

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA**

**FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**



**“HIDRÓLISIS QUÍMICA Y ENZIMÁTICA DE UN EXTRACTO DE  
YACÓN (*Smallanthus sonchifolius*) PARA LA OBTENCIÓN DE  
FRUCTOSA”**

Presentado por:

**ROCIO MILAGROS MENDOZA SANDOVAL**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE  
INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

Lima- Perú

2017

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA**

**FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

**“HIDRÓLISIS QUÍMICA Y ENZIMÁTICA DE UN EXTRACTO DE YACÓN  
(*Smallanthus sonchifolius*) PARA LA OBTENCIÓN DE FRUCTOSA”**

Presentado por:

**ROCIO MILAGROS MENDOZA SANDOVAL**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE  
INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

Sustentada y aprobada por el siguiente jurado:

---

**Carmen Velezmoro Sánchez  
PRESIDENTE**

---

**Bettit Salvá Ruiz  
MIEMBRO**

---

**Beatriz Hatta Sakoda  
MIEMBRO**

---

**David Campos Gutiérrez  
ASESOR**

---

**Rosana Chirinos Gallardo  
CO- ASESOR (A)**

**Lima- Perú**

**2017**

## DEDICATORIA

A mi mamá Isabel y a mi papá Pedro,  
por ser mis eternos maestros de vida  
y mi apoyo incondicional.

## AGRADECIMIENTOS

- A mis asesores Dr. David Campos y Dra. Rosana Chirinos, quienes depositaron en mí la confianza para poder ejercer este trabajo de investigación. Muchas gracias por su paciencia y dedicación.
- A mi consejera Dra. Ana Aguilar, por su gran apoyo y orientación necesarios para la culminación de este trabajo y a la profesora Indira Betalleluz, por la motivación y atención brindada a mi persona.
- Al Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad - Innóvate Perú, por el financiamiento para el desarrollo de la presente investigación como parte del proyecto "Optimización del Proceso de Extracción de los Fructooligosacáridos de Yacón (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. & Endl) y de su Purificación mediante Técnicas Cromatográficas y de Biotransformación Enzimática" (Contrato N° 142-FINCyT-IA-2013).
- A Adelaida Pardo, por compartir sus conocimientos y a mis compañeros del Instituto de Biotecnología: Edith, Fiorella, Carmen, Martín, Evelyn, Orlando, Kattya, Miluska y Karina; por su amistad y compañía.
- Al Vicerrectorado de Investigación por el financiamiento de la impresión y empastado del documento de tesis.
- A mis amigos de la biblioteca de tesis, el Señor Jesús y Mario, por su buena atención y apoyo brindado.

# TABLA DE CONTENIDO

## RESUMEN

### SUMMARY

<b>I.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	<b>3</b>
2.1.	YACÓN .....	3
2.1.1.	ASPECTOS GENERALES .....	3
2.1.2.	CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA .....	4
2.1.3.	PRODUCCIÓN NACIONAL DEL YACÓN .....	4
2.1.5.	FORMAS DE CONSUMO Y ALMACENAMIENTO DEL YACÓN .....	6
2.2.	FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS .....	8
2.3.	FRUCTOSA .....	10
2.4.	HIDRÓLISIS QUÍMICA .....	10
2.4.1.	MECANISMOS DE HIDRÓLISIS DE LOS PENTOSANOS .....	10
2.4.2.	HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA .....	12
2.5.	METODOLOGÍA SUPERFICIE RESPUESTA .....	17
2.5.1.	TERMINOLOGÍA .....	19
2.5.2.	ETAPAS DE OPTIMIZACIÓN .....	23
2.6.	DISEÑO DE MEZCLAS .....	26
2.6.1.	DISEÑO SIMPLEX LATTICE .....	28
<b>III.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>29</b>
3.1.	LUGAR DE EJECUCIÓN .....	29
3.2.	MATERIA PRIMA E INSUMOS .....	29
3.2.1.	HARINA DE YACÓN .....	29
3.2.2.	ENZIMAS .....	29
3.3.	MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS .....	30

3.3.1. MATERIALES .....	30
3.3.2. EQUIPOS .....	30
3.3.3. REACTIVOS.....	31
3.4. MÉTODOS DE ANÁLISIS .....	32
3.4.1. DETERMINACIÓN DE SÓLIDOS SOLUBLES .....	32
3.4.2. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE AZÚCARES REDUCTORES .....	32
3.4.3. DETERMINACIÓN DE AZÚCARES MEDIANTE UPLC .....	32
3.5. METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	33
3.5.1. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO BRUTO DE YACÓN.....	33
3.5.2. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO CLARIFICADO DE YACÓN.....	34
3.5.3. HIDRÓLISIS QUÍMICA DEL EXTRACTO DE YACÓN.....	34
3.5.4. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL EXTRACTO DE YACÓN .....	35
3.5.5. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA MEDIANTE EL DISEÑO DE MEZCLAS.....	35
3.6. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	36
3.6.1. HIDRÓLISIS QUÍMICA .....	36
3.6.2. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA .....	37
3.6.3. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA USANDO EL DISEÑO DE MEZCLAS.....	39
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>41</b>
4.1. CARACTERIZACIÓN DE LA HARINA DE YACÓN.....	41
4.2. CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO CLARIFICADO DE YACÓN.....	42
4.3. OPTIMIZACIÓN DE LA HIDRÓLISIS QUÍMICA DEL EXTRACTO DE YACÓN .....	42
4.3.1. OPTIMIZACIÓN DE LA HIDRÓLISIS QUÍMICA DEL EXTRACTO DE YACÓN EMPLEANDO ÁCIDO SULFÚRICO.....	43
4.3.2. OPTIMIZACIÓN DE LA HIDRÓLISIS DEL EXTRACTO DE YACÓN EMPLEANDO ÁCIDO FOSFÓRICO.....	49
4.4. OPTIMIZACIÓN DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL EXTRACTO DE YACÓN.....	54

4.4.1. OPTIMIZACIÓN DE LA HIDRÓLISIS DEL EXTRACTO DE YACÓN MEDIANTE EL USO DE INULINASA .....	55
4.4.2. OPTIMIZACIÓN DE LA HIDRÓLISIS DEL EXTRACTO DE YACÓN MEDIANTE EL USO DE INVERTASA.....	59
4.5. DISEÑO DE MEZCLAS APLICADO A LA HIDRÓLISIS DEL EXTRACTO DE YACÓN CON LAS ENZIMAS INULINASA E INVERTASA .....	64
4.6. COMPARACIÓN ENTRE LA HIDRÓLISIS QUÍMICA Y ENZIMÁTICA.....	68
<b>V. CONCLUSIONES .....</b>	<b>72</b>
<b>VI. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>74</b>
<b>VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>75</b>
<b>VIII. ANEXOS .....</b>	<b>82</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Cuadro 1: Contenido de carbohidratos en raíces de yacón.....</b>	<b>5</b>
<b>Cuadro 2: Composición química promedio de 10 entradas de yacón procedentes de Perú, Bolivia, Ecuador y Argentina (en base a 1 kg de materia comestible de raíz fresca) .....</b>	<b>6</b>
<b>Cuadro 3: Efecto de la temperatura y periodo de almacenamiento en el contenido azúcares y FOS en base seca.....</b>	<b>7</b>
<b>Cuadro 4: Variables independientes y sus niveles.....</b>	<b>36</b>
<b>Cuadro 5: Arreglo del diseño Box Behnken de la MSR para la etapa de optimización de la hidrólisis química del extracto de yacón. ....</b>	<b>36</b>
<b>Cuadro 6: Variables independientes y sus niveles.....</b>	<b>38</b>
<b>Cuadro 7: Arreglo del DCC de la MSR para la etapa de optimización de la hidrólisis enzimática del extracto de yacón.....</b>	<b>38</b>
<b>Cuadro 8: Variables independientes y sus niveles.....</b>	<b>39</b>
<b>Cuadro 9: Arreglo del diseño de mezcla para la optimización de los componentes de la hidrólisis enzimática del extracto de yacón.....</b>	<b>40</b>
<b>Cuadro 10. Características de la harina de yacón (*) .....</b>	<b>41</b>
<b>Cuadro 11: DBB para las variables independientes, niveles y variable respuesta de la hidrólisis química empleando ácido sulfúrico.....</b>	<b>44</b>
<b>Cuadro 12: Análisis de varianza (ANOVA) de las variables independientes en la hidrólisis química del extracto de yacón empleando ácido sulfúrico para la optimización de fructosa .....</b>	<b>45</b>
<b>Cuadro 13: Condición óptima recomendado por la ecuación de segundo orden, la respuesta estimada y experimental. ....</b>	<b>48</b>
<b>Cuadro 14: DBB para las variables independientes, niveles y variable respuesta de la hidrólisis química utilizando ácido fosfórico. ....</b>	<b>49</b>
<b>Cuadro 15: Análisis de varianza (ANOVA) de las variables independientes en la hidrólisis química del extracto de yacón empleando ácido fosfórico para la optimización de fructosa .....</b>	<b>50</b>
<b>Cuadro 16: Condición óptima recomendado por la ecuación de segundo orden, la respuesta estimada y experimental. ....</b>	<b>53</b>

<b>Cuadro 17: DCC para las variables independientes, niveles y variable respuesta de la hidrólisis enzimática empleando inulinasa.....</b>	<b>56</b>
<b>Cuadro 18: Análisis de varianza (ANOVA) de las variables independientes en la hidrólisis enzimática empleando inulinasa para la optimización del rendimiento de fructosa. ....</b>	<b>57</b>
<b>Cuadro 19: Condición óptima recomendado por la ecuación de segundo orden, la respuesta estimada y experimental .....</b>	<b>59</b>
<b>Cuadro 20: Diseño Central Compuesto para las variables independientes, niveles y variable respuesta de la hidrólisis enzimática empleando invertasa. ....</b>	<b>59</b>
<b>Cuadro 21: Análisis de varianza (ANOVA) de las variables independientes en la hidrólisis enzimática empleando invertasa para la optimización de fructosa .....</b>	<b>61</b>
<b>Cuadro 22: Condición óptima recomendado por la ecuación de segundo orden, la respuesta estimada y experimental .....</b>	<b>63</b>
<b>Cuadro 23: Diseño Simplex Lattice para las variables independientes y variable respuesta .....</b>	<b>65</b>
<b>Cuadro 24: Análisis de varianza (ANOVA) del modelo cuadrático del diseño de mezcla para la optimización del rendimiento de fructosa .....</b>	<b>66</b>
<b>Cuadro 25: Condición óptima recomendado por la ecuación de segundo orden, la respuesta estimada y experimental .....</b>	<b>68</b>
<b>Cuadro 26: Comparación de los resultados en rendimiento en fructosa, fructosa total y glucosa total en los extractos de yacón al uno por ciento de FOS sometidos a hidrólisis .....</b>	<b>70</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructura química de tres principales Fructooligosacáridos (GF <sub>2</sub> - GF <sub>3</sub> )....	9
Figura 2: Clasificación de los carbohidratos.....	9
Figura 3: Representación de dos fructosas, los círculos sombreados de plomo simbolizan el carbono y de negro simbolizan el oxígeno; los enlaces o-c (a) y c-o (b).	11
Figura 4: (a) tiempo de la reacción; $v_0$ es la velocidad inicial de la reacción, [P] es la concentración del producto. (b) influencia de la concentración de enzima sobre la velocidad inicial de la reacción. (c) influencia de la concentración de sustrato sobre la velocidad inicial de la reacción.....	14
Figura 5: Superficie respuesta en tres dimensiones. ....	20
Figura 6: Gráfica de contorno.....	20
Figura 7: Funciones deseables individuales; (a) cuando el objetivo es maximizar, (b) cuando el objetivo es minimizar y (c) cuando hay un objetivo específico. ....	21
Figura 8: (a) DCC con $k=2$ $\alpha=\sqrt{2}$ y (b) DCC con $k=3$ y $\alpha=\sqrt{3}$ .....	25
Figura 9: DBB con $k=3$ .....	26
Figura 10: Restricciones del espacio factorial con (a) dos componentes y (b) tres componentes.....	27
Figura 11: Sistema de coordenadas simplex de tres componentes.....	27
Figura 12: Gráfica de la superficie de respuesta para los efectos: (a) ph - tiempo, (b) ph - temperatura y (c) tiempo - temperatura, sobre el rendimiento de fructosa utilizando ácido sulfúrico.....	47
Figura 13: Gráfica de la superficie de respuesta para los efectos: (a) pH vs tiempo, (b) pH vs temperatura y (c) tiempo vs temperatura, sobre el rendimiento de fructosa utilizando ácido fosfórico.....	52
Figura 14: Superficie respuesta del rendimiento de fructosa en función a los factores: tiempo (min) ( $X_1$ ) y concentración de enzima (U/g FOS) ( $X_2$ ).....	58
Figura 15: Superficie respuesta del rendimiento de fructosa en función a los factores: tiempo (min) ( $X_1$ ) y concentración de enzima (U/g FOS) ( $X_2$ ).....	62
Figura 16: Superficie respuesta del rendimiento de fructosa en función a los factores: inulina (10 <sup>-2</sup> U), invertasa (10 <sup>-3</sup> U) y FOS (%).....	67
Figura 17: Cromatograma del UPLC- IR para la validación de la hidrólisis (a) química usando ácido sulfúrico, (b) enzimática usando solo invertasa y (c) empleando la	

**combinación de enzimas inulinasa/invertasa del diseño de mezclas. las corridas se han realizado a una concentración de sólidos de dos por ciento ..... 71**

## ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: CURVA ESTÁNDAR DE SOLUCIONES DE FRUCTOSA.....	82
ANEXO 2: CONDICIÓN ÓPTIMA DEL RENDIMIENTO DE FRUCTOSA UTILIZANDO EL MÉTODO DE LA FUNCIÓN DE DESEABILIDAD PARA LA HIDRÓLISIS QUÍMICA CON ÁCIDO SULFÚRICO.....	83
ANEXO 3: CONDICIÓN ÓPTIMA DEL RENDIMIENTO DE FRUCTOSA UTILIZANDO EL MÉTODO DE LA FUNCIÓN DE DESEABILIDAD PARA LA HIDRÓLISIS QUÍMICA CON ÁCIDO FOSFÓRICO.....	83
ANEXO 4: ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA INULINASA EN INULINA AL 3 %, pH 5, TEMPERATURA 55 °C .....	84
ANEXO 5: ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA INVERTASA EN INULINA AL 3 %, pH 5, TEMPERATURA 50 °C .....	84
ANEXO 6: CONDICIÓN ÓPTIMA DEL RENDIMIENTO DE FRUCTOSA UTILIZANDO EL MÉTODO DE LA FUNCIÓN DE DESEABILIDAD PARA LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA CON INULINASA.....	85
ANEXO 7: CONDICIÓN ÓPTIMA DEL RENDIMIENTO DE FRUCTOSA UTILIZANDO EL MÉTODO DE LA FUNCIÓN DE DESEABILIDAD PARA LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA CON INVERTASA .....	85
ANEXO 8: ANOVA DE LOS VALORES DE RENDIMIENTO DE FRUCTOSA DE LAS TRES HIDRÓLISIS.....	86

## RESUMEN

Los parámetros de conversión máxima de los azúcares: sacarosa y fructooligosacáridos (FOS) de un extracto de yacón a fructosa, fueron optimizadas empleando una hidrólisis química y una enzimática. Para la hidrólisis química se empleó ácidos sulfúrico y fosfórico, independientemente y, para la enzimática se usó inulinasa e invertasa, independientemente y mezcladas. Un diseño Box-Behnken fue usado para optimizar el rendimiento de fructosa en la hidrólisis química. Los modelos de la superficie respuesta se ajustaron satisfactoriamente en ambos ácidos ( $R^2 = 0.963 - 0.938$ ). Las condiciones óptimas en la hidrólisis química con ácido sulfúrico correspondieron a pH 1, 88.4 °C y 38.7 min obteniéndose un rendimiento de 9.118 g fructosa/litro de extracto; mientras que con ácido fosfórico las condiciones fueron: pH 1, 89.9 °C y 42.2 min obteniéndose un rendimiento de 7.848 g fructosa/litro de extracto. Para la hidrólisis enzimática un diseño Central Compuesto fue empleado, también los modelos de la superficie de respuesta se ajustaron satisfactoriamente en ambas enzimas, siendo mejor el ajuste para la inulinasa que para la invertasa ( $R^2 = 0.983 - 0.880$ ). Las condiciones óptimas de la hidrólisis enzimática empleando inulinasa fueron 134 min y 11.7 U/g FOS; mientras que con la invertasa fueron: 127.5 min y 0.674 U/g FOS, ambas reacciones bajo las condiciones constantes: 50 °C y pH 5, obteniendo un rendimiento de 6.168 y 7.506 g fructosa/litro de extracto, respectivamente. Por último, con el diseño de Mezclas, las cantidades óptimas de concentración de ambas enzimas y porcentaje de FOS fueron las siguientes:  $1.930 \times 10^{-10}$  U/g FOS de inulinasa, 0.048 U/g FOS de invertasa y 4.55 por ciento de FOS obteniéndose 56.31 g fructosa/litro de extracto; los factores constantes fueron: 50 °C, pH 5 y 2 horas; con un alto grado de ajuste ( $R^2$  de 0.999).

**Palabras claves:** fructosa, yacón, hidrólisis química, inulinasa, invertasa.

## SUMMARY

The maximum conversion parameters of sugars: sucrose and fructooligosaccharides (FOS) from a yacon extract to fructose were optimized using acid and enzymatic hydrolysis. For the acid hydrolysis, sulfuric and phosphoric acids were used independently and, for the enzyme, inulinase and invertase were used, independently and mixed. A Box-Behnken design was used to optimize the yield of fructose in acid hydrolysis. The surface response models were adjusted successfully in both acids ( $R^2 = 0.963 - 0.938$ ). The optimum conditions in the hydrolysis with sulfuric acid were pH 1, temperature 88.4 °C and 38.7 min getting 9.118 g fructose/liter extract of yield; while with phosphoric acid the conditions were: pH 1, temperature 89.9 °C and 42.2 min getting 7.848 g fructose/liter extract yield. For enzymatic hydrolysis a Central Composite design was employed, the response surface models were also successfully adjusted in both, for inulinase better than for invertase ( $R^2 = 0.983 - 0.880$ ). The optimum conditions of the enzymatic hydrolysis using inulinase were 134 min and 11.7 U/g FOS; while with the invertase were: time of 127.5 min and 0.674 U/g FOS, both reactions under the constant conditions of 50 °C and pH 5, getting 6.168 and 7.506 g fructose/liter of extract yield, respectively. Finally, with the Mixtures design, the optimum amounts of concentration of both enzymes and percentage of FOS were:  $1.930 \times 10^{-10}$  U inulinase /g FOS, 0.048 U invertase /g FOS and 4.55 percent FOS getting 56.31 g fructose / liter extract yield; the constant factors were: 50 °C, pH 5 and 2 hours; with a  $R^2 = 0.999$ .

**Keywords:** fructose, yacon, acid hydrolysis, inulinase, invertase.

## I. INTRODUCCIÓN

El yacón (*Smallanthus sonchifolius*) es un tubérculo originario de los Andes que crece entre los 1000 a 3200 m.s.n.m. El 90 por ciento del peso seco de esta raíz son carbohidratos, y de éstos, del 50 al 70 por ciento son fructooligosacaridos (FOS), el resto lo conforman: sacarosa, glucosa y fructosa (Ohyama, Asami, Nieto, Collazos, Hermann, citados por Seminario *et al.* 2003). Los FOS representan una clase importante de oligómeros de fructanos, los cuales tienen efecto prebiótico debido a que apoyan al crecimiento de bifidobacterias en el colon humano (Durieux, citados por Vaňková y Polakovič 2010, Nobre *et al.* 2014).

