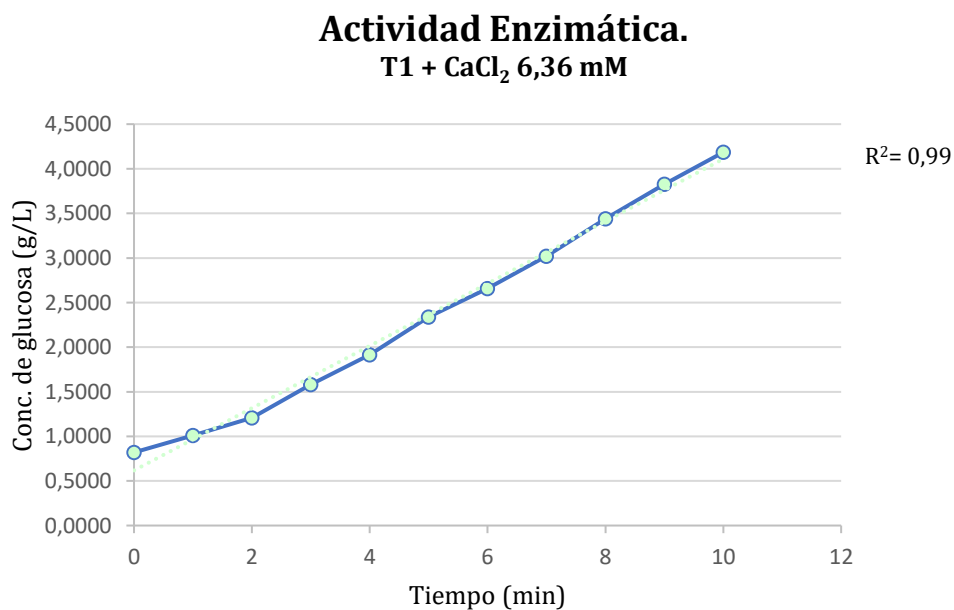


Figura 66. Relación de la concentración de glucosa (g L^{-1}) Vs el tiempo (min), a partir de la fermentación con el T1 más el activador CaCl_2 6,36 mM.

Al comparar las muestras de la fermentación con el T1 antes y después de añadir el activador CaCl_2 (6,36 mM), se observó un cambio de color de amarillo a anaranjado en ambos casos, luego de calentar cada una de las muestras reaccionantes con DNS, a diferencia de que en el segundo caso (fermentación con activador) el cambio de color fue más pronunciado, como se puede observar en la Figura 67.

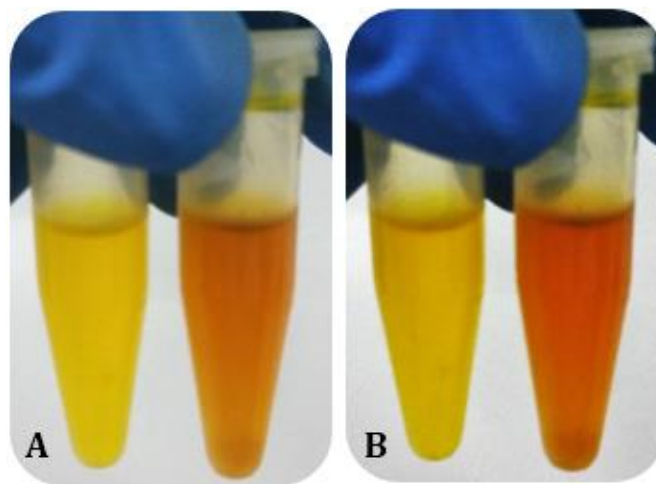


Figura 67. Muestras del T1 tras su reacción con DNS.

A) Resultados antes de añadir el activador CaCl_2 6,36 mM.

B) Resultados después de añadir el activador CaCl_2 6,36 mM.

En la Tabla 25 se observa los resultados de la producción de biomasa en los distintos experimentos con las concentraciones del activador. En el experimento 3 se obtiene el mejor registro ($11,17 \text{ g L}^{-1}$), mientras que el experimento 1 dio lugar al menor valor ($10,30 \text{ g L}^{-1}$).

Tabla 25.

Diseño 5¹ de las diferentes concentraciones del activador CaCl₂ y resultados de \bar{X} y S obtenidos al medir la producción de biomasa en cada caso.

Diseño 5 ¹		Resultados (g L ⁻¹)	
Nº Experimento	Concentración (CaCl ₂)	\bar{X}	S
1	2,12 mM	10,30	0,06
2	4,24 mM	10,63	0,15
3	6,36 mM	11,17	0,005
4	8,48 mM	10,84	0,16
5	10,6 mM	10,80	0,05

En el ANOVA (Tabla 26), el valor estadístico F (24,69) es mayor que el valor crítico F (3,48), por tanto, existen diferencias entre la producción de biomasa en los distintos experimentos.

Tabla 26.

ANOVA de los resultados de concentración de biomasa obtenidos a partir del T1 con diferentes concentraciones de activador CaCl₂.

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	de Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	de F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1,21	4	0,30	24,69	0,00004	3,48
Dentro de los grupos	0,12	10	0,01			
Total	1,33	14				

Al aplicar la prueba de Tukey, se observa que el experimento 1 y 3, con valores de producción de biomasa de 10,31 y 11,17 g L⁻¹, respectivamente son diferentes a los restantes experimentos realizados.

Información agrupada utilizando el método de Tukey

	N	Agrupación
E1	5	A
E2	5	B
E3	5	A
E4	5	B
E5	5	B

6.12 Fermentación con el T1 más el activador CaCl₂ 6,36 mM

La curva de generación de biomasa de la fermentación con el T1 más el activador CaCl₂ (6,36 mM), se aproximó a una tendencia lineal entre la concentración de la biomasa (g L⁻¹) (eje Y) Vs el tiempo (h) (eje X), presentando un R² de 0,99, como se puede observar en la Figura 68.

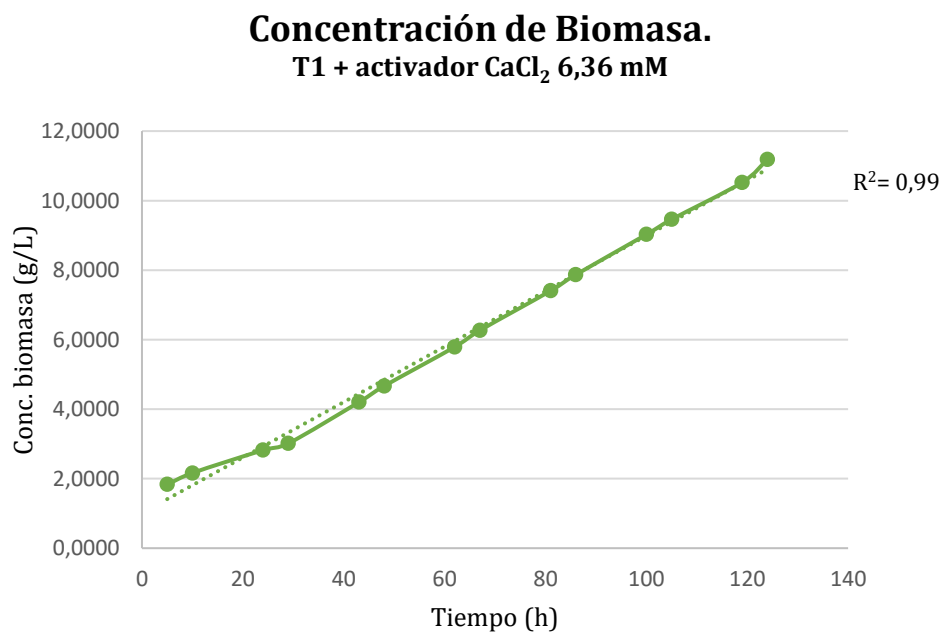


Figura 68. Relación de la concentración de la biomasa (g L⁻¹) Vs el tiempo (h), a partir de la fermentación con el T1 más activador CaCl₂ 6,36 mM.

La curva de consumo de sustrato de la fermentación con el T1 más activador CaCl_2 6,36 mM, se aproximó a una regresión lineal entre la concentración de la glucosa (g L^{-1}) (eje Y) Vs el tiempo (h) (eje X), corroborado por un R^2 de 0,99 (Figura 69).

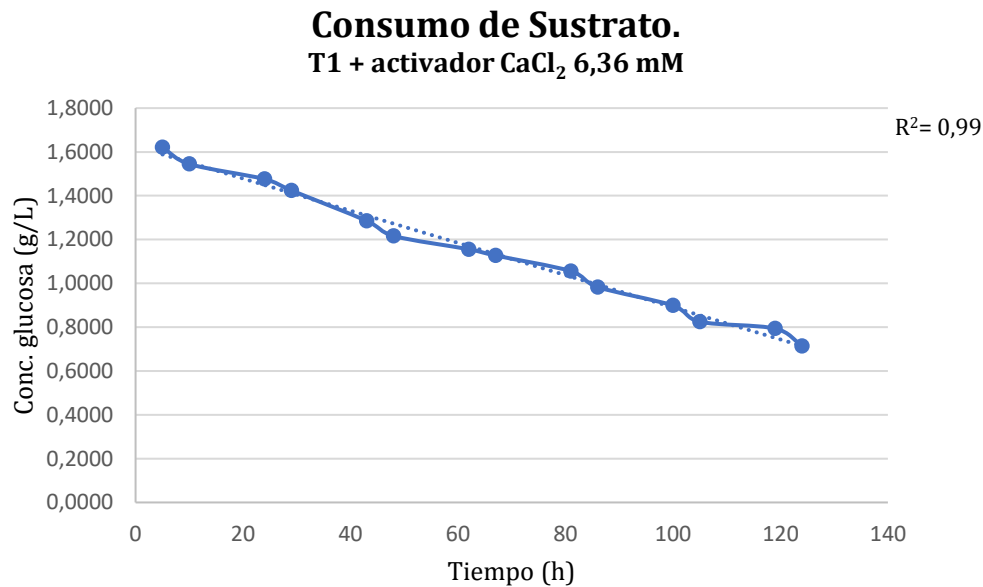


Figura 69. Relación de la concentración de la glucosa (g L^{-1}) Vs el tiempo (h), a partir de la fermentación con el T1 más activador CaCl_2 6,36 mM.

Se produce una relación inversamente proporcional entre la concentración de biomasa (crecimiento ascendente) y consumo de sustrato (crecimiento descendente) (g L^{-1}) (eje Y) Vs el tiempo (h) (eje X), a partir de la fermentación con el T1 más activador CaCl_2 6,36 mM de *Aspergillus niger*, como se puede observar en la Figura 70.