La creciente producción de yacón se ha atribuido a la popularidad de los FOS como alimentos funcionales, sin embargo, las condiciones a las que están sometidas las raíces implican muchas veces la degradación de los FOS durante su manejo (Asami, Simonovska, Lachman, citados por Campos *et al.* 2016); esta degradación da lugar a la despolimerización de sus cadenas liberando azúcares, en su mayoría fructosa (Seminario *et al.* 2003).

La fructosa es comercializada en la industria alimentaria como jarabe, para ello habitualmente, se realiza la hidrólisis del almidón, sin embargo, el uso de esta cadena implica una etapa adicional, la conversión de glucosa en fructosa. Es así que, con la finalidad de disminuir los procesos de operación para obtener fructosa, es posible considerar la utilización de materias primas ricas en este azúcar como son los oligómeros o polímeros de fructanos (Seminario *et al.* 2003). De lo mencionado sería posible transformar a los FOS del yacón en fructosa (vía un proceso de hidrólisis), considerando en este proceso a aquellas raíces cuyo contenido de FOS sea bajo, donde la factibilidad de obtener FOS se vería afectada dado su bajo rendimiento de extracción.

La hidrólisis es un tratamiento realizado a los oligómeros o polímeros de azúcares, donde ocurre una despolimerización de sus cadenas para obtener azúcares simples, pudiendo ser ésta química o enzimática. Se ha estudiado los procesos de hidrólisis química y enzimática en polímeros de fructanos, considerando como factores de estudio al pH, temperatura, tiempo, concentración del fructano, tipo de ácido para la hidrólisis química (Pekic *et al.* 1984, Blecker *et al.* 2002, Eskandari *et al.* 2009, Sarchami y Rehmann 2014); así como: tipo de enzima, tiempo de reacción, concentración de enzimas para la hidrólisis enzimática (Szambelan y Nowak 2006, Ricca *et al.* 2009, Sarchami y Rehmann 2014); sin embargo, a la fecha no se han encontrado estudios de optimización de la hidrólisis (química y/o enzimática) de los carbohidratos del yacón, utilizando la Metodología Superficie Respuesta.

Por todo ello, los objetivos de la presente investigación fueron:

#### Objetivo general

- Optimizar la obtención de fructosa mediante la hidrólisis química y enzimática de un extracto de yacón utilizando la Metodología Superficie Respuesta.

#### Objetivos específicos

- Optimizar los parámetros de la hidrólisis química: pH, tiempo y temperatura, en un extracto de yacón para la obtención de fructosa.
- Optimizar los parámetros de la hidrólisis enzimática: concentración de enzima y tiempo de reacción, en un extracto de yacón para la obtención de fructosa.
- Optimizar los parámetros de hidrólisis enzimática: mezcla enzimática de inulina e invertasa y el porcentaje de FOS en un extracto de yacón para la obtención de fructosa.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. YACÓN

#### 2.1.1. ASPECTOS GENERALES

El yacón es una especie vegetal de la familia Asteraceae (también llamada Compositae), a esta familia pertenecen también: la achicoria (*Cichorium intybus*), topinambur (*Helianthus tuberosus*) y la dalia (*Dahlia sp.*), las cuales se caracterizan por contener como carbohidrato de reserva cadenas de fructosas unidas mediante el enlace  $\beta$  (2 $\rightarrow$ 1) y una glucosa terminal (Ohyama *et al.* 1990, Goto *et al.* 1995). Por su parte, el yacón, acumula cadenas de fructosas de bajo grado de polimerización, llamados fructooligosacaridos (FOS), mientras que las otras especies acumulan Inulina, una cadena de fructosas de alto grado de polimerización (Pollock, citado por Ohyama *et al.* 1990, Manrique *et al.* 2005).

El yacón es una planta herbácea que mide entre 1 a 2.5 metros de altura. Es de origen andino, sin embargo, es una planta adaptable en cuanto al clima, altitud y a los tipos de suelo. Se desenvuelve bien en los valles interandinos a 800 y 2800 m. s. n. m., pero ha sido sembrada también en la costa y selva del Perú, inclusive el cultivo ha sido extendido hasta Nueva Zelanda, Japón y Brasil (National Research Council 1989, Seminario *et al.* 2003, Manrique *et al.* 2005, Ojansivu *et al.* 2011).

Las raíces reservantes de yacón son las que poseen diversidad de formas, tamaños, pesos y contenido de FOS; no sólo las condiciones ambientales (tipo de suelo, clima, variedad, entre otros) influyen en ello, sino también las condiciones internas de la planta como la relación fuente- drenaje que varía durante su cultivo (Margoczi y Maróti, citados por Vilhena *et al.* 2003, Seminario *et al.* 2003, Manrique *et al.* 2005).

Las raíz reservante de yacón recibe varios nombres, entre ellos: Aricoma o Aricumay (aymara), Llaqon, Llacún y Llacuma (quechua) (Seminario *et al.* 2003), Poire de terre (francés) y Yacón strawberry (inglés) (Grau y Rea, citado por Ojansivu *et al.* 2011).

### **2.1.2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA**

La clasificación taxonómica del yacón según Montando, citado por Coronado (2013), es la siguiente:

REINO: *Plantae*

DIVISIÓN: *Trachophyta*

CLASE: *Dicotyledoneae*

ÓRDEN: *Asterales*

FAMILIA: *Compositae*

GÉNERO: *Smallanthus*

ESPECIE: *Sonchifolia*

### **2.1.3. PRODUCCIÓN NACIONAL DEL YACÓN**

En el Perú, su cultivo se da en áreas de alto andina de 17 de los 24 departamentos con los que se cuenta: Piura, Cajamarca, Amazonas, Lambayeque, La Libertad, San Martín, Ancash, Huánuco, Pasco, Lima, Junín, Huancavelica, Ayacucho, Apurímac, Cuzco y Puno (Velezmoro 2004, Manrique *et al.* 2005), de lo anterior, puede mencionarse que la producción en estas zonas solo ha sido para autoconsumo y para su comercialización en ferias campesinas rurales, sin embargo en la actualidad, la fuerte demanda basado en la popularidad de su carácter funcional ha potencializado a que el cultivo se encuentra en la región Cajamarca, Puno, Huánuco, Ancash y Junín (Seminario *et al.* 2003, Manrique *et al.* 2005, INEI 2014).

## 2.1.4. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL YACÓN

La raíz del yacón posee entre un 83 a 90 por ciento de peso en agua (Seminario *et al.* 2003, Manrique *et al.* 2005). A diferencia de la mayoría de raíces comestibles, el yacón acumula sus carbohidratos en forma de FOS y azúcares libres (fructosa, glucosa y sacarosa), los cuales representan el 90 por ciento del peso seco de la raíz. De éstos, el 50 a 70 por ciento son FOS, el resto están comprendido por sacarosa, glucosa y fructosa (Ohyama *et al.* 1990, Goto *et al.* 1995, Nuñez *et al.* 2001, Seminario *et al.* 2003).

En el Cuadro 1 se muestra el contenido de azúcares y FOS según su grado de polimerización. Existe una variación del contenido de FOS reportados en la literatura, las cuales se deben a factores como el tipo de cultivo, la época de siembra y cosecha, tiempo y temperatura en post cosecha y el tipo de suelo (Seminario *et al.* 2003, Margoczi y Maróti, citados por Vilhena *et al.* 2003, Coronado 2013).

**Cuadro 1: Contenido de carbohidratos en raíces de yacón**

CARBOHIDRATOS	CONTENIDO (mg/g MATERIA SECA)
Fructosa	350.1 ± 42.0
Glucosa	158.3 ± 28.6
Sacarosa	74.5 ± 19.0
GF2	60.1 ± 12.6
GF3	47.4 ± 8.2
GF4	33.6 ± 9.3
GF5	20.6 ± 5.2
GF6	15.8 ± 4.0
GF7	12.7 ± 4.0
GF8	9.6 ± 7.2
GF9	6.6 ± 2.3

FUENTE: Tomado de Ohyama *et al.* 1990.

Por otro lado, las proteínas y lípidos se encuentran en pequeñas cantidades, éstos últimos componentes representan aproximadamente 3.4 por ciento y 0.3 por ciento del peso de la materia seca, respectivamente (Manrique *et al.* 2005). Asimismo, dichos autores afirman que el mineral más abundante presente en el yacón es el potasio y en menor cantidad se encuentra el calcio, fósforo, magnesio, sodio y hierro. En el Cuadro 2 se muestra la composición química de la raíz de yacón en donde se puede observar que el contenido de proteínas, lípidos, vitaminas y minerales son muy bajos.

**Cuadro 2: Composición química promedio de 10 entradas de yacón procedentes de Perú, Bolivia, Ecuador y Argentina (en base a 1 Kg de materia comestible de raíz fresca)**

VARIABLE	PROMEDIO
Materia seca (g)	115
Carbohidratos totales (g)	106
Fructanos (g)	62
Glucosa libre (g)	3.4
Fructosa libre (g)	8.5
Sacarosa libre (g)	13
Proteína (g)	3.7
Fibra (g)	3.6
Lípidos (mg)	244
Calcio (mg)	87
Fósforo (mg)	240
Potasio (mg)	2282

FUENTE: Adaptado de Hermann, citado por Seminario *et al.* 2003.

### **2.1.5. FORMAS DE CONSUMO Y ALMACENAMIENTO DEL YACÓN**

La raíz del yacón tradicionalmente se consume como fruta fresca o deshidratada en diferentes grados. Como fruta fresca es un buen rehidratante debido a su alto contenido de agua, además que puede prevenir la fatiga y los calambres por su alto contenido de potasio,

como fruta deshidratada dado a su sabor dulce y su textura crujiente se puede asimilar a una pera (Seminario *et al.* 2003, Coronado 2013). El yacón puede ser una fuente provechosa de endulzantes de alta fructosa, así como un buen aperitivo vegetal fresco también puede ser un útil cultivo de forraje (National Research Council 1989). Kina (2016), menciona que los productos que pueden obtenerse en base a las raíces de yacón son: pasas, hojuelas, jarabes, harina, infusión, entre otros. Otra opción de comercialización y la adición de valor comercial para el yacón es la producción de jugos, que puede ser fácilmente incorporado en la dieta diabética y de la población general (Quintero 2000).

Otro aspecto a considerar es la perecibilidad de esta raíz, muchos estudios han demostrado que luego de la cosecha las raíces empiezan un rápido proceso de cambio en la composición química: los FOS son hidrolizados en azúcares simples por la acción de la enzima fructano hidrolasa, que los convierte en fructosa, sacarosa y glucosa (Lachman *et al.* 2004, Inga *et al.* 2015, Campos *et al.* 2016).

Por lo tanto, la industrialización de los FOS del yacón puede ser limitada por la pérdida que se genera tras inadecuados tratamientos post cosecha, además de adicionar un coste al producto debido a que sería necesaria una purificación posterior a la extracción, para la eliminación de éstos azúcares generados tras la degradación de los FOS (Inga *et al.* 2015).

En el Cuadro 3, se muestra cómo afecta los factores de la post cosecha (temperatura y tiempo de almacenamiento) en el contenido de carbohidratos en las raíces de yacón.

**Cuadro 3: Efecto de la temperatura y periodo de almacenamiento en el contenido azúcares y FOS en base seca**

Duración de almacenamiento	FOS (%)	Fructosa (%)	Glucosa (%)	Sacarosa (%)
Cosecha, Día 0	67	1.2	1.3	4.4
Almacenado a 5°C				
28 días	45	21	8.3	5.9
194 días	13	36	16.6	6.4
Almacenado a 25°C				

«Continuación»

31 días	39	30	10.2	8.2
74 días	23	28	14.5	11.8

FUENTE: Elaborado con base en Asami, citado por Ram 2011.

## 2.2. FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS

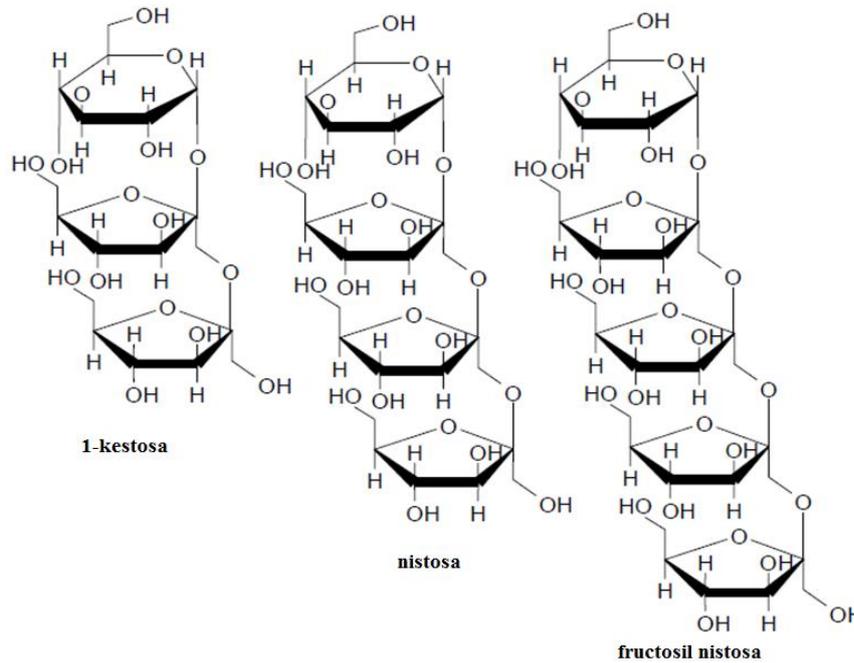
Los FOS o también llamados oligómeros de fructanos u oligofructosa, se componen de una cadena de fructosas unidas mediante enlaces glucosídicos  $\beta$  (2→1) con una unidad de glucosa terminal, unida mediante el enlace  $\beta$  (2→6). Si bien es cierto, existen diversos fructanos en la naturaleza, los FOS y la Inulina son reconocidos como los más importantes desde el punto de vista nutricional, ya que son considerados como fibra dietética y como alimento prebiótico (Seminario *et al.* 2003, Pedreschi *et al.* 2003, Ojansivú *et al.* 2011).

Los FOS más conocidos son 1- kestosa, nistosa y fructosil nistosa, constituidos por una molécula de sacarosa y una, dos y tres moléculas de fructosa, respectivamente (Figura 1); debido a que las moléculas de fructosas se unen mediante el enlace  $\beta$  (2→1), la estructura espacial de los FOS es de una cadena lineal (Seminario *et al.* 2003). Estos tipos de moléculas se encuentran en productos de origen vegetal, como la cebolla, la alcachofa, el tomate y la remolacha (Ohyama *et al.* 1990, Goto *et al.* 1995, Gil 2007).

Se ha encontrado información que atribuyen los beneficios del yacón a la inulina, sin embargo, la inulina es un tipo de fructano con un grado de polimerización mayor que los FOS, así mismo Goto, citado por Seminario *et al.* (2003) señalan que el yacón estrictamente tiene FOS, es decir, fructanos que poseen un grado de polimerización de 2 a 10 unidades de fructosa (Figura 2).

Los FOS han sido usados en la industria alimentaria como edulcorantes, ya que presentan un ligero sabor dulce (que está entre 0.4 a 0.6 veces del dulzor de la sacarosa), son solubles en agua y presentan bajo aporte calórico (1.6 a 2.71 Kcal por gramo) (Wong *et al.* 1994, Cuervo *et al.* 2004, Coronado 2013). Por otra parte, la estabilidad térmica de los FOS es mayor a la sacarosa, son estables a un rango de pH de 4 a 7 y en condiciones de refrigeración por un año. Además, es muy parecido a la sacarosa en cuanto a su punto de congelación y

ebullición (Peckic *et al.* 1985, Prapulla *et al.* 2000, Nouredine y Norio 2006; Courtin *et al.* 2009).



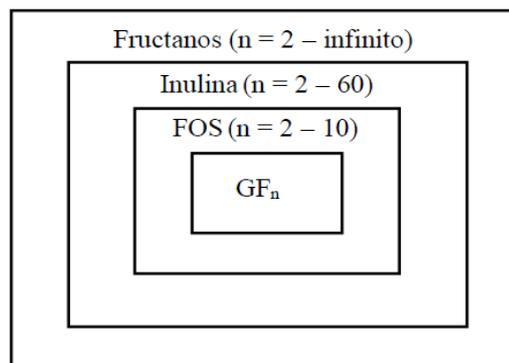
**Figura 1: Estructura química de tres principales fructooligosacáridos (GF<sub>2</sub>- GF<sub>3</sub>)**

G= molécula de glucosa

F= molécula de fructosa

FUENTE: Tomado de Seminario *et al.* 2003.

Carbohidratos



**Figura 2: Clasificación de los carbohidratos**

n= número de moléculas de fructosa

FUENTE: Tomado de Seminario *et al.* 2003.

### **2.3. FRUCTOSA**

La fructosa, también se llama levulosa, es el más dulce de los azúcares, siendo más dulce que la sacarosa, sin embargo, el aporte energético que ofrece es mucho menor que ésta. La fructosa se encuentra en la miel de abeja (30 por ciento), en las frutas, algunas verduras y legumbres (Marin 1996).

En la actualidad, los jarabes de alta fructosa son el producto más comercial que implica la comercialización de la fructosa, de manera que son sustitutos de edulcorantes que mayormente se emplean en el mercado de bebidas (Seminario *et al.* 2003). Sin embargo, también es utilizada como sustrato para diversos tipos de fermentaciones (alcohólica, láctica, cítrica, etc.) (Sarchami y Rehmann 2009).

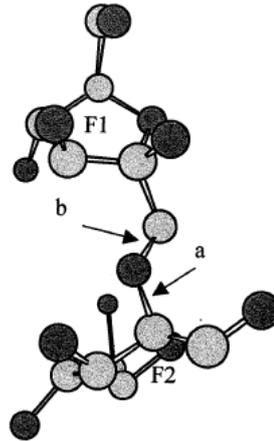
En la actualidad, lo que busca la industria es disminuir los costos de producción de todo proceso. En el caso de los jarabes de alta fructosa, partiendo del almidón, las operaciones son: gelatinización, licuefacción, sacarificación, isomerización y purificación (Seminario, Godfrey y West, citado por Tomotani y Vitolo 2007). Por lo tanto, partiendo de materias primas las cuales contengan una cantidad significativa de fructosa, el ahorro en las operaciones resulta evidente, siendo aquí los oligómeros de fructanos una opción clave para su proceso (Seminario *et al.* 2003).

### **2.4. HIDRÓLISIS QUÍMICA**

Se denomina hidrólisis química aquella reacción en donde una molécula de agua se divide y forma parte de otra especie química siendo catalizada por ácidos o bases fuertes. En esta reacción se tiene como factores el pH, tipo de ácido, temperatura y tiempo (Hao, citado por Aguilar 1995).

#### **2.4.1. MECANISMOS DE HIDRÓLISIS DE LOS PENTOSANOS**

El mecanismo de la hidrólisis ácida de las pentosas se muestra esquemáticamente en la Figura 3.



**Figura 3: Representación de dos fructosas, los círculos sombreados de plomo simbolizan el carbono y de negro simbolizan el oxígeno; los enlaces O-C (a) y C-O (b)**

FUENTE: Adaptado de Homme *et al.* 2003.

Debido a que la estructura de un pentosano corresponde a un poliacetal, la hidrólisis ácida de un pentosano corresponde a la hidrólisis de acetales y comprende los siguientes pasos (Zeitsch 2000):

1. La protonación del oxígeno glucosídico, lo que conduce a obtener un oxígeno trivalente.
2. La escisión del enlace de carbono/oxígeno, lo que conduce a obtener un carbocatión en un lado del puente de oxígeno y a un grupo hidroxilo en el otro lado.
3. El carbocatión absorbe agua.
4. El grupo  $\text{H}_2\text{O}^+$  resultante libera un ion de hidrógeno, dejando así un hidroxilo grupo detrás, el cual se une al carbocatión.

Esta secuencia de procesos se repite hasta que todos los puentes de oxígeno hayan desaparecido, de manera que toda la molécula se haya convertido en moléculas individuales de pentosas.

En el momento en el que el oxígeno glucosídico se carga positivamente se produce el alargamiento del enlace (a y b) mediando la ruptura. Es por ello que, los oligosacáridos

protonados se hidrolizan rápidamente a bajos valores de pH. Esto ha sido observado por Homme *et al.* (2003) en la hidrólisis de la Inulobiosa.

## **2.4.2. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA**

En el caso que la reacción de hidrólisis sea catalizada por una enzima se denomina hidrólisis enzimática. Generalmente, los procesos basados en enzimas operan a bajas temperaturas, producen menos residuos contaminantes tóxicos, y menos emisiones y sub productos a comparación de los procesos químicos convencionales. El menor consumo de energía y la baja formación de bio productos incluyendo los bajos costos de purificación, son ventajas de la hidrólisis enzimática sobre la química (Vitolo 2004, Junko y Vitolo 2006, Vargas 2009).

### **a. ENZIMAS**

Los enzimas son biomoléculas, proteínas macromoleculares, especializadas en la catálisis de las reacciones químicas. Consisten en polímeros lineales de aminoácidos condensados, unidos mediante enlaces amida. Cada enzima tiene una determinada secuencia genética única y se forma en tres dimensiones en una orientación precisa, lo que le provee la característica de ser específica para cada sustrato, por lo que induce la transformación de un solo tipo de sustancia y no de otras que puedan encontrarse en el medio de reacción (Ashokkumar, Lodish, citados por Leskovac 2003).

El sitio activo es la parte más importante de una enzima, la cual media la diferencia fundamental entre las reacciones enzimáticas y químicas. Las reacciones químicas proceden a través de los complejos de colisión, mientras que las reacciones enzimáticas proceden a través de complejos de adsorción, en donde intervienen enlaces de hidrógeno o interacciones entre las partes cargadas eléctricamente (Leskovac 2003, Shukla y Pretschke 2013) con el sustrato, formando de esta manera el complejo enzima- sustrato.

## **b. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA**

Para definir la actividad de una preparación enzimática se utiliza en la práctica distintas expresiones. La cantidad de enzima se indica habitualmente en *Unidad enzimática* (U), la cual se define como la cantidad de enzima que cataliza la transformación de un micromol de sustrato por minuto ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ ) (Figura 4a), bajo condiciones óptimas de temperatura y pH (Veana *et al.* 2011, Shukla y Pretsckhe 2013).

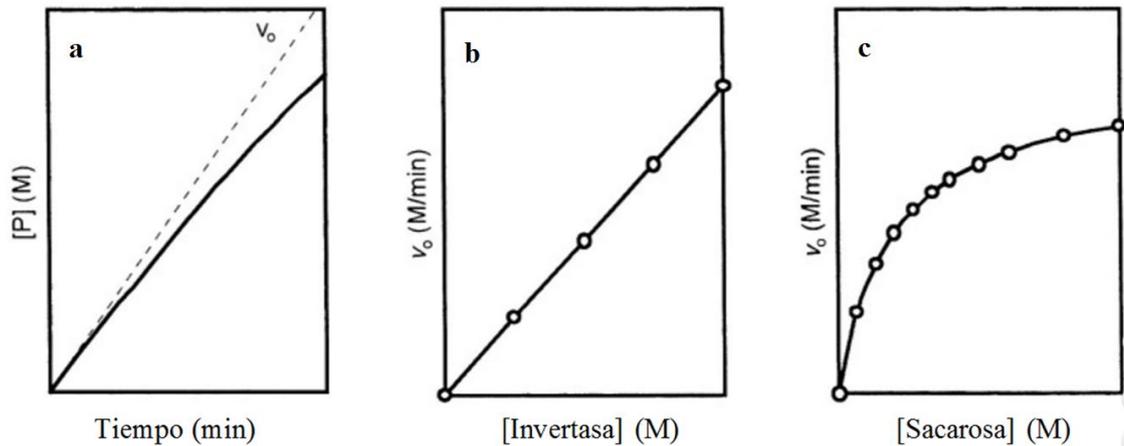
## **c. FACTORES QUE AFECTAN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA**

- **CONCENTRACIÓN DE ENZIMA**

La velocidad de la reacción depende directamente de la concentración de enzima a cualquier concentración de sustrato. Dicho de otra manera, si mayor es la cantidad de enzima que está presente en la reacción, mayor será la cantidad de sustrato consumido para alcanzar la saturación (Figura 4b) (Veana *et al.* 2011).

- **CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO**

A medida que aumenta la cantidad de sustrato, la velocidad aumenta en forma lineal, luego si bien la velocidad continúa aumentando ya no lo hace en forma lineal, hasta que finalmente la reacción alcanza una velocidad máxima que es constante, se vuelve independiente de la cantidad de sustrato (zona de saturación) (Figura 4c). Esto ocurre debido a que todos los sitios activos de las enzimas se encuentran interactuando con las moléculas de sustrato (Leskovac 2003, Veana *et al.* 2011).



**Figura 4: (a) Tiempo de la reacción,  $v_0$  es la velocidad inicial de la reacción, [P] es la concentración del producto, (b) Influencia de la concentración de enzima sobre la velocidad inicial de la reacción y (c) Influencia de la concentración de sustrato sobre la velocidad inicial de la reacción**

FUENTE: Tomado de Leskovac 2003.

- **TEMPERATURA**

Harcourt (1867) estableció «la duplicación en la velocidad de la reacción con un aumento de 10 °C en la temperatura» (Leskovac 2003), por lo tanto, resulta evidente que desde los primeros estudios de las velocidades de reacción, la influencia de la temperatura se ha hecho presente. Cada enzima tiene una temperatura óptima de actuación; por debajo de esta temperatura, la enzima ralentiza la velocidad de la reacción, y por encima de ésta, las enzimas pueden desnaturalizarse (Aldabe *et al.* 1998).

- **pH**

La actividad enzimática también viene regulada por el pH de la solución enzimática. Conceptualmente, la protonación de un grupo básico en una enzima es simplemente el caso especial de la unión de un modificador en un sitio específico. Sin embargo, existen diferencias entre los protones y otros modificadores. En primer lugar, todas las enzimas son afectadas por los protones, de modo que el protón es mucho más importante que otro modificador. En segundo lugar, la concentración de protones es regulada por un amplio rango de valores, por lo tanto, se puede esperar efectos versátiles en la cinética enzimática.

Y por último, los protones se unen a muchos sitios en una enzima, por ello la conformación de la enzima se altera produciendo un cambio en el estado de ionización de los grupos del sitio activo llegando a no ser funcional (Aldabe *et al.* 1998, Leskovac 2003, Veana *et al.* 2011).

- **INHIBIDORES**

Los inhibidores son compuestos químicos que reducen la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas. La inhibición puede surgir de muchas maneras y hay diferentes tipos de inhibidores (Leskovac 2003):

La primera división son: inhibidores irreversibles y reversibles. Los irreversibles son considerados venenos para las enzimas ya que modifican, mediante enlaces covalentes, la actividad de la enzima mediando su actividad a cero (metales pesados). Los reversibles, una clase más importante para el estudio de la cinética enzimática, forman complejos no covalentes, por lo tanto, reducen la cantidad de enzima disponible para la reacción normal.

Estos compuestos pueden ser eliminados por diálisis y por ende se puede restaurar la actividad catalítica de la enzima. Estos inhibidores se dividen en: Competitivos, No competitivos y Acompetitivos (Veana *et al.* 2011, Shukla y Pretschke 2013).

**d. GLICOSIDASAS**

Las glicosidasas es un sub grupo de enzimas que pertenecen al grupo de las hidrolasas. La  $\beta$ - fructofuranosidasa es un tipo de glicosidasa, enzimas que producen la hidrólisis de los numerosos oligo- y polisacáridos naturales que poseen enlaces  $\beta$ - fructofuranosídicos (Klages 1968). Por ejemplo, la enzima  $\beta$ - fructofuranosidasa más conocida de las levaduras, invertasa, rompe los enlaces  $1\alpha$ -  $2\beta$  de la sacarosa (el glucósido más simple), liberando D- glucopiranosas y D- fructofuranosa (Tomontani y Vitolo 2004).

- **INVERTASA**

La invertasa ( $\beta$ -D- fructohidrolasa- D -fructofuranosidasa, E.C.3.2.1.26) es una  $\beta$ -fructofuranosidasa que cataliza la hidrólisis de residuos terminales no reductores de un  $\beta$ -fructofuranósido en beta-fructofuranósidos. También pertenece a la familia de la glucosa hidrolasa 32 (GH32) y está ampliamente presente en bacterias, levaduras, hongos, plantas superiores y en algunas células animales (Kulshresth, citado por Liu *et al.* 2016, Liu *et al.* 2016).

La invertasa cataliza la hidrólisis de la sacarosa (pH y temperatura de 4.5 y 50 - 60 °C, respectivamente) (Herrera *et al.* 2003) actuando bajo un mecanismo de retención el cual implica dos etapas: la primera corresponde a un ataque al carbono anomérico por parte del residuo nucleófilo de la enzima dando como resultado la formación de un enlace covalente entre la enzima y el glucósido. Luego, una molécula de agua dona un protón y rompe el enlace transitorio regenerando la enzima (Flórez 2008).

Sin embargo, la selectividad de esta enzima es relativa, ya que al ser una fructofuranosidasa, es capaz de hidrolizar fructafuronosidos como la rafinosa, inulobiosa, inulina, etc. (Isla, citado por Flórez 2008). Además, se debe mencionar que las  $\beta$ - fructofuranosidasa usualmente posee actividades hidrolíticas y de síntesis (hidrolasas y fructosil transferasas).

Se ha reportado que la mayoría de las invertasas provenientes de hongos y levaduras así como hidrolizan, pueden sintetizar oligosacáridos (Cuervo *et al.* 2004, Hernalsteens y Maugeri 2008). Se dice que la actividad hidrolítica de una enzima es un caso particular de transferencia de agua en sistemas diluidos y la actividad fructosil transferasa es el caso de transferencia de un monosacarido (Paul y Monsan, citados por Hernalsteens y Maugeri 2008, Rubio *et al.* 2012).

- **INULINASA**

La inulinasa ( $\beta$ -D-2.1- fructano fructohidrolasas, E.C. 3.2.1.7) es una  $\beta$ -fructofuranosidasa que actúan sobre los enlaces  $\beta$  (2→1) de la inulina produciendo en su mayoría fructosa, y

glucosa. Esta enzima también pertenece a las GH32 (Li *et al.* 2015). De acuerdo a su acción, las inulinasas se dividen en exo y endo inulinasas (Castillo y Chamy 2010, Li *et al.* 2015).

Las exo- inulinasas (E.C. 3.8.1.80) hidroliza enlaces terminales no reductores 2.1 y 2.6 de  $\beta$ -D- fructofuranosa del fructano con la liberación de fructosas y glucosas, y las endo- inulinasas (E.C. 3.2.1.7) rompen los enlaces internos de la inulina produciendo inulooligosacaridos incluyendo inulotriosa, inulotetrosa e inulopentosas (Wengling *et al.* 1998, Castillo y Chamy 2010).

Muchos estudios de investigación se ocupan de la hidrólisis total de la inulina usando inulinasa a pH 4- 5 y temperatura 45- 65 °C, así como también de la síntesis de inulina usando como sustrato la sacarosa a diferentes condiciones. Tanto la hidrólisis como la síntesis de la inulina usando inulinasa se encuentran bien documentadas (Blecker *et al.* 2002, Crittenden y Playne 1996, Riso *et al.* 2005, Szambelan y Nowak 2006).

## 2.5. METODOLOGÍA SUPERFICIE RESPUESTA

La Metodología Superficie Respuesta (MSR) es un conjunto de técnicas estadísticas y matemáticas utilizadas en el tratamiento de problemas en los que una respuesta de interés está influenciada por varios factores de carácter cuantitativo, por lo que es aplicada para el desarrollo, la mejora y optimización de procesos (Ayala y Pardo 1995, Fernando y Pineiro 2013, Myers *et al.* 2016). El propósito inicial de estas técnicas es diseñar un experimento que proporcione valores razonables de la variable respuesta y determinar el modelo matemático que mejor se ajuste a los datos obtenidos, y como objetivo final es establecer los valores de los factores que optimizan el valor de la variable respuesta (Fernando y Pineiro 2013).

En general, se sabe que el producto, proceso o sistema que implica una respuesta y depende de variables de entrada  $\xi_1, \xi_2, \xi_3, \dots, \xi_k$ . Estas variables de entrada son conocidas como factores, variables independientes o variables del proceso. De lo mencionado, se puede representar esta relación como (Ayala y Pardo 1995, Montgomery 2004, Myers *et al.* 2016):

$$Y = f(\xi_1, \xi_2, \xi_3, \dots, \xi_k) + \varepsilon \quad (1)$$

Donde la forma de la función  $f$  de la respuesta es desconocida y quizás muy complicada. Se observa el término  $\varepsilon$ , el cual representa otras fuentes de variabilidad (errores inherentes al proceso, variables del proceso) que no son consideradas por la función  $f$  (Anderson Cook *et al.* 2009). Por lo tanto,  $\varepsilon$  es el error estadístico.

Las variables  $\xi_1, \xi_2, \xi_3, \dots, \xi_k$  en la Ecuación 1 son usualmente llamados variables naturales porque generalmente son expresados en unidades naturales de medidas, como grados Celsius ( $^{\circ}\text{C}$ ), presión (psi), concentración (g/L), etc. En los trabajos de MSR es conveniente la transformación de las variables naturales a variables codificadas  $x_1, x_2, \dots, x_k$ , los cuales son dimensionales con un promedio de cero y la misma desviación estándar (Montgomery 2004, Myers *et al.* 2016). De lo mencionado, se puede relacionar la función como:

$$\eta = f(x_1, x_2, x_3, \dots, x_k) \quad (2)$$

Debido a que la forma de la verdadera función  $f$  es desconocida, hay que aproximar. De hecho, el uso exitoso de MSR es críticamente dependiente de la capacidad del experimentador para desarrollar una aproximación adecuada para  $f$ . Por lo general, un polinomio de bajo orden en alguna región relativamente pequeña del espacio de la variable independiente es apropiado. En muchos casos, se utiliza ya sea un modelo de primer orden o de segundo orden. Para el caso de dos variables independientes, el modelo de primer orden en términos de las variables codificadas es:

$$\eta = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{12} x_1 x_2 \quad (3)$$

A menudo, la ecuación de primer orden resulta inadecuada cuando existe una verdadera curvatura en la superficie de respuesta. Por lo tanto, es probable que se requiera un modelo de segundo orden. Para el caso de dos variables, el modelo de segundo orden es:

$$\eta = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{12} x_1 x_2 \quad (4)$$

Myers *et al.* (2016) mencionan algunas razones por las que es comúnmente usado el modelo de segundo orden:

1. El modelo de segundo orden es muy flexible. Se puede tomar en una amplia variedad de funciones formas, por lo que es muy probable que llegue a una aproximación a la superficie de respuesta verdadero.
2. Es fácil para estimar los parámetros ( $\beta$ ) en el modelo de segundo orden, por ejemplo el método de mínimos cuadrados.
3. Existe una considerable experiencia práctica que indica que los modelos de segundo orden funcionan bien en la solución de problemas de la superficie de respuesta real.

En general, el modelo de primer orden es:

$$\eta = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \dots + \beta_kx_k \quad (5)$$

Y el modelo de segundo orden:

$$\eta = \beta_0 + \sum_{j=1}^k \beta_jx_j + \sum_{j=1}^k \beta_{jj}x_j^2 + \sum_{i < j=2}^k \sum \beta_{ij}x_ix_j \quad (6)$$

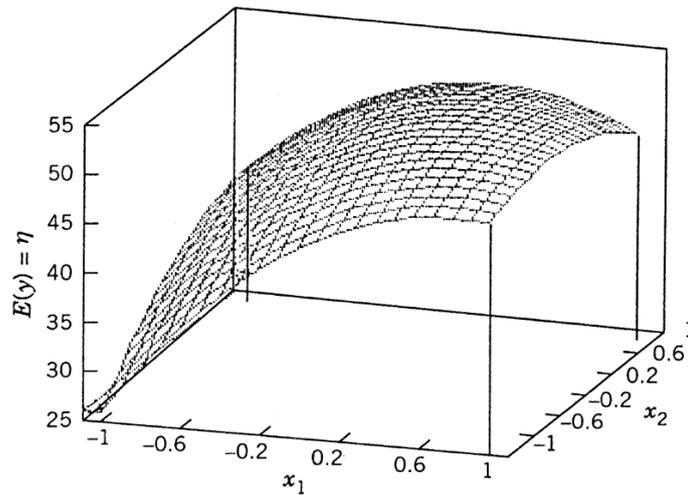
### 2.5.1. TERMINOLOGÍA

#### a. FUNCIÓN OBJETIVO

La función objetivo es la ecuación que expresa matemáticamente los objetivos de la optimización para transformarlos en una que integre los diferentes requisitos a cumplir. La definición de la función objetivo es un punto complicado y a la vez es decisivo en el proceso de optimización (Hernández 2006).

#### b. SUPERFICIE RESPUESTA

Se define como la representación geométrica del modelo matemático obtenido (Figura 5) (Ayala y Pardo 1995).

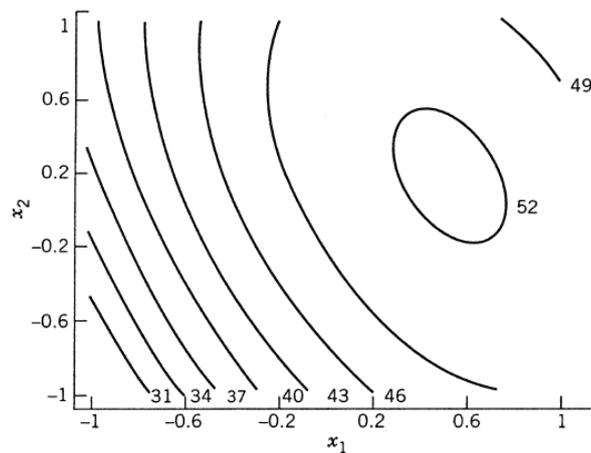


**Figura 5: Superficie Respuesta en tres dimensiones.**

FUENTE: Tomado de Myers *et al.* 2016.

**c. GRÁFICA DE CONTORNO**

La grafica de contorno facilita la visualización de la forma de una superficie de respuesta en tres dimensiones. En ésta, las curvas de los valores iguales de respuesta se grafican en un plano donde los ejes coordenados representan los niveles de los factores. Cada curva representa un valor específico de la altura de la superficie, es decir un valor de la variable dependiente. Esto se muestra en la Figura 6. Esta gráfica ayuda a enfocar nuestra atención en los niveles de los factores a los cuales ocurre un cambio en la altura de la superficie (Pasasrini *et al.* 2012).