Concentración de Biomasa Vs consumo de Sustrato.
T1 + activador CaCl₂ 6,36 mM

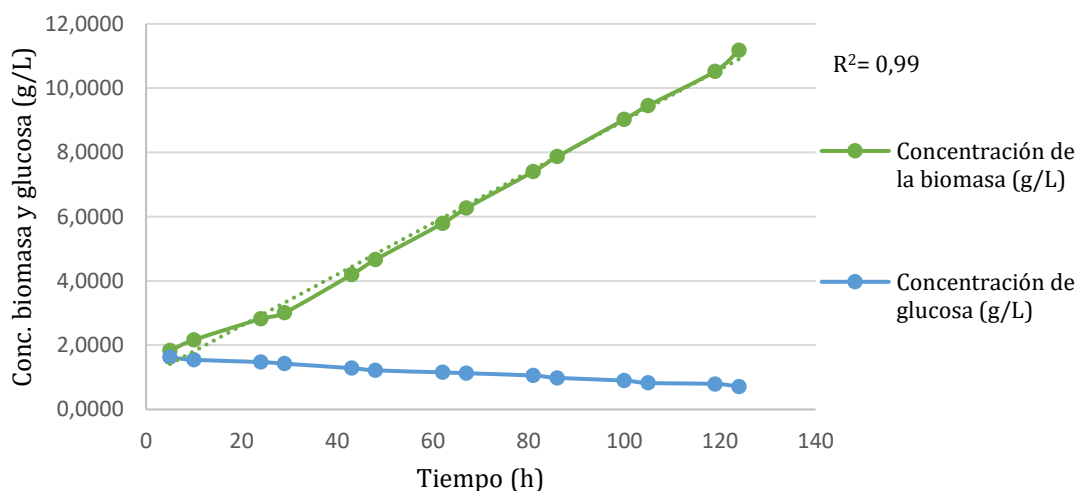


Figura 70. Relación de la concentración de biomasa y glucosa (g L^{-1}) Vs el tiempo (h), a partir de la fermentación con el T1 más activador CaCl_2 6,36 mM.

El CaCl_2 (6,36 mM), aumentó significativamente la concentración de biomasa y la actividad enzimática de la α amilasa. Según Espinel y López (2011, pp. 204 - 208); el ion Ca^{2+} es uno de los activadores de más alto poder, que podría presentar interacciones complementarias favorables, que permitan neutralizar las cargas negativas en los dominios estructurales A y B de la enzima.

Según Mojsov (2012); la mayor parte de las α amilasas pertenecen a las metaloenzimas, las cuales necesitan de iones de Ca^{2+} para estabilizar su estructura tridimensional y sobre todo su actividad funcional. Aunque este elemento no esté incluido en su centro activo, se encuentra fuertemente unido a estas enzimas. Esto indica que el CaCl_2 utilizado en el presente estudio haya incrementado la concentración de biomasa. Según Brayer y otros (2011); Tiwari y otros (2015, pp. 1886-1901); el Ca^{2+} en una concentración de 10 iones por molécula, estabiliza la conformación global de la enzima, logrando una mayor actividad enzimática.

Después de utilizar el activador enzimático se obtuvieron valores de $\mu = 0,0138 \text{ h}^{-1}$, $t_d = 50,21 \text{ h}^{-1}$ y $Y_{x/s} = 10,31 \text{ g células/g sustrato}$.

7. Séptima etapa: criopreservación del hongo *Aspergillus niger* van Tieghem (ATCC® 6275)

Determinación de la viabilidad de *Aspergillus niger* mediante el mejor crecimiento y esporulación

Los resultados obtenidos luego de 7 días de incubación a 25 °C bajo una atmósfera aeróbica previa inoculación en agar almidón de trigo, de las alícuotas criopreservadas de *Aspergillus niger* (congelación a las temperaturas establecidas: 8, 2, -20 y - 80 °C, seguido de la descongelación (-80, -20, 2 y 8 °C)) en glicerol al 50%, a partir de dos medios de cultivo estériles: leche al 7% y SDB, se muestran en las Figuras 71 A y B.



Figura 71. Crecimiento de *Aspergillus niger* van Tieghem (ATCC® 6275) a partir de su criopreservación en medios de cultivo.

A) Leche al 7%.

B) SDB.

Determinación de la viabilidad de *Aspergillus niger* por medición de la mejor actividad enzimática

SDB

La curva de actividad enzimática para *Aspergillus niger* criopreservado en SDB, se aproximó a una regresión lineal entre la concentración de la glucosa (g L⁻¹) (eje Y) Vs el tiempo (min) (eje X), presentando un R² de 0,96 (Figura 72).

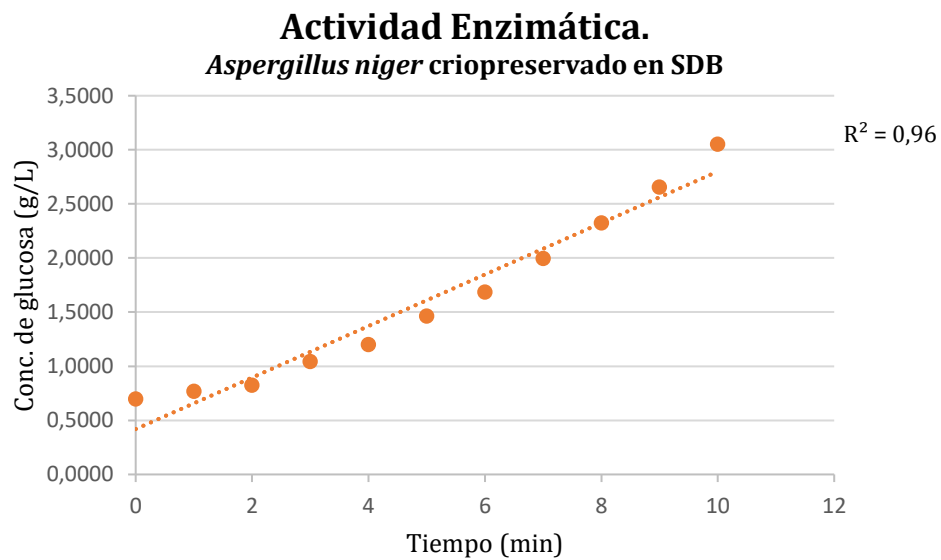


Figura 72. Relación de la concentración de la glucosa (g L^{-1}) Vs el tiempo (min) de *Aspergillus niger* van Tieghem (ATCC® 6275) criopreservado en SDB.

Se obtuvo un valor de actividad enzimática de $4,41 \text{ U mL}^{-1}$ proteína.

LECHE AL 7%

En la curva de actividad enzimática para *Aspergillus niger* criopreservado en leche al 7% se verificó una tendencia lineal entre la concentración de la glucosa (g L^{-1}) (eje Y) Vs el tiempo (min) (eje X), corroborado además por un R^2 de 0,82, como se observa en la Figura 73.

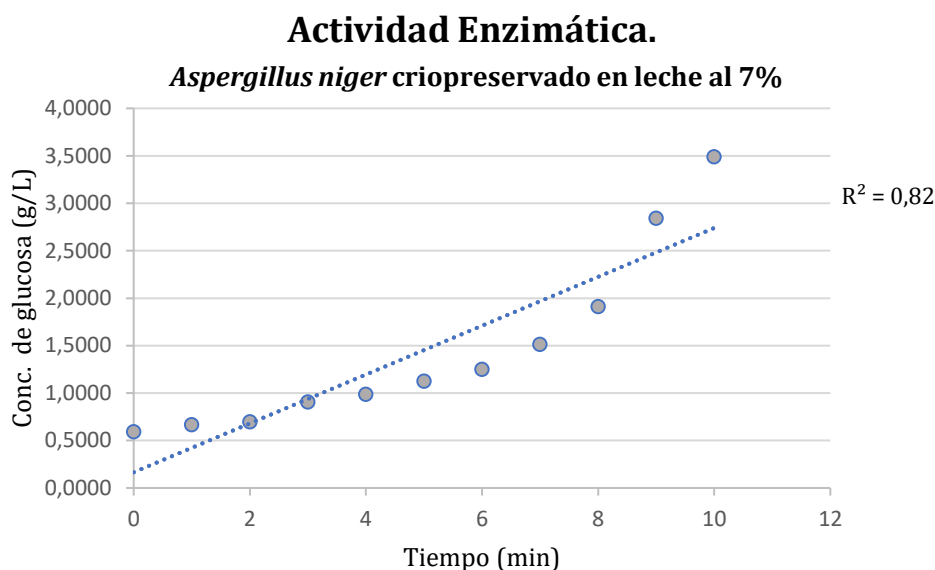


Figura 73. Relación de la concentración de la glucosa (g L^{-1}) Vs el tiempo (min) de *Aspergillus niger* van Tieghem (ATCC® 6275) criopreservado en leche al 7%.

Se obtuvo un valor de actividad enzimática de $1,99 \text{ U mL}^{-1}$ proteína.

El mejor resultado de viabilidad celular de *Aspergillus niger* van Tieghem (ATCC® 6275) criopreservado en glicerol al 50% y a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$, se obtuvo bajo el efecto del SDB, que a diferencia de la leche al 7%, presentó un mayor crecimiento y esporulación del hongo como se muestra en la Figura 71 B, un mejor ajuste lineal de las variables, con un R^2 de 0,96 (Figura 72) y un valor de actividad enzimática superior correspondiente a $4,41 \text{ U mL}^{-1}$ proteína. Esto se debe a la composición del SDB con cloranfenicol; el cual contiene digestivos enzimáticos de caseína y tejidos animales, junto con una elevada concentración de dextrosa, que proporcionaron nitrógeno, vitaminas y carbono necesarios, para el óptimo desarrollo de colonias blancas en forma de hifas de *Aspergillus niger* y en una fase más tardía, el crecimiento de conidios globulares con esporas de color negro. Según Colin y otros (2013, pp. 3-27); todos los microorganismos necesitan de una fuente de nitrógeno y carbono para poder sobrevivir, dichas fuentes deben presentarse en una concentración no tóxica para cada microorganismo. Esta afirmación permite aseverar que la

concentración del T1 fue la más propicia para el crecimiento de *Aspergillus niger*. El cloranfenicol inhibió el crecimiento de bacterias Gram positivas y Gram negativas. Según Passamani y otros (2014); la temperatura de 25 °C y el pH de 6,5, con las cuales se desarrolló todo el presente trabajo experimental, son las condiciones más idóneas para la producción de α amilasas a partir de *Aspergillus niger*.

Como lo afirma Dumont, Marechal y Gervais (2014); el metabolismo del SDB es sencillo, permitiendo una correcta hidrólisis de los azúcares reductores mediante la ruptura de los enlaces α 1,4 glucosídicos, obteniendo moléculas de glucosa de menor tamaño que se secretan al medio en una cantidad superior y por ende generan un mayor nivel de absorbancia al ser leídas a 540 nm. Esto explica que el T1 haya presentado un mayor nivel de absorbancia al ser leído por espectrofotometría.

La temperatura de -80 °C y el glicerol al 50% también jugaron un papel muy importante en la viabilidad de *Aspergillus niger*, ya que ambos actuaron como crioprotectores. La baja temperatura detuvo el metabolismo celular y crecimiento del hongo, mientras que el glicerol conservó las propiedades externas (esporas) de este, permitiendo un crecimiento exponencial al descongelarlo e inocularlo en almidón de trigo (ATCC, 2011; Microbiologics, 2015). Según Perkins (2015); la manera más efectiva de criopreservar hongos indistintamente del medio que se use, es por medio del glicerol en la concentración adecuada de acuerdo al microorganismo y la congelación a -80 y -198 °C. Por ello al descongelar las muestras e inoculadas en SDB y leche al 7% crecieron sin mayor problema luego de su periodo de incubación.

8. OCTAVA ETAPA: purificación de la mejor fermentación mediante ultrafiltración y precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para la obtención de α amilasas

Ultrafiltración del medio de fermentación

Se obtuvo un cambio de color de verde grisáceo a anaranjado, luego de ultrafiltrar el extracto crudo de la fermentación con el T1 más activador CaCl_2 6,36 mM, como se puede observar en la Figura 74.