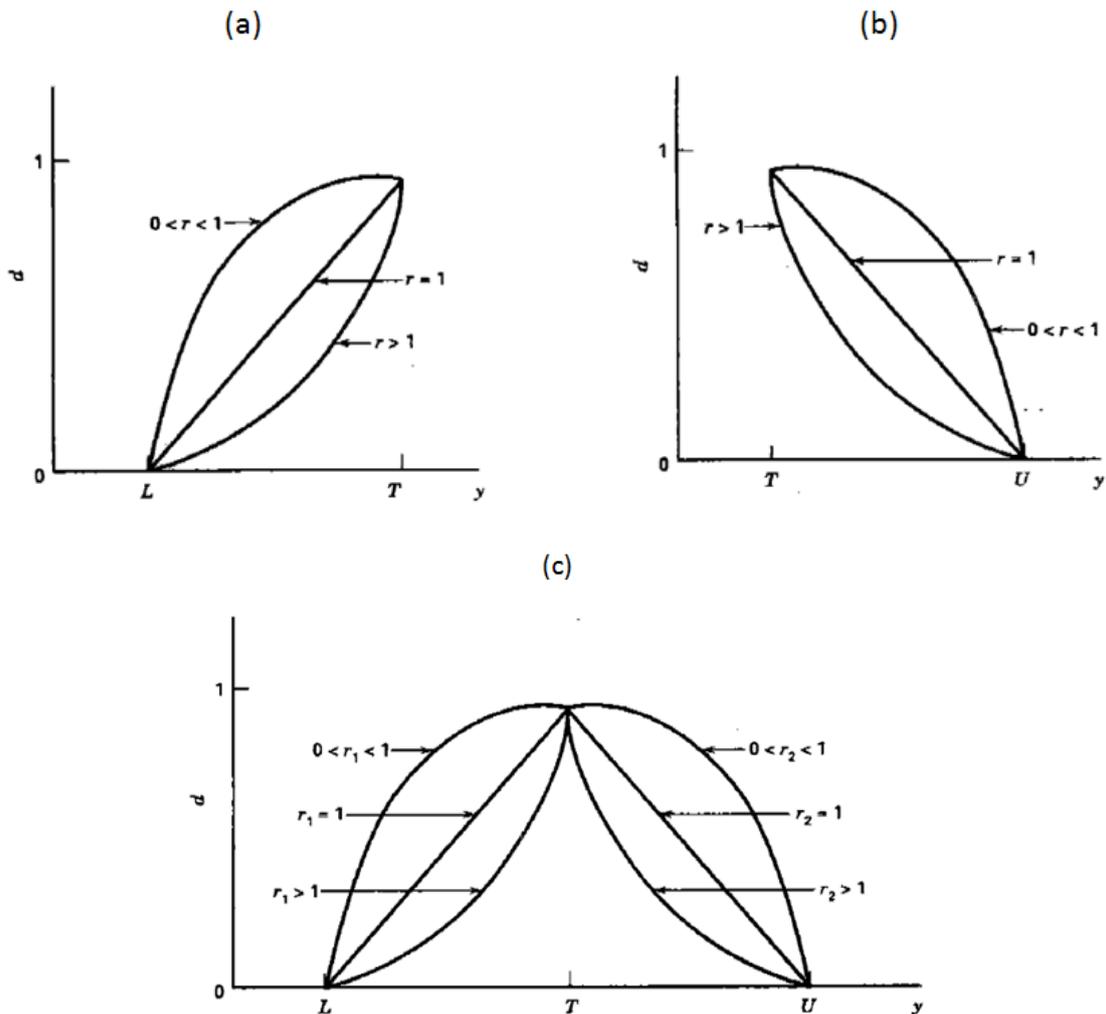


**Figura 6: Gráfica de contorno**

FUENTE: Adaptado de Myers *et al.* 2016.

#### d. DESEABILIDAD

La deseabilidad es la función de maximizar o minimizar la variable respuesta, generalmente se utiliza cuando se tiene diversas respuestas. La función de deseabilidad ( $r$ ) expresa la deseabilidad de un valor respuesta igual a “d” sobre una escala de 0 a 1. Esta función toma algunas de las tres formas, dependiendo hasta donde la respuesta debe ser maximizada, minimizada o alcanzar un valor objetivo (Figura 7) (Ayala y Pardo 1995, Montgomery 2004).



**Figura 7: Funciones deseables individuales; (a) cuando el objetivo es maximizar, (b) cuando el objetivo es minimizar y (c) cuando hay un objetivo específico**

FUENTE: Elaborado con base en Montgomery 2004.

**e. ROTABILIDAD**

La capacidad de giro o rotabilidad es la característica de un diseño de poseer la misma distancia en cualquiera de los lugares que se encuentran los puntos a analizar con el objetivo de proporcionar estimaciones precisas en todas las direcciones. Es decir, la varianza es constante, lo que se observa en un diseño esférico (Anderson Cook *et al.* 2009). Por otra parte, un diseño rotable no necesariamente implica que tenga la capacidad de giro (Myers *et al.* 2016).

**f. ORTOGONALIDAD**

Un ingrediente clave en la elección de un diseño que minimiza la varianza de los parámetros del modelo implica el examen de ortogonalidad. Un diseño ortogonal es un diseño cuya matriz es diagonal. De lo mencionado, resulta evidente que las columnas de una matriz son mutuamente ortogonales, por lo tanto si dos columnas son ortogonales, los niveles de las dos variables correspondientes son linealmente independientes (Jiménez 2015, Myers *et al.* 2016).

**g. COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN**

Es una medida de la variabilidad de  $y$  obtenido mediante el uso de las variables  $x_1, x_2, \dots, x_k$  del modelo. Se sabe, que dicha medida varía entre 0 y 1, sin embargo, un valor cercano a 1 no implica necesariamente que el modelo de regresión sea bueno, ya que si se adiciona una variable al modelo, el coeficiente tiende a aumentar, independientemente de si la variable adicional es estadísticamente significativa o no. Por lo tanto, es necesario considerar el coeficiente de determinación ajustado el cual tiende a disminuir si es que se agregan términos innecesarios (Anderson Cook *et al.* 2009). Cuando estos términos difieren significativamente puede interpretarse que el modelo considera términos innecesarios.

## **2.5.2. ETAPAS DE OPTIMIZACIÓN**

### **a. SCREENING O CRIBADO**

Según Ayala y Pardo (1995), el principal objetivo de esta etapa es identificar aquellas variables que son significativas para el proceso. Es decir, identificar aquellas variables que al hacerlas variar de un nivel bajo a uno alto, afectan sensiblemente las respuestas de un proceso, para que con ello, se pueda eliminar las variables poco significativas.

Para ésta etapa se puede utilizar diseños experimentales de primer orden, como: Diseño factorial, factorial fraccionada y Plackett y Burman (Ayala y Pardo 1995, Montgomery 2004, Myers *et al.* 2016).

### **b. ESCALAMIENTO**

Una vez encontradas las variables más significativas, se inicia la segunda etapa de optimización denominada “escalamiento”, que consiste en escalar sucesivamente hasta la región óptima. Para ello, se emplea diseños experimentales secuenciales como: Búsqueda Simple, Búsqueda múltiple (Directos) y Método de pendientes ascendentes o descendentes (Indirectos) (Ayala y Pardo 1995, Montgomery 2004).

### **c. OPTIMIZACIÓN FINAL**

Ya ubicada la región experimental que encierra el óptimo, en esta región los efectos de segundo orden son mayores en valor absoluto a los efectos de primer orden, lo que indica, que esta región puede ser descrito apropiadamente mediante modelos matemáticos de segundo orden. En otras palabras, se traslapa la superficie respuesta estimada con la superficie respuesta real, si ésta encaja se afirmarí que la superficie respuesta predicha describe satisfactoriamente la región optima del proceso (Ayala y Pardo 1995).

En esta etapa de optimización final se debe elegir el modelo estadístico a utilizar de acuerdo a los siguientes criterios (Anderson Cook *et al.* 2009):

1. El resultado de un buen ajuste del modelo a los datos.

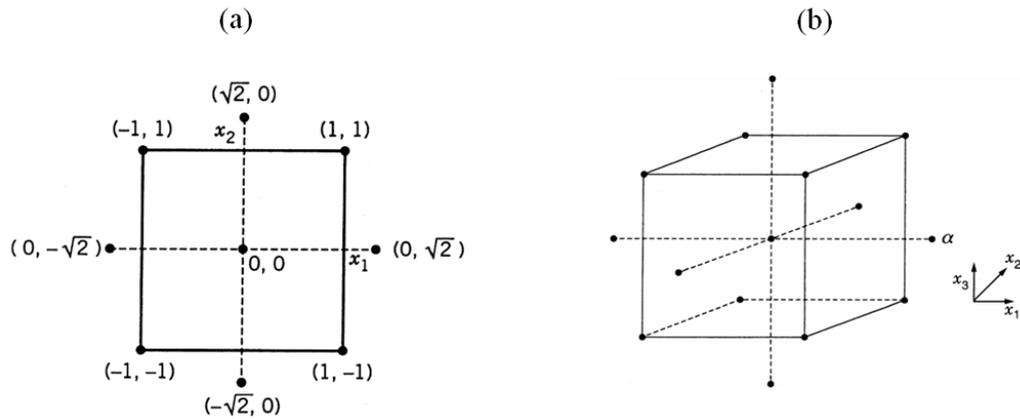
2. Proporcionar información suficiente para permitir una prueba de falta de ajuste.
3. Permitir que los modelos estén contruidos de forma secuencial.
4. Proporcionar una estimación del error experimental "pura".
5. Ser insensible (robusta) a la presencia de valores atípicos en los datos de salida.
6. Ser robusto a errores en el control de los niveles de diseño.
7. Ser rentable, es decir, no requiere demasiados experimentos.
8. Permitir experimentos en bloque.
9. Proporcionar un control de la varianza homogénea.
10. Proporcionar una buena distribución de la varianza de la respuesta prevista a través de la región de diseño.

A continuación se describirá los diseños que pueden ser utilizados para la etapa de optimización:

- **Diseño compuesto central (DCC)**

Los diseños centrales compuestos son diseños que consisten en  $2^k$  puntos factoriales, con  $2k$  combinaciones adicionales llamadas puntos axiales y  $n_c$  puntos centrales. Dependiendo de la elección de  $a$  en los puntos axiales, el diseño central compuesto puede tener diferentes propiedades como ortogonalidad, rotabilidad y uniformidad. Se considerará solamente una propiedad deseable en estos diseños consistente en que la varianza de los valores estimados sea constante en puntos equidistantes del centro del diseño, es decir, que se cumpla la rotabilidad (Jiménez 2015, Myers *et al.* 2016).

Los puntos factoriales representan un diseño de varianza óptimo para un modelo de primer orden o un modelo de interacción de dos factores de primer orden. La repetición de los puntos centrales busca proporcionar claramente la información sobre la existencia de curvatura en el sistema. Si se encuentra la curvatura en el sistema, la adición de puntos axiales permite la estimación eficiente de los términos cuadráticos puros (Myers *et al.* 2016).



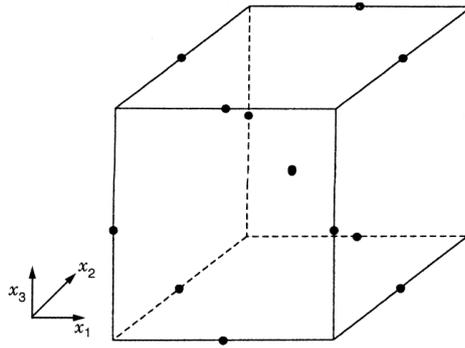
**Figura 8:** (a) DCC con  $k=2$   $\alpha=\sqrt{2}$  y (b) DCC con  $k=3$  y  $\alpha=\sqrt{3}$

FUENTE: Tomado de Myers *et al.* 2016.

- **Diseño Box Behnken (DBB)**

EL DBB es usado por los investigadores con el objetivo de analizar niveles distanciados equidistantemente, debido a que de esta manera se permite una estimación eficiente de los coeficientes de primer y segundo orden, ya que no se desvía sustancialmente de la capacidad de rotación (Ayala y Pardo 1995).

Otra característica importante de la DBB es que se trata de un diseño esférico. Por ejemplo, en el caso  $k = 3$ , todos los puntos son los llamados "puntos de borde" (Figura 9); en éste todos los puntos de borde están a una distancia  $\sqrt{2}$  desde el centro de diseño. No hay puntos factoriales o puntos de la cara a diferencia del DCC. Este último muestra puntos en las esquinas del cubo y puntos factoriales que no están a la misma distancia del centro de diseño, aunque todos ellos residen en el cubo y proporcionan una buena cobertura del cubo. Por otro lado, a pesar de que no proporciona una total cobertura del cubo resulta muy útil si es que no se está interesado en la predicción de la respuesta en los extremos, ya que éste diseño es de naturaleza esférica analizando un amplio centro por su capacidad giratoria o rotativa (Anderson Cook *et al.* 2009, Myers *et al.* 2016).



**Figura 9: DBB con k=3**

FUENTE: Tomado de Myers *et al.* 2016.

## 2.6. DISEÑO DE MEZCLAS

Existen muchos problemas industriales donde las variables de respuesta (de interés) en el producto son una función de las proporciones de los diferentes ingredientes utilizados en su formulación. Es así que, los diseños de mezcla son un tipo especial de problema de superficie de respuesta en que las variables de entrada (también llamados variables independientes o factores) son los componentes de una mezcla y la respuesta depende de las proporciones relativas de los componentes y no a su cantidad total (Anderson Cook *et al.* 2009, Myers *et al.* 2016). Debido a que, las proporciones de componentes deben sumar uno, los niveles de los componentes son diseños dependientes y estándar, por lo tanto, analizar el problema en una región cuboidal o esférico no es apropiado (Anderson Cook *et al.* 2009). Un experimento de mezcla con componentes  $q$ , donde  $x_i$  es la proporción del componente  $i$ -ésimo, satisface la siguiente restricción:

$$0 \leq x_i \leq 1, \forall i = 1, 2, \dots, q \quad (7)$$

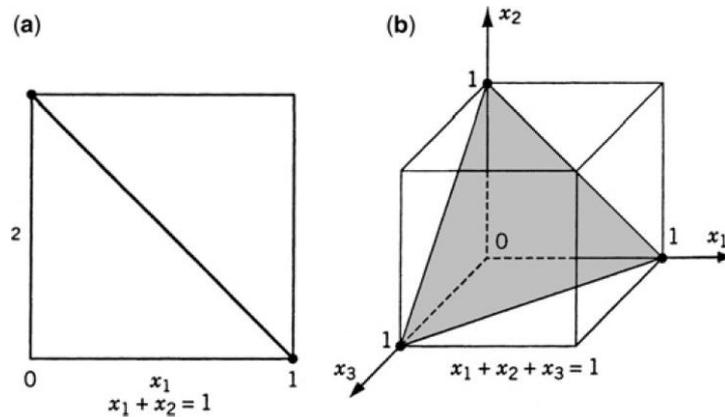
y

$$\sum_{i=1}^q x_i = 1 \quad (8)$$

La restricción hace que los niveles de los factores  $x_i$  dependan entre sí. Esto es lo que hace que se diferencien los experimentos de mezcla de los experimentos de superficie respuesta.

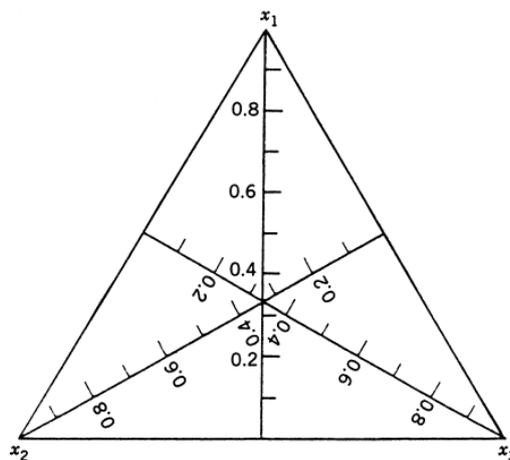
Las restricciones en la Ecuación 7 y 8 son ilustradas en la Figura 10a para componentes  $q=2$  y  $q=3$ . Para dos componentes, el espacio factorial viable para el experimento de mezcla

incluye todos los valores de los dos componentes formando un segmento que conecta todos los posibles valores de la mezcla. En el caso de tres componentes, el espacio factorial viable corresponde a la Figura 10b, en el cual se observa que los vértices corresponden a mezclas puras, es decir una mezcla que corresponde al uso de un solo componente. Por otro lado, los bordes del triángulo representan mezclas binarias y el centro del triángulo corresponde a la mezcla de los tres componentes, esto se ilustra mejor en la Figura 11.



**Figura 10: Restricciones del espacio factorial con (a) dos componentes y (b) tres componentes**

FUENTE: Tomado de Myers *et al.* 2016.



**Figura 11: Sistema de coordenadas Simplex de tres componentes**

FUENTE: Adaptado de Myers *et al.* 2016.

### 2.6.1. DISEÑO SIMPLEX LATTICE

Un diseño Simplex Lattice es un conjunto de puntos uniformemente ubicados en un simplex (región experimental de un problema de mezcla). Consiste en definir los puntos mediante las consideraciones siguientes: Las proporciones tomados para cada componente son  $m+1$  valores espaciados desde 0 a 1 (Anderson Cook *et al.* 2009, Myers *et al.* 2016).

$$X_i = 0, \frac{1}{m}, \frac{2}{m}, \dots, 1, \quad i = 1, 2, \dots, q \quad (9)$$

Y son usadas todas las combinaciones posibles (mezclas) de las proporciones. Por ejemplo, con  $q=3$  y  $m=2$ , se tiene un diseño Simplex Lattice  $\{3,2\}$  con tres vértices  $(1, 0, 0)$ ,  $(0, 1, 0)$  y  $(0, 0, 1)$  son mezclas puras, y los puntos  $(\frac{1}{2}, \frac{1}{2}, 0)$ ,  $(\frac{1}{2}, 0, \frac{1}{2})$  y  $(0, \frac{1}{2}, \frac{1}{2})$  son mezclas binarias localizadas en el punto medio de los bordes del triángulo. En general, un diseño Simplex Lattice con notación  $\{q, m\}$  implica un diseño con  $q$  componentes que soporta una mezcla polinomial de grado  $m$ . El número de puntos experimentales se halla de la siguiente manera:

$$N = \frac{(q+m-1)!}{m!(q-1)!} \quad (10)$$

El modelo de segundo orden tiene la siguiente forma:

$$n = \sum_{i=1}^q \beta_i x_i + \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j \quad (11)$$

Donde  $\beta_i$  es la respuesta esperada en el componente puro  $i$  y  $\beta_{ij}$  es la respuesta esperada de la mezcla cuadrática de los componentes  $i$  y  $j$ , el cual representa la respuesta en exceso. Esto es usualmente llamado sinergismo (o antagonismo) debido a la mezcla no lineal. Si  $\beta_{ij}$  es positivo se muestra el sinergismo y si es negativo se muestra el antagonismo (Myers *et al.* 2016).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN**

La investigación se realizó en el área de Biotecnología Industrial del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima – Perú.

#### **3.2. MATERIA PRIMA E INSUMOS**

##### **3.2.1. HARINA DE YACÓN**

Se empleó harina de yacón producida a partir de raíces de yacón adquiridas en el Mercado Mayorista N°2 de Frutas de Lima (La Victoria), utilizando el procedimiento descrito por Campos *et al.* (2016).

##### **3.2.2. ENZIMAS**

- Invertase® ( $\beta$ -D- fructohidrolasa- D -fructofuranosidasa) (200000 SU/g) obtenida de la *Saccharomyces cerevisiae* (NOVO Nordisk, Copenhagen, Denmark).
- Inulinasa ( $\beta$ -D-2,1- fructano fructohidrolasa) ( $\geq 200$  INU/g), endoinulinasa obtenida a partir del *Aspergillus niger* (Sigma Aldrich, USA).

Los valores de actividad enzimática para ambas enzimas, fueron determinados en el laboratorio. Así la actividad enzimática de la inulinasa e invertasa fueron de 3.5 y 0.186 (mmol fructosa/ml.minuto = U/g o U/ml), respectivamente. Utilizando inulina al 3 por ciento. Dichos valores de actividad enzimática fueron empleados en la optimización de la hidrólisis enzimática.

### 3.3. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

#### 3.3.1. MATERIALES

- Columna cromatográfica AQUITY UPLC® BEH Amide (1.7 µm) (Waters, Ireland)
- Ependorfs
- Envase de vidrio hermético 5 ml
- Falcón de 15 y 50 ml
- Filtros 0.22 µm ( *Millipore* Millex – GV)
- Gradillas
- Guarda columna VANGUARD TM BEH Amide (1.7 µm) (Waters, Ireland)
- Jeringas de 1.0 ml.
- Micropipetas de 20-200 µl, 100-10000 µl, 1000-5000 µl
- Magnetos
- Matraces Erlenmeyer de 100 ml
- Materiales de vidrio (Probetas, Kitasato, Beakers, tubos de ensayo, fiolas, vasos precipitados)
- Membrana para diálisis (Sigma –Aldrich)
- Papel Whatman
- Pipetas de 2 y 10 ml

#### 3.3.2. EQUIPOS

- Agitador magnético (CAT®, modelo M6, Alemania)
- Agitador Vórtex (VELP Scientifica ®, modelo F202A0175, España)
- Balanza analítica (OHAUS®, modelo AR2140, EE.UU.)
- Balanza de precisión (OHAUS®, modelo Scout, China)
- Baño maría con agitación (GFL®, modelo 1083, Alemania)
- Bomba de vacío (Vacuumbrand®, modelo ME2C, Alemania)
- Campana desecadora
- Campana extractora (Esco Frontier Duo™ , modelo EDFD-4B, EEUU.)
- Centrífuga (Hettich®, modelo Rotofix 32, Alemania)
- Cocina eléctrica (Ingresa, Perú)

- Congelador (Electrolux®, modelo H300, Brasil)
- Cromatógrafo de Fase Líquida de *Ultra Performance (UPLC) Waters Separation Module* (Waters, Ireland) con detector de índice de refracción (Waters, Ireland)
- Espectrofotómetro (Thermo Spectronic™, modelo Genesys 20 UV, EE.UU.)
- Estufa al vacío (Shellab®, modelo 1400 E-2, EE.UU.)
- Potenciómetro digital (Thermo Orion®, modelo 410, EE.UU.)
- Purificador de agua (Simplicity® Water purification System, EEUU.)
- Refractómetro de mano 0-32 °Brix (VWR®, BX Series, EE.UU.)
- Refractómetro de mano 30-60 °Brix (VWR®, BX Series, EE.UU.)
- Refrigerador (LG®, modelo GR-482BEF, Corea)
- Rotavapor (Heidolph®, modelo Heizbad HB, Alemania)
- Selladora (Machintek®, modelo KF-300H, EE.UU.)

### 3.3.3. REACTIVOS

- Acetato de sodio (p.a. Merck , Germany)
- Acetona grado HPLC
- Acetonitrilo (grado HPLC.J.T. Baker, USA)
- Ácido 3,5- dinitrosalicílico (p.a. Sigma, USA)
- Ácido acético glacial (p.a. J.T. Baker, USA)
- Ácido fosfórico 85 % (p.a. J.T. Baker, USA)
- Ácido sulfúrico al 99% (Merck)
- Agua destilada
- Ácido tetrahilamide
- Bisulfito de sodio (Mallinckrodt, México)
- Hidróxido de calcio (p.a.Merck, Germany)
- Hidróxido de sodio en perlas (p.a.J.T.Baker, México)
- Tartrato de sodio y potasio (Scharlau, Spain)

### **3.4. MÉTODOS DE ANÁLISIS**

#### **3.4.1. DETERMINACIÓN DE SÓLIDOS SOLUBLES**

Se determinó el contenido de sólidos solubles en el extracto concentrado y extracto clarificado y decolorado obtenidos a partir de la harina de yacón usando un refractómetro de mano, previamente calibrado. Se siguió el método 932.14-C de la AOAC (1995), reportándose los resultados en grados Brix.

#### **3.4.2. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE AZÚCARES REDUCTORES**

Para el análisis de azúcares reductores se utilizó el método de Miller (1959), éste es un método colorimétrico, el cual se basa en la reacción entre el ácido 3,5 dinitrosalicílico y el grupo reductor de la fructosa o glucosa, formando un compuesto de color marrón cuya intensidad (medida como absorbancia) es proporcional a la cantidad de azúcares reductores presentes. Durante este proceso, el grupo aldehído del azúcar reductor se oxida en su respectivo ácido carboxílico. La absorbancia fue medida a una longitud de onda de 550 nm. Los valores de absorbancia fueron llevados a una curva estándar de fructosa (ANEXO 1). Los resultados se expresaron en gramos de fructosa equivalente/100 ml solución de extracto.

#### **3.4.3. DETERMINACIÓN DE AZÚCARES Y FOS MEDIANTE UPLC**

Los azúcares (glucosa, fructosa y sacarosa) fueron analizados de acuerdo a los protocolos de Jaime *et al.* (2001), Pedreschi *et al.* (2003) y Campos *et al.* (2009) con ligeras modificaciones. Para ello, los extractos de yacón (sometidos o no a hidrólisis) fueron diluidos al 50 por ciento con acetonitrilo y posteriormente los azúcares fueron identificados y cuantificados en un UPLC-IR utilizando el software Empower. La columna de separación empleada fue una ACQUITY UPLC® BEH Amide (1.7  $\mu\text{m}$ ) y una guarda columna VANGUARD™ BEH Amide (1.7  $\mu\text{m}$ ). La fase móvil estuvo compuesta por acetona: agua (77:23, v/v) con 0.05 por ciento trietilamina (p/v). Previo a su paso por el UPLC todas las muestras fueron filtradas con un filtro de 0.22  $\mu\text{m}$ . Un volumen de muestra de 2  $\mu\text{L}$  fue inyectado al equipo, bajo un tiempo de corrida de 10 min a 85 °C, bajo un flujo de 0.15 ml/min. Los azúcares fueron identificados y cuantificados al comparar los tiempos de

retención con los de los estándares previamente inyectados (glucosa, fructosa y sacarosa). La concentración de FOS en el extracto inicial de yacón también fue determinada con el UPLC-IR siguiendo el procedimiento de cálculo reportadas por Prosky y Hoebregs, citado por Pedreschi *et al.* (2003) (Ecuaciones 12, 13 y 14). Los resultados se expresaron como: Fructosa, Glucosa, Sacarosa y FOS en porcentaje.

$$G = GT - (S/1.9) - GF \quad (12)$$

$$F = FT - (S/1.9) - FF \quad (13)$$

Dónde:

S = Sacarosa, G = Glucosa liberada de los fructanos, GT= Glucosa total, S/1.9 = Glucosa o Fructosa liberada proveniente de la sacarosa, GF = Glucosa libre, F = Fructosa liberada de los fructanos, FT = fructosa total, FF = Fructosa libre.

El contenido total de FOS (Ecuación 3) se determinó de la suma de G y F, corregida (factor K) por la pérdida de agua durante la hidrólisis:

$$\text{FOS totales (\%)} = k (G + F) \quad (14)$$

Dónde:

K= 0.925; el cual es un factor de corrección para oligómeros de fructanos.

#### **3.4.4. RENDIMIENTO DE CONVERSIÓN DE SACAROSA Y FOS DEL EXTRACTO DE YACÓN A FRUCTOSA**

Se calculó tomando en cuenta el cociente entre la cantidad de fructosa (g) liberada respecto a un litro (L) de extracto de yacón.

### **3.5. METODOLOGIA EXPERIMENTAL**

#### **3.5.1. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO BRUTO DE YACÓN**

Se empleó el procedimiento descrito por Inga *et al.* (2015). Para ello, se mezcló la harina de yacón con agua destilada en proporción 1:30 (g/ml), el conjunto se mantuvo a la temperatura

de 30 °C bajo agitación constante por 10 min. Posteriormente, la mezcla fue filtrada separando la torta. El sobrenadante obtenido se denominó extracto bruto de yacón.

### **3.5.2. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO CLARIFICADO DE YACÓN**

Se obtuvo el extracto clarificado a partir del extracto bruto anteriormente mencionado. Este procedimiento se realizó en base a los estudios de Doherty *et al.* (2002), Prati y Moretti (2010), Ward (2012), Laksameethanasan *et al.* (2013) y Kina (2016), con algunas modificaciones. Se agregó lechada de cal al 50 por ciento (p/v) para lo cual se empleó hidróxido de calcio al extracto bruto hasta llegar a pH 11, luego se calentó la solución a 40 °C por 5 minutos. Dichos autores mencionan que la cal participa en la formación de sales insolubles que luego son floculados por acción del calor.

Posteriormente, el conjunto se centrifugó a 3756 g por 10 minutos y se separó el precipitado del sobrenadante. El sobrenadante fue recolectado y llevado a pH 7 con una solución de ácido fosfórico uno molar, formando más sales que aumentan el efecto “red” de los aglomerados. Luego, la solución fue calentada hasta 90 °C por 2 minutos bajo agitación constante. Una última centrifugación a 3756 g por 10 minutos fue realizada, se recolectó el sobrenadante, siendo éste el extracto clarificado de yacón. El extracto obtenido se concentró en un rotavapor (< 60 °C) a 45 °Brix, éste fue empleado como “extracto madre” para las diversas pruebas hidrolíticas realizadas.

### **3.5.3. HIDRÓLISIS QUÍMICA DEL EXTRACTO DE YACÓN**

La hidrólisis se llevó a cabo sobre el extracto clarificado obtenido de la etapa anterior. Se contempló la evaluación de dos tipos de ácidos: el ácido fosfórico y sulfúrico (la selección de éstos ácidos ha sido tomada de trabajos previos reportados en la literatura, Pekic *et al.* 1984, Blecker *et al.* 2002, Szambelan y Nowak 2006). En todas las pruebas de hidrólisis se trabajó con el extracto clarificado de FOS al uno por ciento. Las variables que fueron evaluadas en la hidrólisis química fueron: pH, temperatura y tiempo, las variables también seleccionadas de acuerdo a lo reportado en la literatura (Szambelan y Nowak 2006, Eskandari *et al.* 2009, Sarchami y Rehmann 2014). Para evaluar la influencia de las variables seleccionadas sobre la obtención de fructosa a partir de la hidrólisis del extracto de yacón, se utilizó un diseño de superficie de respuesta que, permitió definir la combinación de los

factores para la etapa de la optimización, el diseño seguido se describe en la sección de diseño experimental (acápite 3.6.1). Las condiciones de hidrólisis fueron optimizadas para cada ácido (indicados arriba) siendo la respuesta la mayor cantidad de fructosa liberada a partir del extracto clarificado de yacón.

#### **3.5.4. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL EXTRACTO DE YACÓN**

Se estudió la hidrólisis con dos enzimas, invertasa (E.C.3.2.1.26;  $\beta$ -D- fructohidrolasa- D – fructofuranosidasa) e inulinasa (E.C.3.2.1.7;  $\beta$ -D-2,1- fructano fructohidrolasa) trabajando con cada una de ellas individualmente. Al igual que el caso anteriormente descrito, las pruebas se hicieron en el extracto clarificado de yacón con uno por ciento de FOS. Las variables evaluadas fueron: la concentración de enzimas (expresadas como unidades de actividad enzimática por gramo de FOS, U/g FOS) y el tiempo. Los parámetros temperatura (50 °C) y pH (5.0) fueron los óptimos recomendados para la acción de dichas enzimas (Wenling *et al.* 1999, Rocha *et al.* 2006, Kurakake *et al.* 2010, Li *et al.* 2015 y Liu *et al.* 2016). Para la evaluación de las variables indicadas en el proceso de hidrólisis, también se hizo uso de un diseño de superficie de respuesta. El diseño seguido se describe en la sección de diseño experimental (acápite 3.6.2). Las condiciones de hidrólisis fueron optimizadas para cada enzima (indicadas arriba) teniendo como respuesta la mayor cantidad de fructosa liberada a partir del extracto de yacón.

#### **3.5.5. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA MEDIANTE EL DISEÑO DE MEZCLAS**

Además de la hidrólisis enzimática usando las enzimas individualmente, se estudió la hidrólisis con la mezcla de ambas enzimas (anteriormente mencionadas). Las variables de la mezcla fueron: la concentración de enzimas (expresadas como unidades de actividad enzimática, U) y la concentración de FOS (porcentaje), en un volumen determinado. Los parámetros temperatura (50 °C) y pH (5.0) fueron los óptimos recomendados para la acción de dichas enzimas y el tiempo de reacción fue de 120 min, valor máximo del rango de niveles analizados de los diseños anteriores. Para la evaluación de las variables indicadas en el proceso de hidrólisis, se hizo uso del diseño de mezcla. El diseño seguido se describe en la sección de diseño experimental (acápite 3.6.3). Las condiciones de hidrólisis fueron optimizadas para cada variable de la mezcla teniendo como respuesta la mayor cantidad de fructosa liberada a partir del extracto de yacón.

### 3.6. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

#### 3.6.1. HIDRÓLISIS QUÍMICA

Para la hidrólisis química del extracto de yacón, no se realizó una etapa de “*screening*”, ni escalamiento, ya que se toma como referencia las variables significativas y los rangos de estudio de la hidrólisis química de la Inulina de la literatura (Pekic *et al.* 1984, Blecker *et al.* 2002, Eskandari *et al.* 2009, Sarchami y Rehmann 2014).

La MSR fue empleada para determinar la influencia de las variables independientes seleccionadas y las condiciones óptimas para la liberación de la fructosa a partir del extracto de yacón. Las variables independientes consideradas (factores) y sus niveles se presentan en el Cuadro 4.

**Cuadro 4: Variables independientes y sus niveles**

VARIABLES/FACTORES	NIVEL BAJO	NIVEL ALTO
pH (X <sub>1</sub> )	1.0 (-1)	3.0 (1)
Tiempo (min) (X <sub>2</sub> )	20 (-1)	70 (1)
Temperatura (°C) (X <sub>3</sub> )	60 (-1)	98 (1)

La MSR siguió un diseño del tipo “Box Behnken”, así al introducir las variables y sus niveles al diseño mencionado, un total de 17 corridas, que incluyeron cinco puntos centrales, fueron generados, las cuales se presentan en el Cuadro 5. Las corridas fueron evaluadas de forma independiente para cada tipo de ácido en estudio. La respuesta medida fue la cantidad de fructosa (g) liberada a partir de la hidrólisis del extracto de yacón. Todas las corridas se realizaron por triplicado y en forma aleatoria. Las superficies de respuesta generadas fueron graficadas variando dos factores dentro del rango experimental evaluado y manteniendo la tercera constante al punto central. El análisis estadístico se realizó con el *software* Statgraphics Centurion XV (Stat Point Inc., VA, USA) y Minitab® 17.1.0 (LEAD Technologies, Inc., USA).

**Cuadro 5: Arreglo del diseño Box Behnken de la MSR para la etapa de optimización de la hidrólisis química del extracto de yacón**

CORRIDA	VARIABLES Y SUS NIVELES		
	pH (X <sub>1</sub> )	Tiempo (X <sub>2</sub> )	Temperatura (X <sub>3</sub> )
1	2 (0)	20 (-1)	98 (1)
2	3 (1)	45 (0)	98 (1)
3	2 (0)	45 (0)	79 (0)
4	2 (0)	70 (1)	60 (-1)
5	2 (0)	45 (0)	79 (0)
6	1 (-1)	45 (0)	98 (1)
7	2 (0)	45 (0)	79 (0)
8	1 (-1)	45 (0)	60 (-1)
9	2 (0)	20 (-1)	60 (-1)
10	2 (0)	45 (0)	79 (0)
11	3 (1)	70 (1)	79 (0)
12	3 (1)	20 (-1)	79 (0)
13	2 (0)	70 (1)	98 (1)
14	3 (1)	45 (0)	60 (-1)
15	1 (-1)	70 (1)	79 (0)
16	2 (0)	45 (0)	79 (0)
17	1 (-1)	20 (-1)	79 (0)

### 3.6.2. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

Para la hidrólisis enzimática del extracto de yacón, no se realizó una etapa de “*screening*”, ni escalamiento, ya que se toma como referencia las variables significativas y los rangos de estudio de la hidrólisis enzimática de la Inulina de la literatura (Szambelan y Nowak 2006, Ricca *et al.* 2009, Sarchami y Rehmann 2014).

La MSR fue empleada para determinar la influencia de las variables independientes, seleccionadas en la etapa anterior, y las condiciones óptimas para la liberación de la fructosa a partir de la hidrólisis del extracto de yacón. Se utilizó dos enzimas, una endo-inulinasa y

una invertasa. Se evaluó dos variables: concentración de enzima y tiempo (Cuadro 6) y en todos los casos se consideró constantes la concentración de FOS (1%), así como los dos parámetros de actividad óptima de ambas enzimas, pH (5.0) y temperatura (50 °C).

**Cuadro 6: Variables independientes y sus niveles**

VARIABLES/FACTORES	NIVEL BAJO	NIVEL ALTO
Tiempo (min) (X <sub>1</sub> )	50(-1)	120(1)
Concentración de enzima [E/S] (U/g de FOS) (X <sub>2</sub> )	2 (-1)	10 (1)

La MSR se realizó mediante un Diseño Central Compuesto (DCC). Al introducir las variables y sus niveles al diseño DCC, un total de 13 corridas que incluyen cinco puntos centrales fueron generados, las cuales se presentan en el Cuadro 7; como se indicó anteriormente se desarrolló el arreglo del DCC independientemente para cada una de las dos enzimas evaluadas.

**Cuadro 7: Arreglo del DCC de la MSR para la etapa de optimización de la hidrólisis enzimática del extracto de yacón**

CORRIDA	VARIABLES Y SUS NIVELES	
	Tiempo (X <sub>1</sub> )	[E/S] (X <sub>2</sub> )
1	85 (0)	0.34 (-1.41)
2	50 (-1)	2 (-1)
3	85 (0)	11.7 (1.41)
4	120 (1)	2 (-1)
5	50 (-1)	10 (1)
6	36 (-1.41)	6 (0)
7	85 (0)	6 (0)
8	85 (0)	6 (0)
9	120 (1)	10 (1)
10	85 (0)	6 (0)
11	85 (0)	6 (0)

«Continuación»

12	85 (0)	6 (0)
13	134 (1.41)	6 (0)

La superficie de respuesta generada para obtener la máxima cantidad de fructosa liberada, fueron experimentalmente validados con tres repeticiones y los valores a obtener fueron comparados con los predichos por el modelo matemático generado. Se graficó las superficies utilizando dos variables dentro del rango experimental evaluado y manteniendo las otras constantes al punto central (0). El análisis estadístico se realizó con el *software* Statgraphics Centurion XV (Stat Point Inc., VA, USA) y Minitab® 17.1.0 (LEAD Technologies, Inc., USA).

### 3.6.3. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA USANDO EL DISEÑO DE MEZCLAS

El diseño de mezclas fue empleado para determinar la influencia de los componentes de la mezcla (variables independientes): concentración de inulinasa (endo- inulinasa), concentración de invertasa y porcentaje de FOS (Cuadro 8), sobre la liberación de la fructosa a partir de la hidrólisis del extracto de yacón. En todos los casos se consideró constantes los parámetros de actividad óptima de ambas enzimas, pH (5.0) y temperatura (50 °C), así como un tiempo de 120 min.

**Cuadro 8: Variables independientes y sus niveles.**

VARIABLES/FACTORES	NIVEL BAJO	NIVEL ALTO
Concentración de enzima inulinasa ( $10^{-2}$ U)( $X_1$ )	0 (0)	8 (1)
Concentración de enzima invertasa ( $10^{-3}$ U)( $X_2$ )	0 (0)	8 (1)
FOS (%) ( $X_3$ )	2 (0)	10 (1)

Al introducir las variables y sus niveles al diseño de Mezcla, un total de 11 corridas que incluyen cinco puntos centrales fueron generados, las cuales se presentan en el Cuadro 9.