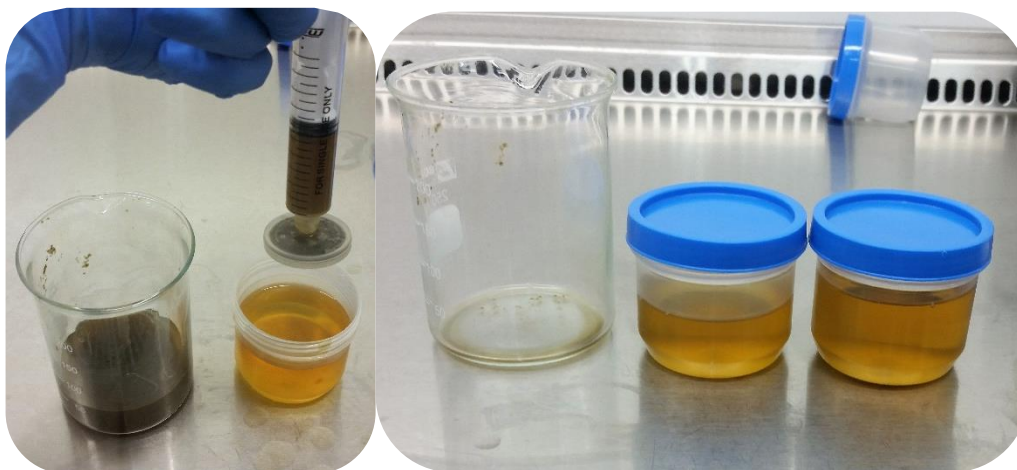


Figura 74. Ultrafiltración del extracto crudo de la fermentación con el T1 más activador CaCl_2 6,36 mM.

El cambio de color que se observa en la Figura 74 según Ching y otros (2012); se debe a la separación de las partículas coloidales de mayor tamaño del poro (0,045 μm) (retenido), de las partículas de menor tamaño del mismo (filtrado), por efecto de la presión sobre las membranas denominado también, proceso tangencial de membranas. Según Orozco y otros (2011); la ultrafiltración permite una mayor concentración de las partículas de acuerdo al tamaño del poro de la membrana utilizada. El tamaño de poro utilizado para ultrafiltrar el fermento fue de 0,045 μm por tal motivo se esperaba obtener enzimas de este tamaño, el cual concuerda con el rango de tamaños de enzimas fúngicas como las α amilasas (Brayer et al., 2011).

La obtención de partículas de 0,045 μm en el filtrado de la experimentación del presente trabajo, tendrían un peso molecular de 45 kDa. Tiwari y otros (2015, pp. 1886-1901); en su estudio determinaron que el peso molecular aproximado de las α amilasas es de 57,6 kDa, el cual se aproxima al calculado en esta investigación.

Extracción y purificación de la enzima cruda

Se obtuvo un precipitado enzimático de color café oscuro (α amilasas), luego de la centrifugación del extracto ultrafiltrado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, como se puede observar en la Figura 75.

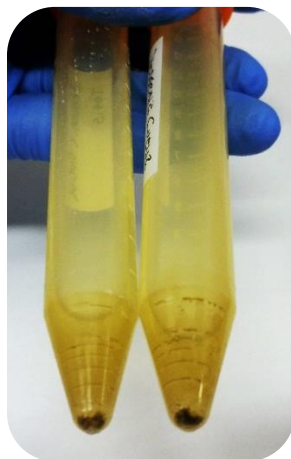


Figura 75. Precipitado enzimático (α amilasas) del extracto ultrafiltrado de la fermentación con el T1 más activador CaCl_2 6,36 mM, luego de su centrifugación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

El color café obtenido según Racheal, Ahmed, Ndigwe, y Morakinyo (2015, pp. 126-133); se debe a que el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, que es una de las sales más usadas en la precipitación de proteínas, al entrar en contacto con moléculas hidrosolubles como las α amilasas, por su alto poder de disminución de la solubilidad extrae los átomos de H^+ , dejando sin agua a la proteína, de tal forma que, al centrifugar las moléculas precipitan de forma sólida y color café como ocurrió en esta fase experimental.

Determinación de la actividad enzimática del precipitado

La curva de actividad enzimática del precipitado de la fermentación con el T1 y activador CaCl_2 (6,36 mM), se aproximó a una regresión lineal entre las variables: concentración de la glucosa (g L^{-1}) (eje Y) Vs el tiempo (min) (eje X), corroborado también a través de un R^2 de 0,99. (Figura 76).

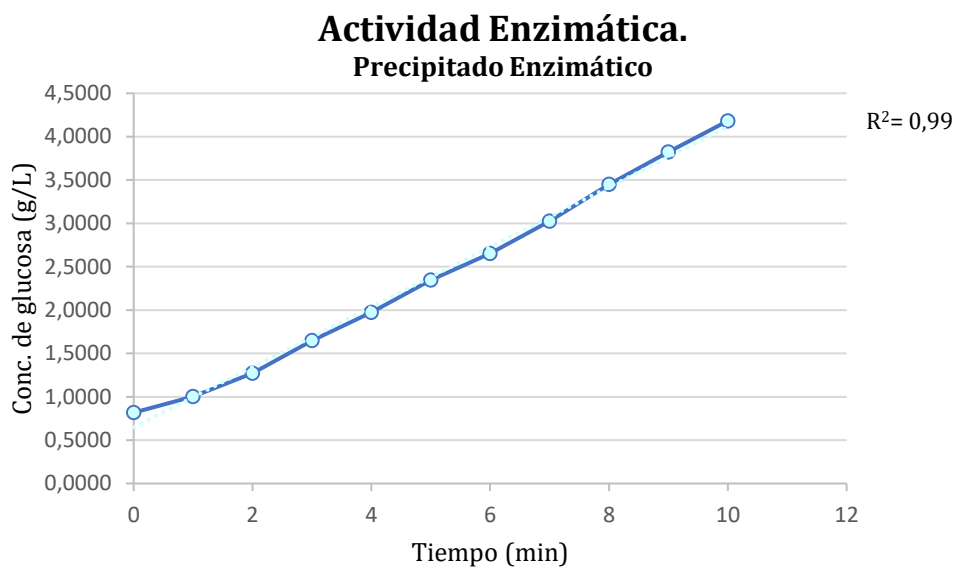


Figura 76. Relación de la concentración de glucosa (g L^{-1}) Vs el tiempo (min), a partir del precipitado enzimático de la fermentación con el T1 y activador CaCl_2 6,36 mM.

Se obtuvo un valor de actividad enzimática de $6,52 \text{ U mL}^{-1}$ proteína.

Al contrastar los resultados se aprecia que la mejor actividad enzimática del presente estudio se obtuvo a partir del precipitado enzimático de la fermentación con el T1 y activador CaCl_2 6,36 mM, como se muestra en la Tabla 27.

Tabla 27.

Resultados de actividad enzimática de la fermentación con el T1 en fase de extracto crudo, con activador CaCl₂ 6,36 mM y como precipitado enzimático.

Parámetros a evaluar	Extracto crudo de la fermentación con el T1	Fermentación con el T1 más activador CaCl₂ 6,36 mM	Precipitado enzimático de la fermentación con el T1 más activador CaCl₂ 6,36 mM
Actividad enzimática U mL ⁻¹	6,31	6,41	6,52

La razón para ello sería el poder de óxido-reducción del (NH₄)₂SO₄, que permite que las proteínas precipiten en forma sólida luego de la centrifugación, quedando expuestas en el medio y logrando de esta forma una mejor hidrólisis de los enlaces α 1,4 glucosídicos de las unidades de glucosa (amilosa y amilopectina) del almidón.

Según Peng y otros (2014, pp. 1161-1167); las subunidades de glucosa obtenidas del proceso de hidrólisis de los azúcares del almidón, por su estructura de cadena corta son detectadas más rápidamente por el DNS, y por ende presentan un mayor nivel de absorbancia, como ocurrió con el precipitado enzimático.

Como afirma Wang y otros (2016); el valor de actividad enzimática para α amilasas se encuentra en un rango de 5,8 hasta 6,5 U mL⁻¹, lo que comprueba que la actividad enzimática medida en el precipitado posiblemente pertenecería a este tipo de enzimas.

Las condiciones de pH=6,5, temperatura 25 °C y el tipo de sustrato empleado (almidón de trigo) para el crecimiento y fermentación de *Aspergillus niger* van Tieghem (ATCC® 6275) fueron las mejores. En un estudio Hewa y otros (2014, pp. 7-8), utilizaron condiciones muy parecidas a las del presente estudio

consiguiendo producir una gran cantidad de α amilasas, que es lo que se espera obtener de igual manera.

Evaluación de la concentración de biomasa del precipitado enzimático

La curva de producción de biomasa del precipitado enzimático de la fermentación con el T1 más activador CaCl_2 (6,36 mM), tendió hacia una regresión lineal entre la concentración de la biomasa (g L^{-1}) (eje Y) Vs el tiempo (h) (eje X), presentando un R^2 de 0,99, como se puede ver en la Figura 77.

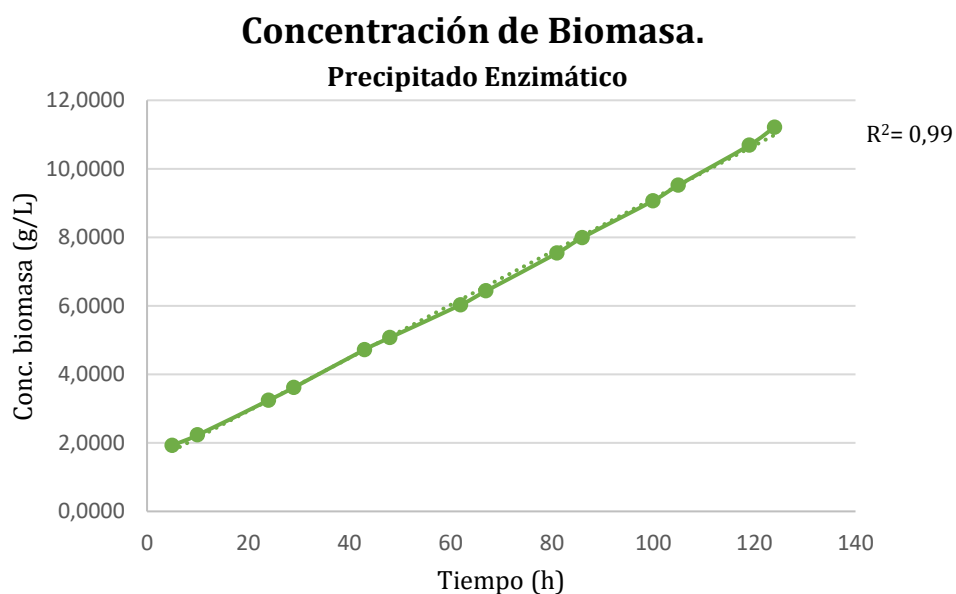


Figura 77. Relación de la concentración de la biomasa (g L^{-1}) Vs el tiempo (h), a partir del precipitado enzimático de la fermentación con el T1 más el activador CaCl_2 6,36 mM.

Evaluación del consumo de sustrato del precipitado enzimático

Se observó que la curva de consumo de sustrato del precipitado enzimático de la fermentación con el T1 más el activador CaCl_2 (6,36 mM), se aproxima a una regresión lineal entre la concentración de la glucosa (g L^{-1}) (eje Y) Vs el tiempo (h) (eje X), lo que se corroboró a través de un valor de R^2 de 0,98 (Figura 78).