La superficie de respuesta generada para obtener la máxima cantidad de fructosa liberada, fueron experimentalmente validados con tres repeticiones y los valores a obtener fueron comparados con los predichos por el modelo matemático generado. Se graficó las superficies utilizando el simplex en donde se muestra el efecto de las tres variables sobre el rendimiento

de fructosa. El análisis estadístico se realizó con el *software* STATISTICA (StatSoft Inc., USA).

**Cuadro 9: Arreglo del Diseño de Mezcla para la optimización de los componentes de la hidrólisis enzimática del extracto de yacón**

CORRIDA	VARIABLES Y SUS NIVELES		
	Inulina (10 <sup>-2</sup> U)(X <sub>1</sub> )	Invertasa (10 <sup>-3</sup> U)(X <sub>2</sub> )	FOS (%) (X <sub>3</sub> )
1	4(1/2)	0(0)	6(1/2)
2	4(1/2)	4(1/2)	2(0)
3	0(0)	4(1/2)	6(1/2)
4	8(1)	0(0)	2(0)
5	0(0)	8(1)	2(0)
6	0(0)	0(0)	10(1)
7	8(0)	0(0)	2(0)
8	4(1/2)	4(1/2)	2(0)
9	4(1/2)	0(0)	6(1/2)
10	0(0)	8(1)	2(0)
11	0(0)	4(1/2)	6(1/2)

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. CARACTERIZACIÓN DE LA HARINA DE YACÓN

En el Cuadro 10 se presenta la cantidad de azúcares reductores, FOS, sacarosa y humedad de la harina de yacón empleada.

**Cuadro 10. Características de la harina de yacón (\*)**

COMPONENTE	CONTENIDO
Azúcares reductores (% b.s.)	30.60 ± 0.71
FOS (% b.s.)	34.95 ± 0.41
Sacarosa (% b.s.)	6.04 ± 0.02
Humedad (%)	5.86 ± 0.07

(\*) Promedio de tres repeticiones

Grau y Rea, citado por Carvalho y Zapata (2015) mencionan que el Yacón (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. & Endl) tiene raíces tuberosas de sabor dulce por presentar carbohidratos, principalmente FOS, los cuales son polímeros de 3 a 10 moléculas de fructosas (Ohyama *et al.* 1990, Goto *et al.* 1995, Graefe *et al.* 2004). Para el caso de la presente investigación, la harina de yacón empleada tuvo un 34.9 por ciento de FOS (en base seca, b.s.) y 30.6 por ciento de azúcares reductores (b.s.), siendo valores muy próximos a los reportados por Mejía (2015) con 38.8 y 30.3 por ciento de FOS y azúcares reductores (b.s.), respectivamente. Valores mayores de FOS (55.3 por ciento, b.s.) y menores de azúcares reductores (22 por ciento, b.s.) han sido reportado por Lobo *et al.* (2007) en harina de yacón procedente de Sao Paulo (Brasil). Las diferencias pudieron deberse a la procedencia de la materia prima, tal como lo menciona Seminario *et al.* (2003), que indican que el contenido de FOS del yacón puede variar significativamente debido a diferentes factores como el cultivo, la época de siembra y cosecha, tiempo y temperatura en post cosecha, entre otros.

Campos *et al.* (2016) señalan que, la pérdida de FOS en las raíces de yacón puede verse favorecida por el rompimiento de los tejidos, mediando la liberación de enzimas del tipo hidrolasas, cuya acción se favorece dada la alta presencia de agua en la raíz, provocando la disminución de FOS y la transformación a azúcares simples (fructosa y glucosa). De otro lado, Inga *et al.* (2015), señalan que se ha reportado casos en que, las raíces de yacón pierden alrededor de 30 a 40 por ciento de los FOS tras una semana de almacenamiento a temperatura ambiental. Por lo que, resulta evidente que las condiciones a las que están sometidas las raíces durante su manipulación, traen como consecuencia la despolimerización de los FOS (Campos *et al.* 2016), esta degradación da lugar al rompimiento de sus cadenas liberando azúcares, que en su mayoría son fructosas. Por lo tanto, considerando aquellas cosechas en donde la factibilidad de extracción de FOS se vea afectada por su bajo contenido de éste, se pretende buscar como alternativa optimizar los parámetros de hidrólisis del extracto de yacón para maximizar la obtención de fructosa.

#### **4.2. CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO CLARIFICADO DE YACÓN**

El extracto clarificado de yacón, obtenido según lo indicado en los acápites 3.5.1 y 3.5.2, presentó contenidos de FOS, fructosa, glucosa y sacarosa de 24, 15.2, 8.3 y 4.1 por ciento, respectivamente. Este extracto considerado el “extracto madre” fue llevado a diferentes concentraciones según los diseños estadísticos empleados. Para el caso de los diseños de MSR, la concentración de FOS fue de uno por ciento, y para el caso del diseño de mezclas se llevó a concentraciones desde 2 a 10 por ciento.

#### **4.3. OPTIMIZACIÓN DE LA HIDRÓLISIS QUÍMICA DEL EXTRACTO DE YACÓN**

El criterio de optimización usado fue el de maximizar el rendimiento de fructosa liberada a partir de los FOS y sacarosa presentes en el extracto de yacón (g/L de extracto de yacón), siendo éste la función objetivo, donde tres fueron los factores seleccionados para evaluar la hidrólisis del extracto: pH ( $X_1$ ), tiempo ( $X_2$ ) y temperatura ( $X_3$ ).

Con respecto al factor concentración de FOS, que no fue considerado en la optimización, Blecker *et al.* (2002) mencionan que, la composición química y la concentración de los

oligómeros influyen directamente sobre la velocidad de la hidrólisis. De lo mencionado, se afirma que la velocidad de reacción disminuye cuando: en el medio se encuentra una mayor concentración de terminales glucosil (oligosacáridos que terminan en glucosa) debido a la estabilidad del enlace, y una mayor concentración de éstos oligómeros (aquellos que poseen un grado de polimerización promedio a nueve). Por otro lado, en base a pruebas preliminares se obtuvo que el proceso hidrolítico fue mejor conducido a porcentajes de FOS bajos, lo cual es respaldado por la literatura (Eskandari *et al.* 2009, Sarchami y Rehman 2014). Por lo tanto, resulta evidente que con una menor concentración de FOS en el medio se logra un mejor proceso hidrolítico ya que se tiene una menor concentración de terminales glucosil y se logra una mayor exposición de la superficie molecular. Es por ello que, se optó por trabajar con una concentración constante de uno por ciento de FOS, lo cual conlleva a obtener una solución de trabajo de dos grados Brix.

#### **4.3.1. OPTIMIZACIÓN DE LA HIDRÓLISIS QUÍMICA DEL EXTRACTO DE YACÓN EMPLEANDO ÁCIDO SULFÚRICO**

Los valores promedio del rendimiento de fructosa (g fructosa/L extracto de yacón) observados ( $\bar{Y}$ ) y estimados ( $\hat{Y}$ ) para las 17 corridas generadas del DBB, se presentan en el Cuadro 11. De los resultados se observa que, en el rango entre 0- 7.849, el menor valor fue alcanzado bajo las condiciones de pH 3, tiempo de 20 min y temperatura de 79 °C y, el mayor valor a las condiciones de pH 2, tiempo de 20 min y temperatura de 98 °C.

##### **a. EVALUACIÓN DEL MODELO MATEMÁTICO**

El modelo matemático de segundo orden (cuadrático) obtenido para este diseño, establece una relación empírica entre el rendimiento de fructosa (variable dependiente) que serán liberadas a partir de los FOS y sacarosa del extracto de yacón clarificado, y el pH, tiempo y temperatura (variables independientes); relación que se representan en la siguiente ecuación.

$$\begin{aligned} \text{Fructosa (g/L extracto de yacón)} = & -13.0365 - 8.44642 X_1 + 0.439742 X_2 + 0.41429 X_3 - \\ & 0.54485 X_1^2 + 0.02843 X_1 X_2 + 0.0849474 X_1 X_3 - 0.00340416 X_2^2 - 0.00232263 X_2 X_3 - \\ & 0.00231122 X_3^2 \end{aligned} \quad (15)$$

**Cuadro 11: DBB para las variables independientes, niveles y variable respuesta de la hidrólisis química empleando ácido sulfúrico**

CORRIDA	VARIABLES INDEPENDIENTES			FRUCTOSA (g/L EXTRACTO DE YACÓN) (Y)	
	pH X <sub>1</sub>	Tiempo (min) X <sub>2</sub>	Temperatura (°C) X <sub>3</sub>	Observado ( $\bar{Y}$ )	Estimado ( $\hat{Y}$ )
1	2 (0)	20 (-1)	98 (1)	7.849	6.962
2	3 (1)	45 (0)	98 (1)	6.329	6.589
3	2 (0)	45 (0)	79 (0)	6.676	6.814
4	2 (0)	70 (1)	60 (-1)	2.062	2.949
5	2 (0)	45 (0)	79 (0)	6.902	6.814
6	1 (-1)	45 (0)	98 (1)	7.636	8.632
7	2 (0)	45 (0)	79 (0)	7.342	6.814
8	1 (-1)	45 (0)	60 (-1)	7.769	7.509
9	2 (0)	20 (-1)	60 (-1)	0.036	0.405
10	2 (0)	45 (0)	79 (0)	6.682	6.814
11	3 (1)	70 (1)	79 (0)	2.276	2.385
12	3 (1)	20 (-1)	79 (0)	0.000	0.627
13	2 (0)	70 (1)	98 (1)	5.462	5.093
14	3 (1)	45 (0)	60 (-1)	0.006	-0.990
15	1 (-1)	70 (1)	79 (0)	6.862	6.235
16	2 (0)	45 (0)	79 (0)	6.469	6.814
17	1 (-1)	20 (-1)	79 (0)	7.429	7.320

El modelo cuadrático fue evaluado estadísticamente para ver el grado de ajuste a los datos experimentales. El análisis de varianza del modelo cuadrático de la Ecuación 15, se presenta en el Cuadro 12, el cual indica que los factores: pH (X<sub>1</sub>) y temperatura (X<sub>3</sub>), fueron altamente significativos ( $p < 0.001$ ), mientras que, el tiempo (X<sub>2</sub>) no resultó significativo. De otro lado, con respecto a los términos cuadráticos, el tiempo (X<sub>2</sub><sup>2</sup>), tuvo un efecto no significativo, mientras que con el pH (X<sub>1</sub><sup>2</sup>) y temperatura (X<sub>3</sub><sup>2</sup>), ambos tuvieron un efecto significativo ( $p < 0.05$ ). Con respecto a las interacciones pH- tiempo (X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>), pH- temperatura (X<sub>1</sub>X<sub>3</sub>), y tiempo- temperatura (X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>), todos ellos tuvieron efectos significativos. Por otro lado, la

suma de cuadrados del error puro es pequeña con respecto a la suma de cuadrados del total, indicando ellos una buena reproducibilidad en el punto central (Ayala y Pardo 1995).

Con respecto al coeficiente de determinación ( $R^2$ ) se pudo establecer que el 96.3 por ciento de la variabilidad de los resultados es explicado por el modelo cuadrático. Además existe un alto grado de correlación entre los valores experimentales y estimados, debido a la cercanía de ambos valores (Tan *et al.* 2014) ( $R^2$  de 0.963 y  $R^2_{ajustado}$  de 0.915).

**Cuadro 12: Análisis de varianza (ANOVA) de las variables independientes en la hidrólisis química del extracto de yacón empleando ácido sulfúrico para la optimización de fructosa**

FACTORES	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRA-DO MEDIO	VALOR -F	VALOR-P	SIGNIFICANCIA
X <sub>1</sub> :pH	55.572	1	55.572	502.89	0.000	***
X <sub>2</sub> :Tiempo	0.227	1	0.227	2.06	0.225	n.s.
X <sub>3</sub> :Temperatura	37.858	1	37.858	342.59	0.000	***
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	1.250	1	1.250	11.31	0.028	*
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	2.021	1	2.021	18.29	0.013	*
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	10.420	1	10.420	94.29	0.001	**
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	19.060	1	19.060	172.48	0.000	***
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	4.869	1	4.869	44.06	0.003	**
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	2.931	1	2.931	26.52	0.007	**
Error puro	0.442	4	0.111			
Error Total	5.216	7	0.745			
Total	141.155	16				
R <sup>2</sup>	0.963					
R <sup>2</sup> ajustado	0.915					

\* Significancia a un nivel de  $\alpha=0.05$ ; \*\*Significancia a un nivel de  $\alpha=0.01$ ; \*\*\*Significancia a un nivel de  $\alpha=0.001$ .; n.s.= No significativo.

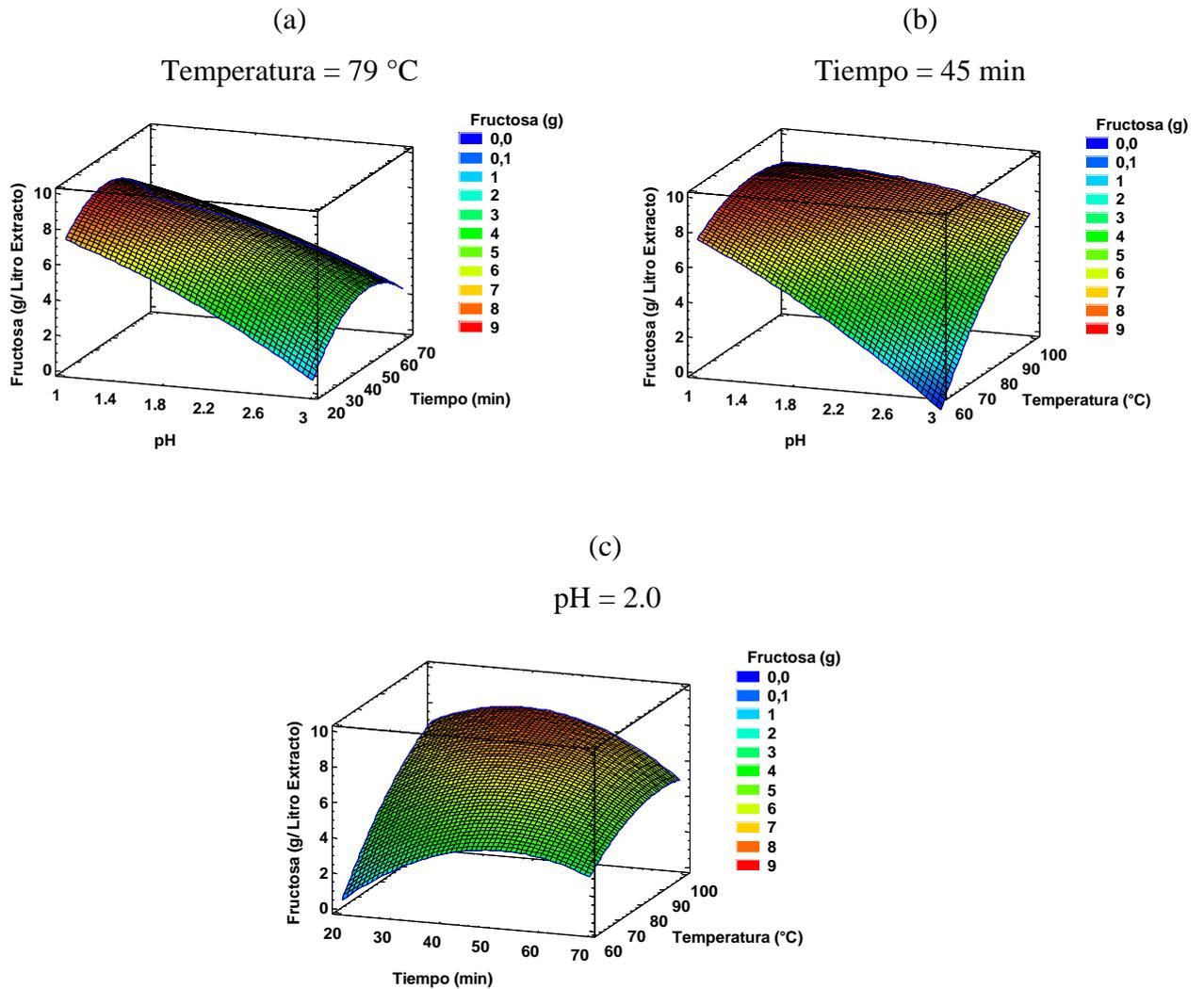
## **b. ANÁLISIS DE LA SUPERFICIE RESPUESTA**

La gráfica de superficie respuesta (tridimensional), se elaboró a partir del modelo cuadrático (Ecuación 15) para ilustrar los efectos principales e interactivos de las variables independientes sobre la variable respuesta (rendimiento de fructosa). El objetivo principal fue identificar el valor óptimo de las variables independientes de manera eficiente para maximizar la respuesta. Las gráficas de la Figura 12 se obtienen de mantener un factor constante en el punto medio (nivel cero).

De la Figura 12, se observa que en las relaciones establecidas entre el pH y el tiempo (Fig. 12a) y el pH y la temperatura (Fig. 12b), el pH presenta un efecto con tendencia lineal de pendiente negativa, de donde se observa que el mayor rendimiento de fructosa se produce hacia los valores bajos de pH ( $\sim$ pH 1), mientras que, bajo estas mismas relaciones el factor tiempo y la temperatura presentaron efectos cuadráticos, lo que se evidencia cuando se relacionaron las variables tiempo y temperatura (Fig. 12c), encontrándose los óptimos hacia los valores medios de los rangos evaluados para la temperatura y tiempo.

El efecto del pH sobre el rendimiento de fructosa liberada a partir de un oligómero de fructanos ha sido observado en diversos estudios, evidenciando que la velocidad de reacción de hidrólisis es directamente proporcional a la concentración de hidronios en el medio, por lo tanto, es inversamente proporcional a los valores de pH (Glibowsski y Bukowska 2011, Blecker *et al.* 2002, Homme *et al.* 2003, Courtin *et al.* 2009). De otro lado, estudios como el de Eskandari *et al.* (2009) en la inulina afirman que, la estabilidad de este oligómero en medios ácidos es menor que en medio básicos.

De la misma manera, al observar el comportamiento de los FOS y la sacarosa en un medio con mayor concentración de hidronios, se puede deducir que los iones con carga positiva desestabilizan el oxígeno glucosídico y los iones con carga negativa funcionan como nucleófilos desestabilizando el carbono anomérico, comportamiento similar al realizado por el imidazol para la hidrólisis de inulina (Zhao *et al.* 2016).



**Figura 12: Gráfica de la superficie de respuesta para los efectos: (a) pH - tiempo, (b) pH - temperatura y (c) tiempo - temperatura, sobre el rendimiento de fructosa utilizando ácido sulfúrico**

Homme *et al.* (2003) mencionan que, la inestabilidad de los FOS y la sacarosa en un medio acuoso de ácidos se debe a la separación de los enlaces alrededor del oxígeno glucosídico por la protonación de éste, causando el alargamiento del enlace, lo que se ve favorecido cuando la temperatura interviene. Esto explica que, el rendimiento de fructosas en la reacción hidrolítica sea directamente proporcional a la temperatura, siendo un factor que afecta significativamente al proceso (Sarchami & Rehman 2014, Zhao *et al.* 2016). En la Fig. 12 (b) y (c) se puede observar que la temperatura presenta un comportamiento cuadrático con tendencia a obtener mayores valores de la variable respuesta entre 85 a 95 °C. Por otro lado, con respecto al tiempo se puede observar en las Fig. 12 (a) y (c) que este factor no muestra

un efecto directo en el proceso, sin embargo si muestra un comportamiento cuadrático obteniendo mejores respuestas entre 35 a 55 min.

Las condiciones óptimas de hidrólisis de los FOS del extracto de yacón fueron estimadas por el método de deseabilidad, utilizando el programa Minitab, fijándose la variable dependiente al valor máximo de deseabilidad ( $d=1.00$ ), así las condiciones óptimas correspondieron a un pH de 1, tiempo de 38.7 min y temperatura de 88.4 °C, obteniéndose un rendimiento de fructosas de 9.118 g/L de extracto de yacón (ANEXO 2).

### c. VALIDACIÓN DEL MODELO

La idoneidad de la ecuación del modelo para predecir los valores de la respuesta óptima se probó usando las condiciones recomendadas. Se encontró que los valores experimentales están de acuerdo con el valor estimado por el modelo tal como se observa en el Cuadro 13. Por lo tanto, la ecuación del modelo se puede utilizar para el enfoque de optimización (MSR) y también para validar experimentalmente y predecir los valores de las respuestas.

**Cuadro 13: Condición óptima recomendado por la ecuación de segundo orden, la respuesta estimada y experimental**

CONDICIONES ÓPTIMAS	CODIFICADO	NO CODIFICADO	
pH	-1	1	
Tiempo (min)	-0.232	38.70	
Temperatura (°C)	0.535	88.40	
VARIABLE RESPUESTA	ESTIMADA	*EXPERIMENTAL	RANGO
Fructosa (g/L de extracto de yacón)	9.118	9.009 ± 0.35	8.659- 9.359

\*Media ± desviación estándar, n=3(triplicado)

### 4.3.2. OPTIMIZACIÓN DE LA HIDRÓLISIS DEL EXTRACTO DE YACÓN EMPLEANDO ÁCIDO FOSFÓRICO

Los valores promedio del rendimiento de fructosa observados ( $\bar{Y}$ ) y estimados ( $\hat{Y}$ ) para las 17 corridas generadas del DBB, se presentan en el Cuadro 14. De los resultados se observa que el rendimiento varía entre 0 - 6.948, el menor valor fue alcanzado bajo las condiciones de pH 3, 45 min y 60 °C y el mayor valor a las condiciones de pH 1, 45 min y 98 °C.

**Cuadro 14: DBB para las variables independientes, niveles y variable respuesta de la hidrólisis química utilizando ácido fosfórico**

CORRIDA	VARIABLES INDEPENDIENTES			FRUCTOSA (g/L DE EXTRACTO DE YACÓN)	
	pH X <sub>1</sub>	Tiempo (min) X <sub>2</sub>	Temperatura (°C) X <sub>3</sub>	Observado ( $\bar{Y}$ )	Estimado ( $\hat{Y}$ )
1	2 (0)	20 (-1)	98 (1)	6.248	5.566
2	3 (1)	45 (0)	98 (1)	5.678	6.150
3	2 (0)	45 (0)	79 (0)	5.495	5.865
4	2 (0)	70 (1)	60 (-1)	1.695	2.377
5	2 (0)	45 (0)	79 (0)	5.321	5.865
6	1 (-1)	45 (0)	98 (1)	6.948	7.703
7	2 (0)	45 (0)	79 (0)	7.368	5.865
8	1 (-1)	45 (0)	60 (-1)	6.561	6.089
9	2 (0)	20 (-1)	60 (-1)	0.548	1.093
10	2 (0)	45 (0)	79 (0)	5.841	5.865
11	3 (1)	70 (1)	79 (0)	3.328	3.401
12	3 (1)	20 (-1)	79 (0)	0.608	0.818
13	2 (0)	70 (1)	98 (1)	6.968	6.423
14	3 (1)	45 (0)	60 (-1)	0.000	-0.755
15	1 (-1)	70 (1)	79 (0)	6.295	6.086
16	2 (0)	45 (0)	79 (0)	5.301	5.865

«Continuación»

17                      1 (-1)                      20 (-1)                      79 (0)                      6.601                      6.528

---

**a. EVALUACIÓN DEL MODELO MATEMÁTICO**

El modelo matemático de segundo orden (cuadrático) obtenido para este diseño se representa en la siguiente ecuación:

$$\text{Fructosa (g/L de extracto de yacón)} = -4.679\ 08 - 7.510\ 03 X_1 + 0.165\ 062 X_2 + 0.291\ 9 X_3 - 0.362\ 6 X_1^2 + 0.030\ 26 X_1X_2 + 0.069\ 618\ 4 X_1X_3 - 0.002\ 071\ 36 X_2^2 - 0.000\ 224\ 737 X_2X_3 - 0.001\ 955\ 26 X_3^2 \quad (16)$$

El modelo cuadrático fue evaluado estadísticamente para ver el grado de ajuste a los datos experimentales. El análisis de varianza del modelo cuadrático de la Ecuación 16, se presenta en el Cuadro 15.

**Cuadro 15: ANOVA de las variables independientes en la hidrólisis química del extracto de yacón empleando ácido fosfórico para la optimización de Fructosa.**

FACTORES	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADO MEDIO	VALOR -F	VALOR-P	SIGNIFICANCIA
X <sub>1</sub> :pH	35.242	1	35.242	46.830	0.002	**
X <sub>2</sub> :Tiempo	2.291	1	2.291	3.040	0.156	n.s.
X <sub>3</sub> :Temperatura	36.287	1	36.287	48.210	0.002	**
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	0.554	1	0.554	0.740	0.439	n.s.
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	2.289	1	2.289	3.040	0.156	n.s.
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	6.999	1	6.999	9.300	0.038	*
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	7.057	1	7.057	9.380	0.038	*
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	0.046	1	0.046	0.060	0.818	n.s.
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	2.098	1	2.098	2.790	0.170	*
Error puro	3.011	4	0.753			
Error Total	6.218	7	0.889			
Total	99.908	16				

## «Continuación»

R <sup>2</sup>	0.938
R <sup>2</sup> ajustado	0.858

---

\*Significancia a un nivel de  $\alpha= 0.05$ ; \*\*Significancia a un nivel de  $\alpha= 0.01$ ; n.s.= No significativo.

El análisis de varianza del modelo cuadrático indica que los factores: pH ( $X_1$ ) y temperatura ( $X_3$ ), fueron significativos ( $p < 0.05$ ), mientras que, el tiempo ( $X_2$ ) no resultó significativo. De otro lado, con respecto a los términos cuadráticos, el pH ( $X_1^2$ ) no tuvo un efecto significativo, mientras que con el tiempo ( $X_2^2$ ) y temperatura ( $X_3^2$ ), ambos tuvieron un efecto significativo. Con respecto a la interacciones pH- tiempo ( $X_1X_2$ ) y tiempo- temperatura ( $X_2X_3$ ), ambos no resultaron significativos, mientras que con la interacción pH - temperatura ( $X_1X_3$ ) si tuvo un efecto significativo. Por otro lado, la suma de cuadrados del error puro es pequeña con respecto a la suma de cuadrados del total, indicando ellos una buena reproducibilidad en el punto central.

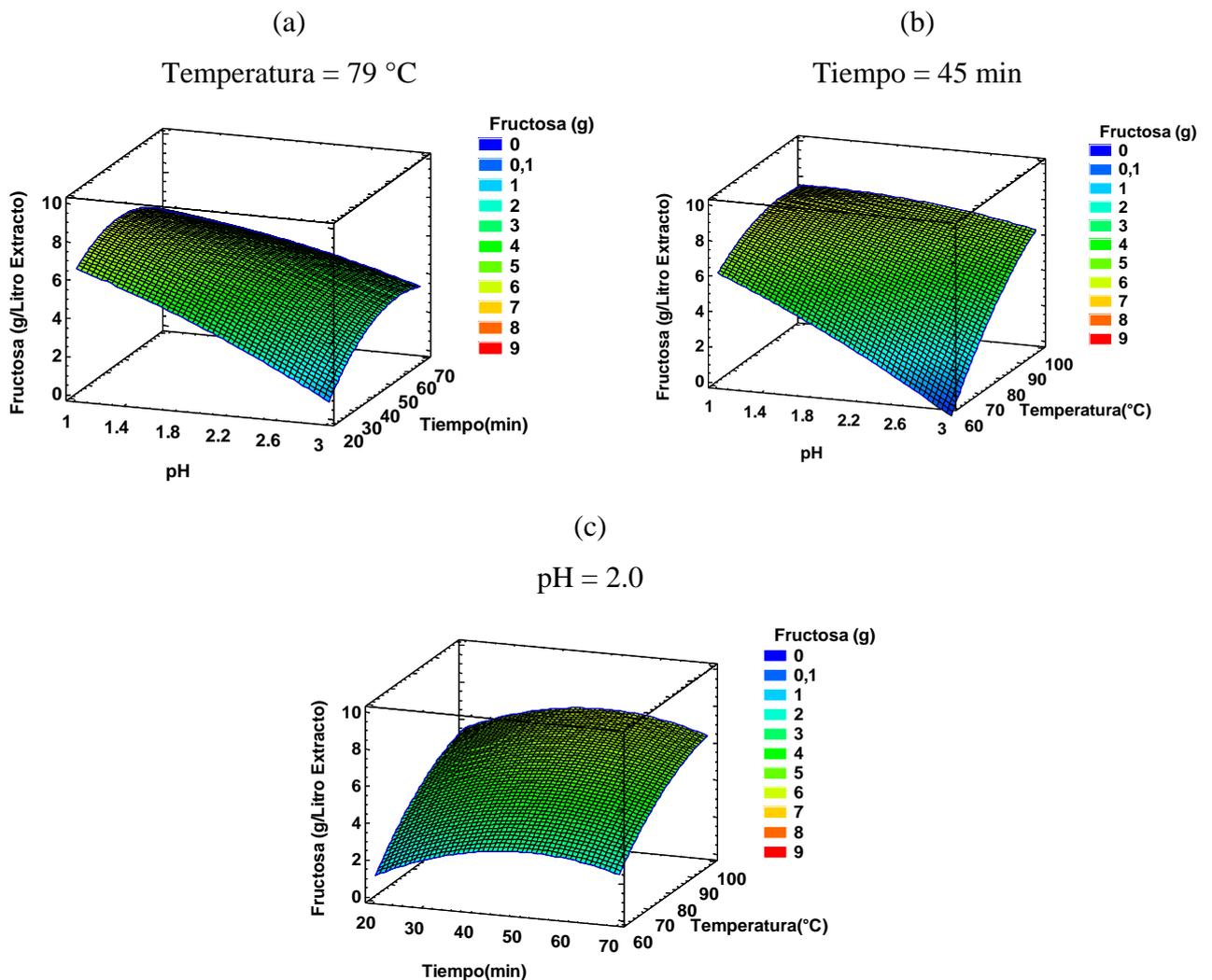
Con respecto al coeficiente de determinación ( $R^2$ ) se pudo establecer que el 93.8 por ciento de la variabilidad de los resultados es explicado por el modelo cuadrático y que existe un alto grado de correlación entre los valores experimentales y estimados ( $R^2 = 0.963$  y  $R^2_{\text{ajustado}} = 0.858$ ).

### **b. ANÁLISIS DE LA SUPERFICIE RESPUESTA**

En la Figura 13 se muestra la gráfica en tres dimensiones de la superficie respuesta obtenida a partir del modelo cuadrático. Al igual que con el empleo del ácido sulfúrico en la hidrólisis química, con el ácido fosfórico se observa el efecto lineal del pH, cuando éste se relaciona con el tiempo (Fig. 13a) y la temperatura (Fig. 13b) sobre la respuesta rendimiento de fructosa, donde nuevamente los mayores valores de fructosa obtenidos tienden a ir hacia el valor de pH más bajo (pH 1). Al relacionar el tiempo y la temperatura ambos factores presentaron un efecto curvatura, estando los óptimos situados hacia el medio del rango de valores evaluados para ambos factores.

Se puede observar que el comportamiento lineal de los factores usando ácido fosfórico es similar a los obtenidos por el ácido sulfúrico. Sin embargo, del Cuadro 15 se puede observar que el efecto cuadrático del pH, y las interacciones pH- tiempo y tiempo- temperatura resultaron no significativos en el proceso hidrolítico, lo cual se diferencia de lo obtenido

usando ácido sulfúrico. Además, es necesario mencionar que los valores del rendimiento de fructosa utilizando ácido sulfúrico son mayores a los obtenidos usando ácido fosfórico en cada tratamiento. Por lo tanto, de lo mencionado se puede atribuir que el rendimiento y los efectos de la interacción de los factores varían debido a que son afectados por el tipo de ácido utilizado.



**Figura 13: Gráfica de la superficie de respuesta para los efectos: (a) pH vs tiempo, (b) pH vs temperatura y (c) tiempo vs temperatura, sobre el rendimiento de fructosa utilizando ácido fosfórico**

Las condiciones óptimas de hidrólisis fueron estimadas por el método de deseabilidad ( $d=1.00$ ) y de acuerdo a ello las condiciones óptimas de hidrólisis con el ácido fosfórico

correspondieron a un pH de 1, tiempo de 42.2 min y temperatura de 89.9 °C, obteniéndose una conversión de 7.848 g Fructosa/L de extracto de yacón (ANEXO 3).

### c. VALIDACIÓN DEL MODELO

La idoneidad de la ecuación del modelo para predecir los valores de la respuesta óptima se probó usando las condiciones recomendadas. Se encontró que los valores experimentales están de acuerdo con el valor estimado por el modelo, ver Cuadro 16. Por lo tanto, bajo este conjunto de condiciones se determinó que la ecuación es recomendable para el criterio de optimización, además de poder predecir los valores de las respuestas.

**Cuadro 16: Condición óptima recomendado por la ecuación de segundo orden, la respuesta estimada y experimental**

CONDICIONES ÓPTIMAS	CODIFICADO	NO CODIFICADO	
pH	-1	1	
Tiempo (min)	-0.909	42.22	
Temperatura (°C)	0.737	89.94	
VARIABLE RESPUESTA	ESTIMADA	*EXPERIMENTAL	RANGO
Fructosa (g/L de extracto de yacón)	7.848	7.538 ± 0.403	7.135- 7.941

\*Media ± desviación estándar, n=3(triplicado)

Con respecto a los valores óptimos de rendimiento de fructosas, los mejores resultados fueron obtenidos al utilizar ácido sulfúrico (9.118 g/L de extracto de yacón) en comparación del valor obtenido con ácido fosfórico (7.848 g/L de extracto de yacón). Esta misma tendencia se observa en el estudio de Sarchami y Rehmann (2014) sobre la hidrólisis de la inulina usando ácidos. Para el caso del ácido sulfúrico a pH 2, tiempo de 35 min y temperatura de 97 °C se obtuvo una hidrólisis al 98.5 por ciento, mientras que con el ácido fosfórico se obtuvo un 94% a pH 2, tiempo de 39 min y temperatura de 95 °C. Resultados similares fueron reportados por Szambelan y Nowak (2006) quienes reportaron que empleando ácido sulfúrico en la hidrólisis de la inulina se liberan de 6 a 13 por ciento más de azúcares reductores que empleado ácido fosfórico.

La diferencia entre los resultados de ambas hidrólisis puede deberse al tipo de ácido utilizado, si bien es cierto la concentración de hidronios es la misma en ambos casos, existe la posibilidad que el grado de disociación de los ácidos varíe durante la hidrólisis. Esta variación puede suscitarse al intervenir la temperatura, al aumentar la temperatura el grado de disociación disminuye por lo que la concentración de hidronios en el medio disminuye lo que conlleva a una ligera disminución del pH durante la hidrólisis (Tinoco *et al.* 1994). La variación sucedería con el ácido fosfórico por ser un ácido débil, mientras que con el ácido sulfúrico se mantendría constante por ser un ácido fuerte. Por lo tanto, de este estudio se puede concluir que el rendimiento de fructosas en la hidrólisis química del extracto de yacón está influenciado no solo por la temperatura y el pH, sino también por el tipo de ácido.

De otro lado, es conocido que los azúcares se pueden degradar cuando son sometidos a condiciones drásticas de temperatura y pH, produciendo compuestos tóxicos como furfurales (Pekic *et al.* 1985); según la literatura esto sucede cuando se parte de altas concentraciones de fructosa (Kuster y Van der Baan 1977, Kuster 1990). Por lo tanto, el uso de ácidos para maximizar el rendimiento de fructosas a partir de la hidrólisis de los FOS del extracto de yacón se encuentra limitado a los compuestos tóxicos que se pueden generar por la deshidratación de la fructosa (Hidroximetilfurfural) (Estford 1958, Kuster y Temmink 1977, Fleming y Grootwassink, citados por Pekic *et al.* 1985).

#### **4.4. OPTIMIZACIÓN DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL EXTRACTO DE YACÓN**

Tras revisar varias investigaciones orientadas a evaluar la optimización de la hidrólisis enzimática de la inulina (Szambelan y Nowak 2006, Ricca *et al.* 2009, Sarchami y Rehmann 2014) y a experiencias preliminares, dos fueron los factores considerados en el estudio de la hidrólisis del extracto de yacón: el tiempo (min) ( $X_1$ ) y la concentración de enzima (U/g FOS) ( $X_2$ ). Con respecto a la temperatura y pH, fueron considerados valores constantes (50 °C y pH 5), ya que para la hidrólisis de la inulina fueron los óptimos de ambas enzimas, según los indican diversos autores (Kurakake *et al.* 2010, Sarchami y Rehmann 2014, Liu *et al.* 2016). Por otro lado, la concentración de sustrato se mantuvo a uno por ciento de FOS, debido a que, lo que se buscó fue analizar el comportamiento de la enzima en el rendimiento

de fructosas al mantener un valor fijo de FOS y que los resultados puedan ser comparados con la hidrólisis química.

Para la etapa de optimización, se consideró un Diseño Compuesto Central (DCC) de segundo orden, debido a que con este diseño se logra el análisis de toda la superficie factorial además de lograr buscar una curvatura (Ayala y Pardo 1995, Myers *et al.* 2016). De otro lado, así como, en la parte de la optimización de la hidrólisis ácida, el criterio de optimización usado fue el de maximizar el rendimiento de fructosa a partir del extracto de yacón (g/L de extracto de yacón).

#### **4.4.1. OPTIMIZACIÓN DE LA HIDRÓLISIS DEL EXTRACTO DE YACÓN MEDIANTE EL USO DE INULINASA**

Los valores promedio del rendimiento de fructosa (g/L de extracto de yacón) observados ( $\bar{Y}$ ) y estimados ( $\hat{Y}$ ) para cada punto se presenta en el Cuadro 17. Los resultados del Cuadro 17 indican que el máximo y mínimo nivel de rendimiento de fructosa fue de 5.233 y 0.153 g/L de extracto de yacón, respectivamente; trabajando bajo una concentración de enzima de 10 y 0.34 U/g FOS, por 120 y 85 min, respectivamente.