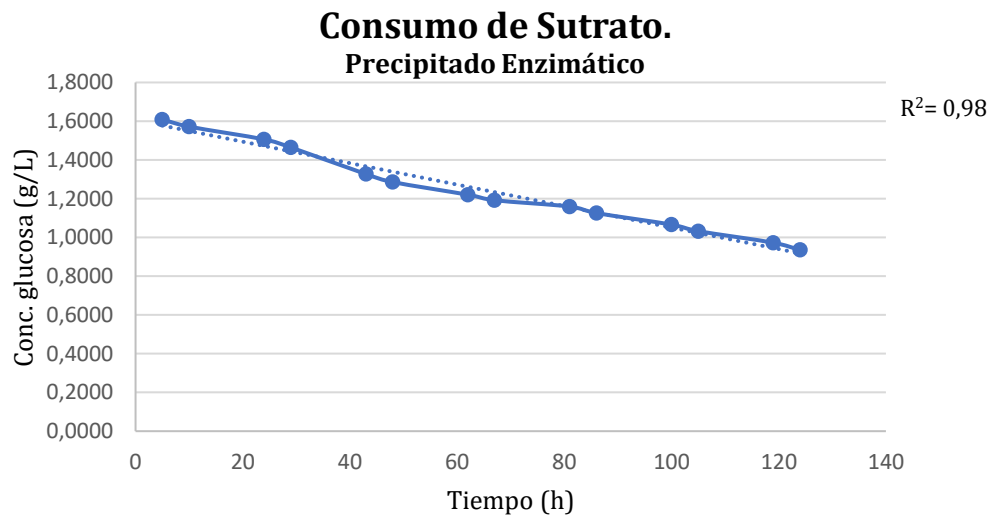


Figura 78. Relación de la concentración de la glucosa (g L^{-1}) Vs el tiempo (h), a partir del precipitado enzimático de la fermentación con el T1 más el activador CaCl_2 6,36 mM.

Se evidencia una relación inversamente proporcional entre la concentración de biomasa (crecimiento ascendente) y el consumo de sustrato (crecimiento descendente) (g L^{-1}) (eje Y) Vs el tiempo (h) (eje X), a partir del precipitado enzimático de la fermentación con el T1 más activador CaCl_2 (6,36 mM) de *Aspergillus niger*, como se puede observar en la Figura 79.

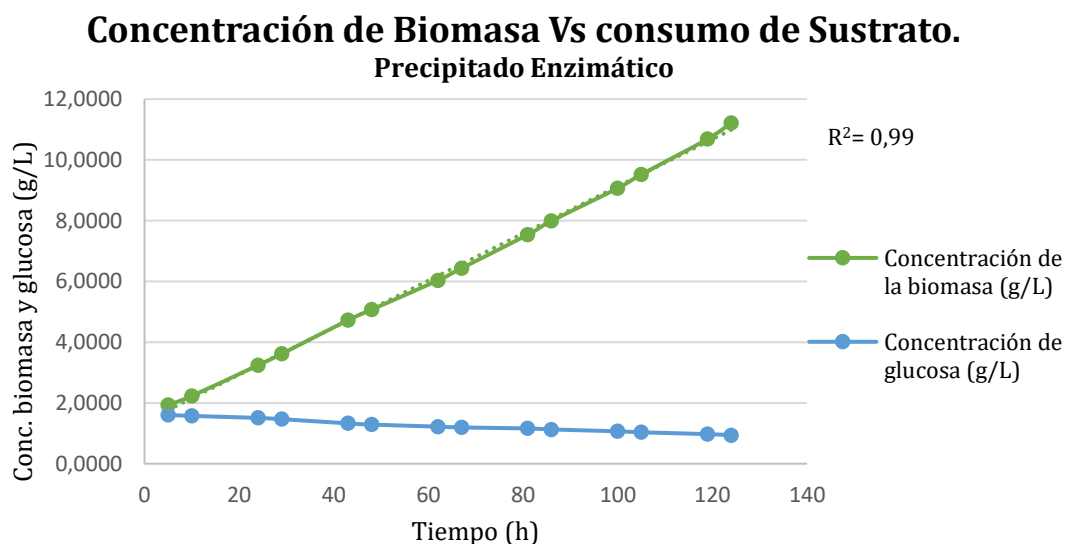


Figura 79. Relación de la concentración de biomasa y glucosa (g L^{-1}) Vs el tiempo (h), a partir del precipitado enzimático de la fermentación con el T1 y activador CaCl_2 6,36 mM.

La mayor producción de biomasa en el presente estudio se logró a partir del precipitado enzimático de la fermentación con el T1 más el activador CaCl_2 6,36 mM, como se muestra en la Tabla 28.

Tabla 28.

Resultados de biomasa, μ , td y $Y_{x/s}$, de la fermentación con el T1 en fase de extracto crudo, con activador CaCl_2 6,36 mM y como precipitado enzimático.

Parámetros a evaluar	Extracto crudo de la fermentación con el T1	Fermentación con el T1 y activador CaCl_2 6,36 mM	Precipitado enzimático de la fermentación con el T1 y activador CaCl_2 6,36 mM
Biomasa (g L^{-1})	10,57	11,17	11,21
μ (h^{-1})	0,01	0,0138	0,0148
td (h^{-1})	61,23	50,21	46,84
$Y_{x/s}$ (g células/ g sustrato)	9,79	10,31	13,80

Según (Castro et al., 2011, pp. 2-5); la mayor concentración de biomasa del precipitado se debe al poder de precipitación del soluto (proteínas) de una solución por parte del $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, el cual, al entrar en contacto con un medio de fermentación incrementa su fuerza iónica inicial y provoca la ruptura de las células, las cuales liberan su contenido proteico al medio. La elevada concentración de proteínas en el medio va reduciendo la interacción proteína- H_2O , hasta que pierden su humedad totalmente y precipitan de forma sólida tras la centrifugación, por esta razón en el precipitado del T1 se leyó una mayor cantidad de biomasa ($11,21 \text{ g L}^{-1}$).

El mayor nivel de pureza del precipitado enzimático también influyó los resultados de los parámetros cinéticos: obteniendo una velocidad específica de crecimiento mayor ($\mu=0,0148 \text{ h}^{-1}$), un tiempo de duplicación ($\text{td}=46,84 \text{ h}^{-1}$) menor y un considerable incremento del rendimiento celular ($Y_{x/s}=13,80 \text{ g células/ g sustrato}$). Según Bai y otros (2013, pp. 528–540); los fermentos de

proteínas con una etapa de purificación previa como es el caso del $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, disminuyen las interferencias con otro tipo de compuestos o residuos no proteicos que pueden disminuir el poder de absorción y detección. Con esto se comprueba que el T1 con el activador CaCl_2 (6,36 mM) en fase de precipitado haya presentado el mejor valor de producción de biomasa.

9. Novena etapa: elaboración de pan de yema con y sin α amilasas

Se obtuvo una mejor maleabilidad y textura de la masa al adicionar los 5 ml de α amilasas lo que se comprobó al terminar el batido (Figura 80).



Figura 80. Mejor textura y maleabilidad de la masa realizada con α amilasas.

El amasado y horneado se realizan en menor tiempo en el pan que contiene las α amilasas, como se observa en la Figura 81.



Figura 81. Diferencia de color a los 10 minutos de horneado del pan de yema.

A) Sin α amilasas.

B) Con α amilasas.

Se produjo un ligero aumento de volumen en el pan de yema que contuvo α amilasas a diferencia del pan de yema que no las contenía (Figura 82).



Figura 82. Volumen del pan de yema A. sin y B. con α amilasas.

Se obtuvo una estructura de miga más fina en el pan de yema donde se utilizó α amilasas a diferencia del pan que no contenía estas enzimas, como se puede observar en la Figura 83.



Figura 83. Estructura de la miga del pan de yema

- A) Sin α amilasas.
- B) Con α amilasas.

Las mejoras antes mencionadas en el pan elaborado con α amilasas se deben a que las enzimas añadidas a la masa, potenciaron la ruptura o hidrólisis de los enlaces α 1,4 glucosídicos en la parte interna de las cadenas de amilosa y amilopectina del almidón, obteniendo como resultado azúcares más cortos y de bajo peso molecular, como subunidades de glucosa, maltosa y maltotriosa, que fueron más fácilmente asimilables y digeribles por *Saccharomyces cerevisiae* (levadura del pan), permitiendo el desarrollo adecuado del proceso de fermentación, el cual optimizó las características finales del pan (Mesas y Alegre, 2012, pp. 307-313; Amira et al, 2012).

Como lo indica Sahni y Goel (2015, pp. 19-25); *Saccharomyces cerevisiae* se encarga de convertir los azúcares fermentables: glucosa, maltosa y maltotriosa en CO_2 , etanol y algunos otros subproductos, para que se desarrolle correctamente el proceso de fermentación. La finalidad perseguida tras la fermentación del pan, es la producción de CO_2 , debido a que, en el momento de su retención en la superficie de la masa, permite que esta aumente su volumen (se esponje) mejore su textura externa crujiente e interna (miga más fina), maleabilidad y adquiera un buen sabor luego de la transformación química de los constituyentes de la harina con los demás ingredientes del pan (mantequilla, huevos, leche, levadura, sal y azúcar), esto explica las características obtenidas en el pan de yema elaborado con α amilasas

(Mahmood, Shahid, Nadeem, Irfan y Syed, 2016, pp. 101-109; Simair et al., 2017).

Degustación del pan sin y con α amilasas

Según la opinión del personal de trabajo de la panificadora Bocatta y de 50 personas del Centro Comercial Granados Plaza, al realizar la degustación del pan de yema: sin y con α amilasas, los resultados se aprecian en la Tabla 29.

Tabla 29.

Ficha técnica sobre la evaluación sensorial y degustación del pan de yema sin y con α amilasas.

EVALUACIÓN SENSORIAL Y DEGUSTACIÓN DEL PAN DE YEMA CON Y SIN α AMILASAS		
CARACTERÍSTICAS	Pan de yema con α amilasa	Pan de yema sin α amilasas
FASE VISUAL		
Corteza	Lisa (100%)	Lisa (100%)
Textura	Lisa (100%)	Lisa (80%)
Color	Café pronunciado (100%)	Café con amarillo (100 %)
Forma	Forma ovalada (100%)	Forma ovalada (100%)
Tipo de superficie	Lisa, sin aberturas y sin gránulos (100%)	Lisa, sin aberturas y sin gránulos (100%)
FASE TÁCTIL		
Humedad	No es un pan húmedo (80%)	No es un pan húmedo (85%)
Rugosidad	No es un pan rugoso (100%)	No es un pan rugoso (70%)
Elasticidad	Es un pan elástico (90%)	Es un pan elástico (39%)
Corteza crujiente	Es un pan de corteza crujiente (96%)	Es un pan de corteza crujiente (67%)
FASE OLFATIVA		
Aroma	Intenso (87%)	Poco intenso (96%)
Perfil aromático	Mantequilla, leche cocida (93%)	Mantequilla (80%)
FASE DE BOCA		
Firmeza	Muy firme (75%)	Poco firme (90%)
Friabilidad	Es friable (78%)	Es friable (47%)
Impresión de humedad	Es húmedo (94%)	Es húmedo (57%)
Solubilidad	Es soluble (61%)	Es soluble (41%)
Arenosidad	No es arenoso (100%)	No es arenoso (90%)
Adherente	No es adherente (90%)	No es adherente (86%)
Impresión global	Ácido (83%)	Salado (90%)
Sensaciones aromáticas	Leche cocida, mantequilla y queso fresco (79%)	Mantequilla y leche cocida (63%)
Sensación de sabor	Umami (97%)	Ácido (65%)
SENSACIONES TRIGEMINALES		
Retrogusto	Umami (97%)	Ácido (65%)
Persistencia	Es persistente (94%)	Es persistente (41%)
VALORACIÓN GLOBAL	Pan de sabor muy agradable (umami), aroma persistente de mantequilla y leche hervida, corteza crujiente y pasta chiclosa (umami) (83%)	Pan agradable con sabor ácido y suave (75%)

NOTA: El porcentaje (%) en la Tabla 29, se refiere al nivel aceptación o percepción que tienen la mayoría de personas encuestadas, con respecto a las características del pan de yema sin y con α amilasas.

El nivel de aceptación del público en cuanto a las características sensoriales: visuales, táctiles, de boca y trigeminales del pan de yema elaborado con α amilasas fue mucho mayor que la del pan que no contenía estas enzimas, como se puede observar en la Tabla 29. Algunas de las características sensoriales más mencionadas por el público con respecto al pan elaborado con α amilasas fue: la sensación de sabor que para la mayoría fue umami y persistente, otra característica de agrado fue la elasticidad de la masa interna y lo crujiente de la corteza, valorándolo como un pan de sabor muy agradable, con un aroma persistente, parecido al de la mantequilla y leche hervida. Como afirma BioZoom y Biokemisk Forenings (2013); las α amilasas incrementan y optimizan el proceso fermentativo para conseguir una estructura de miga fina, uniforme y un considerable aumento de volumen del pan luego del horneado, por ello se puede afirmar que las enzimas utilizadas para la elaboración del pan de yema fueron muy probablemente α amilasas.

BioZoom y Biokemisk Forenings (2013); también afirman que; las α amilasas hidrolizan las moléculas del almidón en mal estado, en dextrinas de cadena corta, permitiendo de esta forma el trabajo continuo de la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) durante la fermentación de la masa, por esto se cree que la textura de la masa obtenida era muy maleable y adquirió características organolépticas apetecibles por el público.

El pan de estructura de miga fina es más fácilmente metabolizado por el intestino humano, debido a que presenta una mayor cantidad de azúcares de cadena lineal, a diferencia del pan de estructura de miga porosa que presenta azúcares de cadena ramificada, por lo que el consumo del pan de yema con α amilasas mejoraría la digestión (Guerrera, 2012; Ramasamy, Benazir, Santhy y Laskmi, 2011).

Según Polizeli y Rai (2016, pp. 98-108); los azúcares como la maltosa y glucosa son producidos por las α amilasas y cumplen la función de optimizar las reacciones de Millard, encargadas de proveer el sabor característico del

pan horneado y el color dorado de la corteza. Las enzimas α amilasas son las responsables de obtener este tipo de azúcares lo que demuestra que si se trataría de las mismas ya que el pan de yema presentó un sabor umami y el color dorado de la corteza en menor tiempo.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones

El presente estudio reveló el potencial de la fuente de nitrógeno: 2 g L⁻¹ de extracto de levadura y activador CaCl₂ 6,36 mM, sobre la optimización de las condiciones de producción de biomasa y actividad enzimática de las α amilasas a partir de la fermentación submersa de *Aspergillus niger* van Tieghem (ATCC® 6275).

Las α amilasas pueden ser purificadas por técnicas sencillas como ultrafiltración y precipitación con (NH₄)₂SO₄, el empleo de dichas técnicas mejoró la concentración de biomasa, actividad enzimática y rendimiento celular $Y_{X/S}$ de la enzima.

El mejor aislamiento del hongo *Aspergillus niger* van Tieghem (ATCC® 6275™) se obtuvo a partir de la dilución 1/100000.

El hongo *Aspergillus niger* van Tieghem (ATCC® 6275™) aislado a partir de la dilución 1/100000 tuvo una prueba positiva para la degradación del almidón.

El mejor resultado de viabilidad celular del hongo se obtuvo a partir de su criopreservación en SDB con glicerol al 50% y a -80 °C.

El pan de yema elaborado con α amilasas mediante la encuesta que se aplicó tuvo un nivel de aceptación del 93% por el público, lo que permite identificar que dichas enzimas mejoran las características organolépticas de este producto.

6.2 Recomendaciones

Se podría realizar otro estudio para obtener α amilasas de otras especies de *Aspergillus* y determinar la mejor especie para producir este tipo de enzimas.

Se recomienda realizar un estudio donde se pueda variar otros parámetros como la fuente de carbono, el pH, temperatura y velocidad de agitación para ver si se logra obtener una mayor producción de biomasa y actividad enzimática.

Se recomienda utilizar técnicas de purificación más sofisticadas como cromatografía de intercambio iónico o cromatografía de filtración en gel y determinar el peso exacto de la proteína.

Para tener resultados más precisos, se puede utilizar más técnicas moleculares como por ejemplo Western Blot y de igual manera determinar el peso de la proteína y adicionalmente secuenciar los resultados obtenidos y determinar mediante su genoma la familia exacta de amilasas a la que pertenece.

REFERENCIAS

- Acevedo, D., Granados, C., y Guerrero, E. (2014). Cinética Enzimática del Bagazo de Caña para la Producción de Glucosa Utilizando la Enzima *Trichoderma longibrachiatum*. *La Serena, Chile: Scielo. Inf. tecnol. vol.25 no.5*. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642014000500010>
- Acumedia. (2014). *Sabouraud dextrose agar with chloramphenicol (7306)*. México: PI 7306, Rev 5. Recuperado el 17 de Abril de 2017 de http://foodsafety.neogen.com/pdf/acumedia_pi/7306_pi.pdf
- Amira, E., Abou, M., Ahmed, E., y Noha, O. (2012). *Starch and Microbial α -Amylases: From Concepts to Biotechnological Applications*. INTECH: chapter 21. DOI: 10.5772/51571
- Annamalai, N., Thavasi, R., Vijayalakshmi, S., y Balasubramanian, T. (2011). *Extraction, Purification, and Characterization of Thermostable, Alkaline Tolerant α -Amylase from Bacillus cereus*. India: J Microbiol V. 51(4), pp. 224-429. DOI: 10.1007/s12088-011-0160-z.
- Aryal, S. (2015). *Sabouraud Dextrose Agar (SDA) – Composition*. Principle, Uses, Preparation and Colony Morphology. Microbiology Notes. Recuperado el 17 de Abril de 2017 de <https://microbeonline.com/sabouraud-dextrose-agar-sda-principle-composition-uses-colony-morphology/>
- Asare†, E., Jaiswal†, S., Maley§, J., Bąga†, M., Sammynaiken§, R., Rosnagel‡, B., y Chibbar*†, R. (2011). *Barley Grain Constituents, Starch Composition, and Structure Affect Starch In vitro Enzymatic Hydrolysis*. Saskatchewan, Canada: J. Agric. Food Chem., 59 (9), pp. 4743–4754. DOI: 10.1021/jf200054e.

- ATCC. (2011). *Preservation and recovery of filamentous fungi*. USA: The Essentials of Life Science Research Globally Delivered™. Tech Bulletin No. 2. Recuperado el 20 de Mayo de 2017 de <https://www.atcc.org/~media/PDFs/Technical%20Bulletins/tb02.ashx>
- Bai, H., Wang, H., Sun, J., Irfan, M., Han, M., Huang, Y., Han, X., y Yang, Q. (2013). *Production, purification and characterization of novel beta glucosidase from newly isolated Penicillium simplicissimum H-11 in submerged fermentation*. China: NCBI. EXCLI J. 12, pp. 528–540. Recuperado el 21 de Mayo de 2017 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4657531/>
- Bernabé, C. (2013). Influencia de los componentes de la harina en la panificación. INDESPAN SL. PANORAMA PANADERO, pp. 2-3. Recuperado el 28 de Mayo de 2017 de <http://www.indespan.com/userfiles/file/Microsoft%20Word%20-%20ARTICULO%20PANORAMA%20PANADERO-ALMIDON.pdf>
- BioZoom y Biokemisk Forenings. (2014). *Enzyme applications in baking*. Danish Society for Biochemistry and Molecular Biology. Recuperado el 2 de Junio de 2017 de <http://www.biokemi.org/biozoom/issues/516/articles/2309>
- Boatella, J., Condoy R., y López, P. (2012). *Química y Bioquímica de Alimentos II*. Edicions Universitat Barcelona, p. 90-100 Recuperado el 2 de Enero de 2017 de <http://www.publicacions.ub.edu/ficha.aspx?cod=06244>
- Brayer, G., Luo, Y., y Withers, S. (2011). *The structure of human pancreatic alpha-amylase at 1.8 Å resolution and comparisons with related enzymes*. PMC; NCBI, p. 1731. DOI: 10.1002/pro.5560040908

- Caballero, P., Gómez, M., y Roseli, C. (2012). *Improvement of dough rheology, bread quality and bread shelf-life by enzymes combination*. Madrid, España: Science-Direct. Journal of Food Engineering. Volume 81, Issue 1. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.10.007>
- Cărăban, A., Vasilica, P., Eugen M., y Sanda, F. (2012). *Spectrophotometric studies about amylase activity in starch hydrolysis reaction*. Hungary, Rumania: HURO
- Castro, A, Pereira, M., Fernandes, D., Guimaraes, D., y Reis, L. (2011). *Multiresponse Optimization of Inoculum Conditions for the Production of Amylases and Proteases by Aspergillus awamori in Solid-State Fermentation of Babassu Cake*. Rio de Janeiro, RJ, Brazil: Enzyme Research: Volume II, pp. 2-5. <http://dx.doi.org/10.4061/2011/457392>
- Cauvin, S. (2015). *Technology of Breadmaking*. Australia: Third Edition. Springer, pp. 77-84. Recuperado el 11 de Febrero de 2017 de <http://www.springer.com/gp/book/9783319146867>
- Chaplin, M. (2014). *Preparation of enzymes from clarified solution*. Enzyme Technology. ISBN 0 52134884 6
- Ching, Y., Ying, P., y Gen, H. (2012). *Ultrafiltration in Food Processing Industry: Review on Application, Membrane Fouling, and Fouling Control*. Bangi, Malaysia: Food and Bioprocess Technology, Volume 5, Issue 4, pp. 1143–1156. DOI: 10.1007/s11947-012-0806-9.
- Codina, G., Gutt, S., Gutt, G., y Mironeasa, S. (2011). *Alveograph as a rheological tool to predict the quality characteristics of wheat flour*. Viena, Austria: Annals of DAAAM & Proceedings of the 22nd International DAAAM Symposium, Volume 22, No. 1. DOI: 10.3923/jas.2010.2478.2490

- Colin, V., Baigorí, M., y Perez, L. (2013). *Tailoring fungal morphology of Aspergillus niger MYA 135 by altering the hyphal morphology and the conidia adhesion capacity: biotechnological applications*. Tucumán, Argentina: NCBI. *AMB Express*, pp. 3-27. DOI: 10.1186/2191-0855-3-27
- Colla, L., Lazzarotto, A., Benedetti, S., Loss, R., Lima, M., Oliveira, C., Bertolin, T., y Vieira, J. (2016). *Surface response methodology for the optimization of lipase production under submerged fermentation by filamentous fungi*. Passo Fundo, RS, Brazil. NCBI: *Braz J Microbiol*; 47(2), pp. 461–467. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.01.028>
- Cortez, E., Pulido, A. y Vásquez, M. (2011). *Tipos de harina*. UNCP
- Cunhaa, F., Esperança, M., Zangirolamia, T., Badinoa, A., Farinasb, C. (2012). *Sequential solid-state and submerged cultivation of Aspergillus niger on sugarcane bagasse for the production of cellulose*. ScienceDirect. *Bioresource Technology* Volume 112, pp. 270–274. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.082>
- Dehkordi, M y Javan, F. (2012). *Application of alpha-amylase in biotechnology*. Iran: *International Biomedical Journal*; Volume 1, Issue 1, pp. 15-20. DOI: 10.1590/S1517-83822010000400004
- Dumont, F., Marechal, P., y Gervais, P. (2014). *Involvement of Two Specific Causes of Cell Mortality in Freeze-Thaw Cycles with Freezing to -196°C*. NCBI; *Appl Environ Microbiol*. DOI: 10.1128/AEM.72.2.1330-1335.2006
- El-Hadia, A., El-Nourb, S., Hammadb, A., Kamelc, Z., y Anwarb, M. (2014). *Optimization of cultural and nutritional conditions for carboxymethylcellulase production by Aspergillus hortai*. Cairo, Egypt: ScienceDirect. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*. Volume 7, Issue 1, pp 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2013.11.003>

- Encyclopedia of Life. (2015). *Aspergillus niger*. USA. Recuperado el 14 de Marzo de 2017 de <http://eol.org/pages/16436/details>
- Espinel, E y López, E. (2011). *Purificación y caracterización de α -amilasa de *Penicillium commune* producida mediante fermentación en fase sólida*. Rev. colomb. quim., Volumen 38, Número 2, pp. 204 -208.
- Fadilah, R., Rochmadi, S., Syamsiah, N., y Haryadi, F. (2015). *Hydrolysis of starch in porang flour using alpha amylase*. Indonesia: Journal of Engineering Science and Technology, pp. 1-8. Recuperado el 24 de Marzo de <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84949646178&partnerID=40&md5=f1df49bb3ef9c99a64fbe96e1ecb3dc5>
- FAO. (2012). *Perspectivas por sectores principales: Producción de cultivos*. Recuperado el 14 de Mayo de 2017 de <http://www.fao.org/3/a-i4738s.pdf>
- FDA. (2015). *Microorganisms & Microbial-Derived Ingredients Used in Food (Partial List)*. United States: Food and Drug Administration. Recuperado el 28 de Enero de 2017 de <https://www.fda.gov/food/ingredientpackaginglabeling/gras/microorganismsmicrobialderivedingredients/default.htm>
- Ferrari, A., Gaber, Y., y Fraaije, M. (2014). *A fast, sensitive and easy colorimetric assay for chitinase and cellulase activity detection*. Groningen, The Netherlands: NCBI. Biotechnol Biofuels, pp. 7-14. DOI: 10.1186/1754-6834-7-37.
- Flores, A. (2013). El 90% de trigo que consume Ecuador es importado. INEN. Recuperado el 3 de Febrero de 2017 de <http://comunidad.todocomercioexterior.com.ec/profiles/blogs/el-90-de-trigo-que-consume-ecuador-es-importado>

- Flores. (2015). Guía para prácticas de laboratorio de Bioprocesos: determinación del rendimiento (Y_x/s), peso seco y curva de calibrado para medir la concentración de biomasa por turbidimetría. Quito, Ecuador: Facultad de Ingeniería y Ciencias Agropecuarias de la UDLA, pp. 5-11
- Floros, J., Newsome, R., Fisher, W., Barbosa, G., Chen, H., Dunne, P., J., German, B., Hall, R., Heldman, D., Stephen, M., Theodore., K., Daryl, L., Newell, M., Robinson, J., Sebranek, J., Shewfelt, R., Tracy, W., Weaver, C., y Ziegler, G. (2011). *Feeding the World Today and Tomorrow: The Importance of Food Science and Technology*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety Vol. 0. DOI: 10.1111/j.1541-4337.2010.00127
- Freer, N. (2011). *Purification and characterization of the extracellular alpha-amylase from Streptococcus bovis JB1*. Applied and Environmental Microbiology
- García, A., y Pacheco, E. (2011). *Evaluación de galletas dulces tipo wafer a base de harina de arracacha (Arracacia xanthorrhiza B.)*. Medellín, Colombia: Rev. Fac. Nal. Agr. Vol.60 no.2
- Gil, A., y Ruiz, M. (2013). *Tratado de Nutrición. Tomo II: Composición y Calidad Nutritiva de los Alimentos*. Madrid, España: Segunda Edición Médica Panamericana D.L.
- Guerrero J. (2012). *Las enzimas en la panificación*. Tatipastry. Recuperado el 17 de Febrero de 2017 de <http://tatipastry.blogspot.com/2012/05/las-enzimas-en-la-panificacion.html>

- Gulati, H., Chadha, B., y Saini, H. (2013). *Production of feed enzymes (phytase and plant cell wall hydrolyzing enzymes) by Mucor indicus MTCC 6333: purification and characterization of phytase*. USA: NCBI; National Library of Medicine National Institutes of Health, p. 91.
<http://dx.doi.org/10.5402/2013/394305>
- Gupta, V. (2016). *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Aspergillus System Properties and Applications*. Amsterdam, Netherlands: Editorial: ELSEVIER, p. 87
- Gurung, N., Ray, S., Bose, S., y Rai, V. (2013). *A Broader View: Microbial Enzymes and Their Relevance in Industries, Medicine, and Beyond*. Bengal, India: BioMed Research International Volume 2. doi: 10.1155/2013/32912
- Gusakov, A., Kondratyeva, E., y Sinitsyn, A. (2011). *Comparison of Two Methods for Assaying Reducing Sugars in the Determination of Carbohydrase Activities*. Rusia, Moscow: International Journal of Analytical Chemistry, pp. 1-4. <http://dx.doi.org/10.1155/2011/283658>
- Hachmann, A., y Maffezzoli, D. (2016). *Human Salivary Amylase*. Biomolecules at Kenyon. Recuperado el 19 de Febrero de 2017 de <http://biology.kenyon.edu/BMB/jsmol2015/3BLKAmylase/index4.html>
- Hakobyana, L., Gabrielyana, L., y Trchouniana, A. (2012). *Yeast extract as an effective nitrogen source stimulating cell growth and enhancing hydrogen photoproduction by Rhodobacter sphaeroides strains from mineral springs*. Yerevan, Armenia: ScienceDirect. International Journal of Hydrogen Energy. Volume 37, Issue 8, pp. 6519–6526. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.01.077>

- Henao, I., Correa M., y Marín, G. (2013). Evaluación de métodos de conservación para *Aspergillus niger* con actividad enzimática amilolítica. Bogotá, Colombia: Revista de la Facultad de Ciencias Vol. 11, N° 2, pp. 51-60.
- Hernández, G., y Majem, S. (2011). *Libro Blanco del Pan*. Madrid, España: Editorial Médica Panamericana
- Hernández, M., y Sastre, A. (2011). *Tratado de Nutrición*. Madrid, España: Ediciones Diaz de Santos, S. A., p. 406
- Hewa, H., Hakki, A., Hero, I., y Goceri, A. (2014). *The Effect of Some Sugars on the Growth of Aspergillus niger*. Turkey: KSU J. Nat. Sci., 17(4), pp. 7-10. DOI: 10.18016/ksujns.28479
- HIMEDIA. (2015). *Technical Data: Starch Agar*. HiMedia Laboratories M107S. Recuperado el 4 de Marzo de 2017 de <http://himedialabs.com/TD/M107S.pdf>
- Hina, A., Saleem, S., y Syeda, O. (2013). *Morphological identification of Aspergillus species from the soil of larkana district (Sindh, Pakistan)*. Karachi, Pakistan: J Agri Biol, 1(3), pp. 105-107.
- INEC. (2010). *Industria de alimentos y bebidas en el Ecuador*. Instituto Nacional de Estadísticas y Censos
- INEC. (2011). *Índice de precios al consumidor (IPC)-Comprobación del cálculo IPC por nacional por parte del usuario*. Instituto Nacional de Estadísticas y Censos
- INEC. (2012). *Industria de alimentos y bebidas en el Ecuador*. Instituto Nacional de Estadísticas y Censos

- INEC. (2012). *Info-Economía-Análisis Sectoriales*. Instituto Nacional de Estadísticas y Censos
- INSHT. (2012). *Aspergillus niger*. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. DATABIO
- Izmirlioglu, G., y Demirci, A. (2015). *Strain selection and medium optimization for glucoamylase production from industrial potato waste by Aspergillus niger*. Science of Food and Agriculture. DOI: 10.1002/jsfa.7445
- Jaramillo, J., y Padilla, L. (2012). *El costo de la harina es un 13% más alto, lo que no justifica la desaparición del pan de 12 centavos*. Agencia Pública de Noticias del Ecuador y Sudamérica. Recuperado el 11 de Junio de 2017 de <http://www.andes.info.ec/es/econom%C3%ADa-reportajes/5948.html>
- Jia, J., Yang, X., Wu, Z., Zhang, Q, Lin, Z., Guo, H., Lin, C., Wang, J., y Wang, Y. (2015). *Optimization of Fermentation Medium for Extracellular Lipase Production from Aspergillus niger Using Response Surface Methodology*. Biomed Res Int. NCBI. A Comparative Study of New Aspergillus Strains for Proteolytic Enzymes Production by Solid State Fermentation. Enzyme Res. NCBI. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/497462>
- Karnchanatat, U., Petsom A., Sangvanich, P., Piaphukiew, J., Whalley, A., Reynolds, C., y Sihanonth, P. (2011). *Purification and biochemical characterization of an extracellular beta-glucosidase from the wood-decaying fungus Daldinia eschscholzii (Ehrenb.: Fr.) Rehm*. USA: NCBI; National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2007.00662

- Khan, J., y Yadav, S. (2011). *Production of alpha amylases by aspergillus niger using cheaper substrates employing solid state fermentation*. India: International Journal of Plant Animal and Environmental Sciences. Volume-1, Issue-3.
- Kriaa, M., y Kammoun, R. (2016), *Producing Aspergillus tubingensis CTM507 Glucose oxidase by Solid state fermentation versus submerged fermentation: process optimization and enzyme stability by an intermediary metabolite in relation with diauxic growth*. India: J. Chem. Technol. Biotechnol. p. 91. DOI: 10.1002/jctb.4753
- Kunamneni, A., Santhosh, K., y Singh, S. (2013). *Response surface methodological approach to optimize the nutritional parameters for enhanced production of α -amylase in solid state fermentation by Thermomyces lanuginosus*. Durba, South Africa: Journal of Biotechnology Vol. 4 (7), pp. 708-716. DOI: 10.5897/AJB2005.000-3138
- K Kurokawa, Y., Maekawa, A., Takahashi, M., y Hayashi, Y. (1990). *Toxicity and carcinogenicity of potassium bromate--a new renal carcinogen*. *Environmental Health Perspectives*, pp. 87, 309–335. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2269236>
- Layango, H., Valverde, k. y Mayaute, Y. (2015). *Evaluación de la goma de tara (Caesalpinia spinosa) como retenedor de humedad en una premezcla para pan de molde*. Callao, Perú: Editorial Área de Innovación y Desarrollo, S.L., pp. 25-26
- Levapan. (2016). *Mejorador puratos*. Bogotá, Colombia: CEDI-Levapan S.A.
- Mahmood, S., Shahid, M., Nadeem, M., Irfan, M., Syed, Q. (2016). *Production and optimization of α -amylase from aspergillus niger using potato peel as substrate*. *Pak. J. Biotechnol.* Vol. 13 (2), pp. 101-109. <https://doi.org/10.1016/j.aoas.2015.06.001>

- Mancebo, C., Merino, C., Martínez, M. y Gómez, M (2015). *Mixture design of rice flour, maize starch and wheat starch for optimization of gluten free bread quality*. Valencia, Spain: J Food Sci Technol, pp. 6323–6333. DOI: 10.1007/s13197-015-1769-4
- ManthiriKani, U., y Kumar, G. (2011). *Submerged fermentation of amylase enzyme by aspergillus flavus using cocos nucifera meal*. Kathmandu University Journal of Science, Engineering and Technology. Vol. 6, No. II, pp. 75-87
- Mathew, A., Oksman, K., Thomas, S., Habibi, Y., y Lucian, L. (2014). *Starch-based bionanocomposites: processing and properties polysaccharide building blocks: A Sustainable Approach to the Development of Renewable Biomaterials*. First Edition. Luxembourg: ResearchGate.
- Mathew, J., Vazhacharickal, P., Sajeshkumar, N y Ashokan, A. (2016). *Amylase production by Aspergillus niger through submerged fermentation using starchy food byproducts as substrate*. India: International Journal of Herbal Medicine 4(6), pp. 34-40
- Mesas, J., y Alegre, M. (2013). *El pan y su proceso de elaboración*. Cienc. Technol. Aliment. Vol. 3, No. 5, pp. 307-313
- Microbiologics. (2011). *Recommended growth requirements: Lyfo disc and kiwk - stick – microorganisms; Method 5*. USA: LIT. 014 Revision AUG. 01. Retail Catalog: 39th Edition, pp. 5-6. DOI: 10.1111/jam.12968
- Mohan, P., Kumar, P., y Sarathi, O., (2015). *Optimization of media and submerged fermentation conditions using central composite design for increased endoglucanase production by Cladosporium sp. NCIM 901*. India: Research Article [Araştırma Makalesi], pp. 385-393. DOI: 10.5505/tjod.2013.39200

- Mojsov, K. (2012). *Microbial alpha-amylases and their industrial applications*. Macedonia: International Journal of Management, Tt and Engineering. Volume 2. Issue 10. Recuperado de <http://eprints.ugd.edu.mk/id/eprint/1592>
- Monteiro, P., y Oliveira, P. (2012). *Application of microbial α -amylase in industry – A review*. Brazil: NCBI. Braz J Microbiol, pp. 850–861. DOI: 10.1590/S1517-83822010000400004
- Moreno, J., Moral, R., García, J., Pascual, J., y Bernal, M. (2014). *De Residuos a Recursos –El camino hacia la sostenibilidad*. México: Ediciones Mundi-Prensa, p. 209. Recuperado el 27 de Junio de 20187 de <https://www.casadellibro.com/libro-de-residuo-a-recurso-el-camino-hacia-la-sostenibilidad-iii-5-vermicompostaje-procesos-productos-y-aplicaciones/9788484766933/2405336>
- Mrudula, S., y Murugammal, R. (2011). *Production of cellulose by Aspergillus niger under submerged and solid state fermentation using coir waste as a substrate*. Braz J Microbiol; 42(3), pp. 1119–1127. DOI: 10.1590/S1517-838220110003000033
- Muñoz, A., y Vega, J. (2014). *Determinación de azúcares reductores por espectrofotometría (Método DNS)*. Nuevo Chimbote, Perú: Facultad de Ingeniería. Escuela Académico Profesional de Ingeniería Agroindustrial, p. 2.
- Noorfarahzilah, M., Lee, J., Sharifudin, M., Mohd, A. y Hasmadi, M. (2014). *Applications of composite flour in development of food products*. Malaysia: International Food Research Journal 21(6), pp. 2061-2074.
- Normahomed, I. (2011). *Tipos y tecnología de la panificación*. Cuarta Edición de Sabadell Universitat

Ochoa, S. (2012). *Precipitation*. México: UNAM

Ogbonna, A., Onyimba, I., Chuku, A., Nwadiaro, P., Ogbonna, C., y Onwuliri, F. (2015). *Growth assessment and amylase production by Aspergillus niger and A. terreus isolated from soils of Artemisia annua l. Plantation*. Nigeria: European Journal of Biotechnology and Bioscience 3 (1), pp. 10-16. DOI: 20052013-T

Oladunmoye, O., Akinoso, R., y Olapade, A. (2011). *Evaluation of some physical-chemical properties of wheat, cassava, maize and cowpea flours for bread making*. Journal of Food Quality. Volume 33, Issue 6. International Journal of Food Science-Technology. DOI: 10.1111/j.1745-4557.2010.00351

Orozco, C., Albarrán, G., Esteban, R y García, S. (2011). *Ultrafiltración de Caldos de Fermentación*. México: ResearchGate. Recuperado el 14 de Enero de 2017 de https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/38245/CIBIA%209_CONGR ESO%20IBEROAMERICANO%20DE%20INGENIER%20C3%8DA%20DE %20ALIMENTOS_LIBRO%20DE%20RES%20C3%9AMENES.pdf?sequence=5

Ortega, R., López, A., y Carvajales, P. (2016). *El pan, alimento básico de nuestra dieta*.

Ortiz, G., Nosedá, D., Ponce, M., Recupero, M., Blasco, M., y Albertó, E. (2016). *A Comparative Study of New Aspergillus Strains for Proteolytic Enzymes Production by Solid State Fermentation*. Buenos Aires, Argentina: NCBI; Enzyme Research. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/3016149>

- Passamani, F., Hernandez T., Lopes, N., Bastos, S., Santiago, W., Cardoso, M., y Batista, L. (2014). *Effect of temperature, water activity, and pH on growth and production of ochratoxin A by Aspergillus niger and Aspergillus carbonarius from Brazilian grapes*. USA: NCBI. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-13-495
- Peña, R. (2011). *Wheat for bread and other foods*. Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAO
- Peng, H., Zheng, Y., Chen, M., Wang, Y., Xiao, Y., y Gao, Y. (2014). *A starch-binding domain identified in α -amylase (AmyP) represents a new family of carbohydrate-binding modules that contribute to enzymatic hydrolysis of soluble starch*. China: ScienceDirect. FEBS Letters Volume 588, Issue 7, pp. 1161–1167. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.02.050>
- PENTAIR. (2013). *Guía de aplicaciones de ultrafiltración freshpoint*. Filtración y Procesos de purificación
- Pérez, C. (2016). *Harinas. Materias Primas y Procesos en Panadería, Pastelería y Repostería*. Recuperado el 20 de Mayo de 2017 de https://ivac-eei.eus/upload/cf/documentos/91/ina_t_pan_rep_con_ud_0024_c.pdf
- Perkins, D. (2015). *How to preserve stocks*. Post. McC, DDP revision. Recuperado el 26 de Junio de 2017 de <http://www.pdf-pages.com/d/PRESERVATION-OF-PRESSURE-VESSELS-AND.pdf>
- Polizeli, M., and Rai, M. (2016). *Fungal enzymes*. Brazil: Editorial CRC PRESS; A Science Publishers Book, pp. 98-108

- Racheal, O., Ahmed, A., Ndigwe, E., y Morakinyo, S. (2015). *Extraction, purification and characterization of protease from Aspergillus Niger isolated from yam peels*. Nigeria: International Journal of Nutrition and Food Sciences, pp. 126-131. doi: 10.11648/j.ijnfs.20150402.11
- Ramasamy, S., Benazir, F., Santhy, R., y Laskmi, M. (2011). *Amylase production by Aspergillus Niger under solid state fermentation using agroindustrial wastes*. ResearchGate.
- Raul, D., Biswas, T., Mukhopadhyay, S., Kumar, S., y Gupta, S. (2014). *Production and Partial Purification of Alpha Amylase from Bacillus subtilis (MTCC 121) Using Solid State Fermentation*. India: Biochemistry Research International. Volume 2014, Article ID 568141, pp. 1-15. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/568141>
- Reynolds, M., Pask, A., Multan, D., Mullan, D., y Chávez, P. (2012). *Fitomejoramiento fisiológico I: Enfoques Interdisciplinarios para Mejorar la Adaptación del Cultivo*. México: Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo –CIMMYT.
- Robinson, P. (2015). *Enzymes: principles and biotechnological applications*. UK (Reino Unido): NCBI; Essays Biochem, pp. 1–41
- Rodríguez, D., Paradab, J., Medeiros, A., Carvalho, J., Lacerdab, L., Rodríguez, J., y Soccol, C. (2013). *Concentration by ultrafiltration and stabilization of phytase produced by solid-state fermentation*. Curitiba, Brazil: ScienceDirect; Process Biochemistry. Volume 48, Issue 2, pp. 374–379. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.12.021>

- Rodríguez, D., Rodríguez, J., Carvalho, J., Sturma, W., y Soccola, C. (2011). *The behavior of kinetic parameters in production of pectinase and xylanase by solid-state fermentation*. Curitiba, PR, Brazil: Bioresource Technology Volume 102, Issue 22, pp. 10657–10662. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.08.106>
- Rodríguez, G. (2014). Determinación de azúcares reductores por espectrofotometría (método DNS). Universidad Nacional del Santa, p. 3
- Ronquillo, H. (2012). *Estudio del efecto de la adición de la enzima alfa amilasa en un pan tipo muffin, elaborado con diferentes tipos de harina de trigo*. Universidad Técnica de Ambato- UTA. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos
- Sahni, T., and Goe, A. (2015). *Microbial enzymes with special reference to α -amylase*. BioEvolution Vol 2 (1), ISBN [978-93-83006-04-5], pp. 19-25. doi: 10.3390/biom3030597
- Sánchez, L., y Corrales, L. (2010). Evaluación de la congelación para conservación de especies autóctonas bacterianas. Cundinamarca: NOVA - Publicación Científica ISSN:1794-2470 VOL.3, pp. 1-116
- Saranraj, P., and Stella, D. (2013). *Fungal Amylase*. International Journal of Microbiological Research 4 (2), pp. 204-205
- Sariyska, M., Gargova, S., Koleva, L., Angelov, A. (2012). *Aspergillus niger phytase: purification and characterization*. Bulgaria: Biotechnol. & Biotechnol. Eq

- Shamala, T., Vijayendra, S., y Joshi, G. (2012). *Agro-industrial residues and starch for growth and co-production of polyhydroxyalkanoate copolymer and α -amylase by Bacillus sp. CFR-67*. Braz J Microbiol. NCBI. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822012000300036>
- Shihui W., Chaoyang, L., Yun, L., Zhicheng, S., Jenasia, J., y Wensheng, Q. (2016). *Characterization of a starch-hydrolyzing α -amylase produced by Aspergillus niger WLB42 mutated by ethyl methanesulfonate treatment*. Int J Biochem Mol Biol; 7(1), pp. 1–10. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822012000300036>
- Silva, D., Batista, L., Rezende, E., Fungaro, M., Sartori, D., y Alves, E. (2011). *Identification of fungi of the genus Aspergillus section nigri using polyphasic taxonomy*. Brazil: Brazilian Journal of Microbiology 42, pp. 762-766. doi: 10.1590/S1517-838220110002000044
- Simair, A., Qureshi, A., Khushk, I., Ali, C., Lashari, S., Bhutto, M., Mangrio, G., 2 y Lu, C. (2017). *Production and Partial Characterization of α -Amylase Enzyme from Bacillus sp. BCC 01-50 and Potential Applications*. China: NCBI. Biomed Res Int. doi: 10.1155/2017/9173040
- Singh, S., Singh, R., Bali, V., Sharma, L., y Mangla, J. (2014). *Production of Fungal Amylases Using Cheap, Readily Available Agriresidues, for Potential Application in Textile Industry*. Punjab, India: Biomed Res Int. NCBI. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/215748>
- Sivaramakrishnan, S., Gangadharan, D., Madhavan, K., Soccol, C., and Pandey, A. (2013). *α -Amylases from Microbial Sources*. Food Technol. Biotechnol. 44 (2), pp. 173–184.

- Soares, I., Távora, Z., Barcelos, R., y Baroni, S. (2012). *Microorganism-Produced Enzymes in the Food Industry*. Bahia Reconcavo, Brazil: Scientific, Health and Social Aspects of the Food Industry. Editorial INTECH, pp. 86-107. DOI: 10.5772/31256
- Sridevi, A., Sandhya, A., Ramanjaneyulu, G., Narasimha, G., y Suvarnalatha, P. (2016). *Biocatalytic activity of Aspergillus niger xylanase in paper pulp biobleaching*. Tirupati, India: NCBI. 3 Biotech. 6(2), pp. 140-165. DOI: 10.1007/s13205-016-0480-0
- Soarez, D., y Manríquez, R. (2014). *Chapter 3: Isolation, screening, morphological and biochemical characterization of fungal isolates*. Microbiology and Biochemistry. DOI: 10.13140/RG.2.1.3081.3921
- Suganthi, R., Benazir, J., Santhi, R., Ramesh, V., Anjana, H., Meenakshi, N., Nidhiya, K., Kavitha, G., y Lakshmi, R. (2011). *Amylase production by Aspergillus niger under solid state fermentation using agroindustrial wastes*. International Journal of Engineering Science and Technology (IJEST). Vol. 3 No. 2.
- Suleimenova, Z., Akhmetsadykov, N, Kalieva, A., Mustafin, K., y Saduyeva, Z. (2016). *Effect of Different Cultural Conditions for Phytase Production by Aspergillus niger in Submerged Fermentation*. Kazakhstan: Scientific Research. Advances in Enzyme Research Vol.04 No.02, Article ID:67189, pp. 1-6. DOI: 10.1007/s10295-008-0402-1
- Sundar, R., Rajila. L., y Suganyadevi, P. (2012). *Amylase production by Aspergillus niger under submerged fermentation using ipomoea batatas*. Tamilnadu, India: International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology, p. 176. DOI: 10.1590/S1517-838220110003000033

- Sudarram, M., y Krishna, M. (2013). *A solid state fungal fermentation-based strategy for the hydrolysis of wheat straw*. United Kingdom: Bioresour Technol, pp. 261–267. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.09.061
- Sundarram, A., y Thirupathihalli, K. (2014). *α -Amylase Production and Applications*. Bangalore, India: Journal of Applied & Environmental Microbiology. Volume 2. Issue 4. DOI: 10.12691/jaem-2-4-10
- Tiwari, S., Srivastava, R., Singh, C., Shukla, K., Singh, R., Singh, P., Singh, R., Sight, N., y Sharma, R. (2015). *Amylases: an overview with especial reference to alpha amylase*. Varanasi, India: Journal of Global Biosciences. Vol. 4, S11, pp. 1886-1901
- UNAM. (2012). *Método de dilución y siembra por vertido en placa*. Departamento de Biología, p. 81
- UNQ. (2015). TP2: *Extracción y cuantificación de proteínas*. Introducción a la Biología Celular y Molecular, p. 2. Recuperado el 3 de Mayo de 2017
- Valverde, M. (2013). *Valor nutricional del pan integral frente al pan blanco*. Revista Digital de Gastronomía Mediterránea. Recuperado el 4 de Junio de 2017 de http://www.sabormediterraneo.com/salud/pan_nutr.html
- Varalakshmi K, Kumudini B, Nandini B, Solomon J, Suhas R, Mahesh B., y Kavitha A. (2011). *Production and characterization of alpha-amylase from Aspergillus niger JGI 24 isolated in Bangalore*. Pol J Microbiol. NCBI, pp. 29-36.
- Vargas, C. (2014). *Diluciones seriadas para la obtención de un cultivo axénico* *Microbiología*. Ingeniería Bioquímica


- Vega, G. (2011). *Proteínas de la harina de trigo: clasificación y propiedades funcionales*. Temas de Ciencia y Tecnología Vol 13; Número 38. Universidad Tecnológica de la Mixteca
- Villanueva, P. (2015). *El trigo es una monocotiledónea, del orden de las glumíferas, familia graminácea, género triticum y especie triticum durum*. Materias Primas
- Wang, S., Lin, C., Liu, Y., Shen, Z., Jeyaseelan, J., y Qin, W. (2016). *Characterization of a starch hydrolyzation α -amylase produced by *Aspergillus niger* WLB42 mutated by treatment with ethyl methanesulfonate*. Canadá: NCBI. Int J Biochem Mol Biol, 7 (1), pp. 1-10. DOI: 10.1007/s00253-014-6186-5
- Wianecki, M., y Kołakowski, E. (2011). *Gelatinization parameters of starch and some cereal products, as determined thermomechanically from torque measurements*, Electronic Journal of Polish Agricultural Universities. Volumen 10. Issue 4; Food Science and Technology. Recuperado de <http://www.ejpau.media.pl/volume10/issue4/art-23.html>
- Wirtz, R., and Macwire, J. (2013). *Taste of Bread*. Canadá: Springer Science +Business Media, LLC, pp. 182-187.

ANEXOS

A continuación, se muestra el certificado e informe de análisis de la epidemiología molecular de la cepa *Aspergillus niger* van Tieghem (ATCC® 6275™), proporcionados por la empresa Microbiologics y avalados con su respectivo registro sanitario por MEDIBAC INC. S.A., distribuidor autorizado de Microbiologics en Ecuador.



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: <i>Aspergillus niger</i> Catalog Number: 0500 Lot Number: 500-25 Reference Number: ATCC® 6275™** Purity: < 0.1% Total Pellet CFU Recovery: > 100 CFUs per Pellet Passage from Reference: 4	Expiration Date: 2017/12/31 Release Information: Quality Control Technologist: Marie M Howe Release Date: 2016/1/29
Performance	
Macroscopic Features: Flat, fuzzy, "salt and pepper" appearance; reverse side is yellowish tan. Microscopic Features: Chains of small conidia which arise from short sterigmata arranged radially over the surface of the vesicle.	Medium: Nutrient Method: Lactophenol Blue (1)
ID System: MEI None See attached ID System results document.	
 Brad Goskowicz, President AUTHORIZED SIGNATURE	
<p><small>Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the packing slip is merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.</small></p> <p><small>Note for Vitabi: Although the Vitabi® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.</small></p> <p><small>⚠ Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.</small></p> <p><small>Individual products are traceable to a recognized culture collection.</small></p> <p><small>(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.</small></p> <div style="text-align: center;">  ACCREDITED TESTING CERT #2655.01 </div>	



Molecular Epidemiology, Inc.
Sample Analysis Report



F09/MB45009

Customer ID Number	4081-3201	Sample Received	01/18/2016	MEI Report #	R18011824230-01	Date Reported	01/28/2016
Customer Sample #	500-25	Sample Type	Agar plate	Job ID	97887-4081-3201		
Sample Source	N/A	Customer Comments	Aspergillus niger	Requested Service(s)	Phenotypic and Genetic Identification		
MEI Sample #	90141-1			Test Method(s)	MB450, MB457, MB473		
Test		Test Results					
Basic ID	Fungus	Colony	Black	Reverse	Cream		
Genetic ID				Notes:			
Comparisons to genetically similar microorganisms				Phenotypic data support <i>Aspergillus niger</i> .			
Genetic Distance	Genus	Species					
0.0031	Aspergillus	brasiliensis					
0.0031	Aspergillus	niger					
0.0031	Aspergillus	phoenicis					
0.0031	Aspergillus	tubingensis					
0.0060	Aspergillus	carbonatus					
0.0060	Aspergillus	ibericus					
0.0143	Aspergillus	aculeatus					
0.0167	Aspergillus	japonicus					
Deviations	None						
Microbial ID Conclusion	<i>Aspergillus niger</i>						
Microbiology Review	 Anthony Scott					Date: 01/28/2016	
Genetics Review	 Songhai Shen					Date: 01/28/2016	
QC Approval	 Connor Tyler					Date: 01/28/2016	
QA Approval	 Jonathan Collins					Date: 01/28/2016	
Reported By:	Gregory J. Ma, SM(JAAM), MSPH			Molecular Epidemiology, Inc.			
	Phone: 206-306-8882			15300 Bothell Way NE,			
	Fax: 206-306-8883			Lake Forest Park, WA 98155			
	e-Mail: gregory@molcularepi.com			www.molcularepi.com			

This laboratory report relates only to the portion of the sample which was tested in this report. Interpretation of these results is the sole responsibility of the Customer.

TRADE SECRET - CONTAINS CONFIDENTIAL COMMERCIAL INFORMATION

This document contains confidential commercial information pursuant to 5 U.S.C. sec. 552(b)(4). Copyright 2007 © by MEI

Receta para elaboración del pan de yema

Primero se pesó 250 g de harina de trigo, 20 g de azúcar, 5g de sal, 75 g de mantequilla, 75 g de yemas de huevos, 100 g de leche y 8 g de levadura. Luego en un recipiente se colocó primero los ingredientes líquidos (100 g de leche y 75 g de yemas de huevo), luego se agregó los 8 g de levadura (proveniente de *Saccharomyces cerevisiae*) y se batió durante 4 min. para activarla, como se muestra en la Figura 84. Posteriormente se agregó los ingredientes sólidos: 250 g de harina de trigo, 75 g de

mantequilla, 20 g de azúcar y los 5 g de sal y se batió todo en una batidora eléctrica durante 30 min., como se observa en las Figuras 85 y 86.



Figura 84. Mezcla de los ingredientes líquidos y activación de la levadura para la elaboración de pan de yema sin y con α amilasas.



Figura 85. Adición de los ingredientes sólidos para la elaboración de pan de yema sin y con α amilasas.



Figura 86. Batido de todos los ingredientes para la elaboración de pan de yema sin y con α amilasas.

Al terminar el batido, se colocó la masa obtenida en papel de cocina para evitar contaminación y se dejó en reposo durante 20 min.

Tabla 30.

Modelo de encuesta utilizada para la evaluación sensorial y degustación del pan de yema con y sin α amilasas.

EVALUACIÓN SENSORIAL Y DEGUSTACIÓN DEL PAN DE YEMA CON Y SIN α AMILASAS		
CARACTERÍSTICAS		
FASE VISUAL		
Corteza		
Textura		
Color		
Forma		
Tipo de superficie		
FASE TÁCTIL		
Humedad		
Rugosidad		
Elasticidad		
Corteza crujiente		
FASE OLFATIVA		
Aroma		
Perfil aromático		
FASE DE BOCA		
Firmeza		
Friabilidad		
Impresión de humedad		
Solubilidad		
Arenosidad		
Adherente		
Impresión global		
Sensaciones aromáticas		
Sensación de sabor		
SENSACIONES TRIGEMINALES		
Retrogusto		
Persistencia		
VALORACIÓN GLOBAL		