##### **a. EVALUACIÓN DEL MODELO MATEMÁTICO**

El modelo matemático de segundo orden (cuadrático) obtenido para este diseño, se representa en la siguiente ecuación:

$$\text{Fructosa (g/L de extracto de yacón)} = -0.295\ 841 + 0.007\ 658\ 98 X_1 + 0.450\ 906 X_2 - 0.000\ 009\ 793\ 31 X_1^2 + 0.002\ 355\ 36 X_1X_2 - 0.024\ 529\ 3 X_2^2 \quad (17)$$

**Cuadro 17: DCC para las variables independientes, niveles y variable respuesta de la hidrólisis enzimática empleando inulinasa**

CORRIDA	VARIABLES INDEPENDIENTES		FRUCTOSA (G/L DE EXTRACTO DE YACÓN) (Y)	
	Tiempo (min)	Concentración de enzima (U/g FOS)	Observado ( $\bar{Y}$ )	Estimado ( $\hat{Y}$ )
	$X_1$	$X_2$		
1	85(0)	0.340(-1.41)	0.153	0.503
2	50(-1)	2(-1)	1.413	1.102
3	85(0)	11.7(1.41)	4.713	4.545
4	120(1)	2(-1)	2.087	1.851
5	50(-1)	10(1)	3.240	3.296
6	36(-1.41)	6(0)	2.153	2.298
7	85(0)	6(0)	3.413	3.308
8	85(0)	6(0)	3.260	3.308
9	120(1)	10(1)	5.233	5.365
10	85(0)	6(0)	3.240	3.308
11	85(0)	6(0)	3.360	3.308
12	85(0)	6(0)	3.273	3.308
13	134(1.41)	6(0)	4.233	4.271

El modelo cuadrático, derivado del diseño DCC, fue evaluado estadísticamente para ver el grado de ajuste a los datos experimentales. El análisis de varianza del modelo cuadrático de la Ecuación 17, se presenta en el Cuadro 18. En la evaluación estadística, el análisis de varianza del modelo cuadrático indica que es altamente significativo ( $p < 0.001$ ) los factores: tiempo (min) ( $X_1$ ) y concentración de enzima (U/g FOS) ( $X_2$ ). Por otra parte, con respecto a los términos cuadráticos, el tiempo ( $X_1^2$ ) muestra un efecto no significativo, mientras que con la concentración de enzima ( $X_2^2$ ) se tuvo un efecto altamente significativo. Con respecto a los términos de interacción, tiempo (min) - concentración de enzima (U/g FOS) ( $X_1X_2$ ) se observa un efecto altamente significativo.

En función a los valores obtenidos de la suma de cuadrados del error puro y la suma de cuadrados del total, se presentó una buena reproducibilidad en el punto central. Por otro lado, con respecto al coeficiente de determinación ( $R^2$ ) se pudo establecer que el 98.3 por ciento de la variabilidad de los resultados es explicado por el modelo cuadrático. Además de que existe un alto grado de correlación entre los valores experimentales y estimados ( $R^2= 0.983$  y el  $R^2_{ajustado} = 0.971$ ).

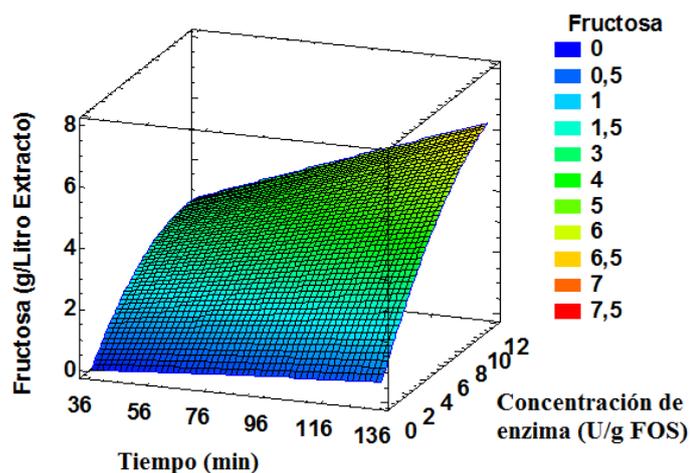
**Cuadro 18: Análisis de varianza (ANOVA) de las variables independientes en la hidrólisis enzimática empleando inulinasa para la optimización del rendimiento de fructosa**

FACTORES	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADO MEDIO	VALOR -F	VALOR-P	SIGNIFICANCIA
X <sub>1</sub> :Tiempo	3.930	1	3.930	718.630	0.000	***
X <sub>2</sub> : [E]	16.358	1	16.358	2991.130	0.000	***
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	0.001	1	0.001	0.180	0.695	n.s.
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	0.435	1	0.435	79.530	0.001	***
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	1.086	1	1.086	198.620	0.000	***
Error puro	0.022	4	0.005			
Error Total	0.368	7	0.053			
Total	22.128	12				
R <sup>2</sup>	0.983					
R <sup>2</sup> ajustado	0.971					

\*Significancia a un nivel de  $\alpha= 0.05$ ; \*\*\*Significancia a un nivel de  $\alpha= 0.001$ ; n.s.= No significativo.

**b. ANÁLISIS DE LA SUPERFICIE RESPUESTA**

En la Figura 14 se muestra la gráfica en tres dimensiones obtenida a partir del modelo cuadrático. Se observa que al relacionar la concentración de enzima (U/g FOS) con el tiempo (min), la concentración de enzima tiende a mostrar un efecto curvatura, mientras que el factor tiempo muestra una tendencia lineal con una ligera pendiente positiva, donde a mayor tiempo de hidrólisis el rendimiento de fructosa tiende a aumentar pero en poca cantidad.



**Figura 14: Superficie respuesta del rendimiento de fructosa en función a los factores: tiempo (min) ( $X_1$ ) y concentración de enzima (U/g FOS) ( $X_2$ )**

Una posible explicación al comportamiento del factor: concentración de enzima, se debe al efecto que causa el tipo de fructano en la enzima. En diversos estudios se ha observado que este tipo de enzima muestra poca afinidad a fructanos de bajos grado de polimerización, (Montañez *et al.* 2011, Liu *et al.* 2016). Por lo tanto, es probable que, para obtener mayor cantidad de fructosas, se necesitará mayor cantidad de enzima, debido a que tiene baja actividad hacia el tipo de fructano que se encuentra en el medio.

Las condiciones óptimas de hidrólisis con inulinasa fueron estimadas por el método de deseabilidad ( $d = 1.00$ ) y de acuerdo a ello, se obtuvo una concentración de enzima de 11.7 U/g FOS por un tiempo de 134 min (ANEXO 6), obteniéndose un valor óptimo de rendimiento de fructosa 6.168 g/L de extracto de yacón. En un estudio realizado por Montañez *et al.* (2011) se obtuvo sólo el 10.8 por ciento de azúcares reductores a partir de inulooligofructosas de *Agave tequilana* al utilizar endo- inulinasas del *Aspergillus niger* (25 U/ml) a un pH de 4.5, temperatura de 50 °C en 3 horas. Así mismo, en el estudio de Sarchami y Rehmann (2014), se obtuvo un 94.5 por ciento de la hidrólisis de inulina con inulinasa (10 U/g Inulina) a un pH de 4.8, temperatura de 48 °C en 24 horas. Por lo tanto, se puede observar que, si bien es cierto, se tienen diferentes valores de respuesta, la tendencia en el uso de la concentración de enzima empleada es alta, así como el empleo de largos tiempos de hidrólisis.

### c. VALIDACIÓN DEL MODELO

De la misma manera, la ecuación fue validada realizando pruebas para predecir los valores de la respuesta óptima con las condiciones recomendadas. Se encontró que los valores experimentales están de acuerdo con el valor estimado por el modelo de acuerdo a lo mostrado en el Cuadro 19, por lo tanto, se puede recomendar la ecuación.

**Cuadro 19: Condición óptima recomendado por la ecuación de segundo orden, la respuesta estimada y experimental**

CONDICIONES ÓPTIMAS	CODIFICADO	NO CODIFICADO	
Tiempo (min)	1.41	134	
Concentración de enzima (U/gFOS)	1.41	11.7	
VARIABLE RESPUESTA	ESTIMADA	*EXPERIMENTAL	RANGO
Fructosa (g/L de extracto de yacón)	6.165	6.140 ± 0.077	6.063- 6.217

\*Media ± desviación estándar, n=3(triplicado)

#### 4.4.2. OPTIMIZACIÓN DE LA HIDRÓLISIS DEL EXTRACTO DE YACÓN MEDIANTE EL USO DE INVERTASA

Los valores promedio del rendimiento de fructosas (g/L de extracto de yacón) observados ( $\bar{Y}$ ) y estimados ( $\hat{Y}$ ) para cada punto, se presenta en el Cuadro 20. El menor valor de rendimiento de fructosa (g/L de extracto de yacón) fue 6.795 con  $0.34 \times 10^{-1}$  U/g FOS a 85 min, mientras que el mayor valor fue 7.673 con  $6 \times 10^{-1}$  U/g FOS a 85 min.

**Cuadro 20: Diseño Central Compuesto para las variables independientes, niveles y variable respuesta de la hidrólisis enzimática empleando invertasa.**

CORRIDA	FRUCTOSA (g/L DE EXTRACTO DE YACÓN) (Y)			
	VARIABLES INDEPENDIENTES		Observado ( $\bar{Y}$ )	Estimado ( $\hat{Y}$ )
	Tiempo (min) $X_1$	Concentración de enzima ( $10^{-1}$ U/g FOS) $X_2$		
1	85(0)	0.340(-1.41)	6.795	6.782
2	50(-1)	2(-1)	6.994	6.994
3	85(0)	11.7(1.41)	7.092	7.197
4	120(1)	2(-1)	7.166	7.156
5	50(-1)	10(1)	7.466	7.383
6	36(-1.41)	6(0)	7.368	7.408
7	85(0)	6(0)	7.673	7.473
8	85(0)	6(0)	7.417	7.473
9	120(1)	10(1)	7.445	7.353
10	85(0)	6(0)	7.442	7.473
11	85(0)	6(0)	7.412	7.473
12	85(0)	6(0)	7.421	7.473
13	134(1.41)	6(0)	7.447	7.500

**a. EVALUACIÓN DEL MODELO MATEMÁTICO**

El modelo matemático de segundo orden obtenido para este caso, se muestra a continuación:

$$\text{Fructosa (g/L de extracto de yacón)} = 6.397\ 84 + 0.004\ 324\ 89 X_1 + 2.470\ 59 X_2 - 0.000\ 007\ 725\ 1 X_1^2 - 0.003\ 451\ 79 X_1 X_2 - 1.509\ 36 X_2^2 \quad (18)$$

El modelo cuadrático, derivado del diseño compuesto, fue evaluado estadísticamente para ver el grado de ajuste a los datos experimentales. El análisis de varianza del modelo cuadrático de la Ecuación 18, se presenta en el Cuadro 21. En la evaluación estadística, el

análisis de varianza del modelo cuadrático indica que es significativo ( $p < 0.05$ ) el factor concentración de enzima (U/g FOS) ( $X_2$ ), mientras que el factor tiempo (min) ( $X_1$ ) es no significativo. Por otra parte, con respecto al término cuadrático tiempo ( $X_1^2$ ) y la interacción tiempo (min) - concentración de enzima (U/g FOS) ( $X_1X_2$ ), ambos muestran un efecto no significativo, mientras que el término cuadrático de la concentración de enzima ( $X_2^2$ ) tuvo un efecto significativo.

**Cuadro 21: Análisis de varianza (ANOVA) de las variables independientes en la hidrólisis enzimática empleando invertasa para la optimización de fructosa**

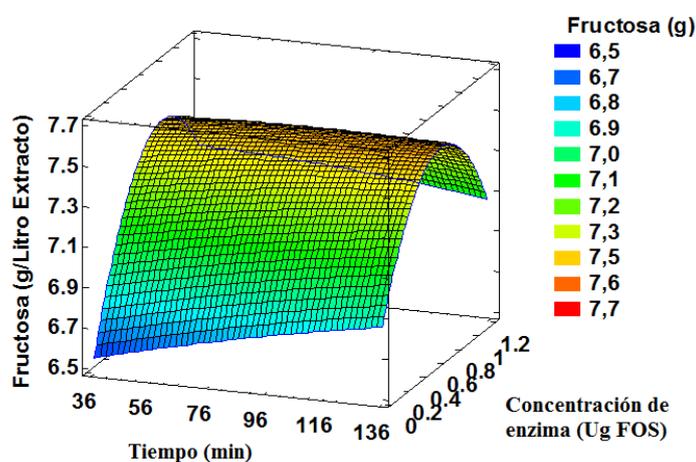
FACTORES	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADO MEDIO	VALOR -F	VALOR-P	SIGNIFICANCIA
$X_1$ :Tiempo	0.009	1	0.009	0.680	0.457	n.s.
$X_2$ :[E]	0.171	1	0.171	13.550	0.021	*
$X_1^2$	0.001	1	0.001	0.050	0.838	n.s.
$X_1X_2$	0.009	1	0.009	0.740	0.439	n.s.
$X_2^2$	0.407	1	0.407	32.120	0.005	*
Error puro	0.051	4	0.013			
Error Total	0.081	7	0.012			
Total	0.681	12				
$R^2$	0.880					
$R^2$ ajustado	0.795					

\* Significancia a un nivel de  $\alpha=0.05$ ; \*\*Significancia a un nivel de  $\alpha=0.01$ ; \*\*\*Significancia a un nivel de  $\alpha=0.001$ ; n.s.= No significativo.

Con respecto al coeficiente de determinación ( $R^2$ ) se puede establecer que el 88.0 por ciento de la variabilidad de los resultados es explicado por el modelo cuadrático y un alto grado de correlación fue encontrado entre los valores experimentales y estimados ( $R^2= 0.88$  y el  $R^2$  ajustado= 0.795).

## b. ANÁLISIS DE LA SUPERFICIE RESPUESTA

En la Figura 15 se muestra el efecto de la relación tiempo (min) con la concentración de enzima ( $10^{-1}$  U/g FOS) sobre el rendimiento de fructosa (g/L de extracto de yacón), de donde se observa que la variable concentración de enzima ejerce un efecto cuadrático sobre la variable respuesta, mientras que la variable tiempo muestra un efecto lineal. Este comportamiento es típico de una enzima (Boyer 1972, Traut 2008) en donde al inicio se necesita una mayor concentración para obtener mejores respuestas, sin embargo en un cierto punto ( $0.6$  U/g FOS aprox., para este caso) las enzimas llegan a competir entre ellas disminuyendo el rendimiento en la respuesta.



**Figura 15. Superficie respuesta del rendimiento de Fructosa en función a los factores: tiempo (min) ( $X_1$ ) y concentración de enzima (U/g FOS) ( $X_2$ )**

Las condiciones óptimas de la hidrólisis usando invertasa fueron estimadas por el método de deseabilidad ( $d=1.00$ ), correspondiendo a los factores: tiempo de 127.5 min y concentración de enzima de  $6.74 \times 10^{-1}$  U/g FOS (ANEXO 7), obteniéndose un rendimiento de 7.506 g fructosa/L de extracto de yacón.

Estudios como el de Montañez *et al.* (2011) y Li *et al.* (2015), han demostrado que la invertasa proveniente de *S. cerevisiae* presenta actividad exoinulinasa, razón por la cual es capaz de hidrolizar los enlaces  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 2) de los fructanos, más aún si son de bajo grado de polimerización. Por otra parte, con respecto a la inulinasa del tipo endo, Montañez *et al.* (2011) y Liu *et al.* (2016) afirman que, la actividad enzimática de este tipo de inulinasa es

mejor mientras mayor es el grado de polimerización del fructano a hidrolizar, sin embargo, es inhibida por la presencia de fructanos de bajo grado de polimerización. Por lo tanto, de lo mencionado se deduce que, la afinidad de ambas enzimas está influenciadas por el grado de polimerización del fructano.

Szambelan y Nowak (2006) compararon la actividad de la inulinasa e invertasa para la hidrólisis de la inulina, en donde se observó que el rendimiento de fructosas usando invertasa es 45 por ciento menor al valor obtenido usando inulinasa comercial. Sin embargo, en este estudio al utilizar invertasa se obtiene 1.325 g de fructosa más que con inulinasa. La diferencia entre ambos comportamientos puede deberse a la afinidad que presenta cada enzima con el sustrato. Por consiguiente, enfocando la atención en la actividad exoinulinasa de las enzimas, se puede observar que la invertasa presenta mejor actividad ya que el grado de polimerización del fructano es bajo.

### c. VALIDACIÓN DEL MODELO

La ecuación fue validada realizando pruebas para predecir los valores de la respuesta óptima con las condiciones óptimas recomendadas. Se encontró que los valores experimentales están de acuerdo con el valor estimado por el modelo, por lo tanto se puede recomendar la ecuación (ver Cuadro 22).

**Cuadro 22: Condición óptima recomendado por la ecuación de segundo orden, la respuesta estimada y experimental**

CONDICIONES ÓPTIMAS	CODIFICADO	NO CODIFICADO	
Tiempo (min)	1.35	127.5	
Concentración de enzima (U/gFOS)	0.167	$6.74 \times 10^{-1}$	
VARIABLE RESPUESTA	ESTIMADA	*EXPERIMENTAL	RANGO
Fructosa (g/L de extracto de yacón)	7.501	$7.467 \pm 0.067$	7.400- 7.534

\*Media  $\pm$  desviación estándar, n=3(triplicado)

#### **4.5. DISEÑO DE MEZCLAS APLICADO A LA HIDRÓLISIS DEL EXTRACTO DE YACÓN CON LAS ENZIMAS INULINASA E INVERTASA**

Con la finalidad de evaluar si la mezcla de las enzimas inulinasa e invertasa pudieran incrementar el rendimiento en fructosa obtenida a partir del extracto de yacón, se consideró realizar el diseño de mezclas: Diseño Simplex Lattice (DSL). Para este diseño se consideró como factores la mezcla de: las enzimas inulinasa ( $10^{-2}$  U) e invertasa ( $10^{-3}$  U), y la concentración de los FOS (%) en el extracto de yacón. Las condiciones constante bajo las que se realizó la hidrólisis fueron a un pH de 5, temperatura de 50 °C y un tiempo de 2 horas. En este diseño, al igual que en los anteriores diseños se tuvo como función objetivo el maximizar el rendimiento de fructosa (g/L de extracto de yacón).

El Cuadro 23 muestra el diseño utilizado para analizar la mezcla óptima, así como las variables independientes (codificadas) y la variable respuesta (g/L de extracto de yacón). Se puede observar que el mayor valor (56 g Fructosa/ L de extracto de yacón) fue obtenido con  $4 \times 10^{-3}$  U de invertasa y 6 por ciento de FOS, mientras que el menor valor (0 g fructosa/L de extracto de yacón) fue obtenido de dos maneras:  $4 \times 10^{-2}$  U de inulinasa con 6 por ciento de FOS y sin empleo de enzima alguna con 10 por ciento de FOS.

**Cuadro 23: Diseño simplex lattice para las variables independientes y variable respuesta**

CORRIDA	VARIABLES INDEPENDIENTES			FRUCTOSA (g/L DE EXTRACTO DE YACÓN) (Y)	
	Inulina (10 <sup>-2</sup> U)	Invertasa (10 <sup>-3</sup> U)	FOS (%) X <sub>3</sub>	Observado ( $\bar{Y}$ )	Estimado ( $\hat{Y}$ )
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>			
1	4(1/2)	0(0)	6(1/2)	0.000	0.000
2	4(1/2)	4(1/2)	2(0)	15.880	15.524
3	0(0)	4(1/2)	6(1/2)	55.673	55.840
4	8(1)	0(0)	2(0)	1.573	1.603
5	0(0)	8(1)	2(0)	16.060	15.750
6	0(0)	0(0)	10(1)	0.000	0.000
7	8(1)	0(0)	2(0)	1.633	1.603
8	4(1/2)	4(1/2)	2(0)	15.167	15.524
9	4(1/2)	0(0)	6(1/2)	0.000	0.000
10	0(0)	8(1)	2(0)	15.440	15.750
11	0(0)	4(1/2)	6(1/2)	56.007	55.840

#### 4.5.1. EVALUACIÓN DEL MODELO

El modelo matemático de segundo orden obtenido para este caso, relaciona el rendimiento de fructosa (g/L de extracto de yacón) (variable dependiente) y las variables independientes en términos reales (concentración de inulina, concentración de invertasa y porcentaje de FOS), el cual se muestra a continuación:

$$\text{Fructosa (g/L de extracto de yacón)} = 30,619 X_1 - 4\,105,88 X_2 - 0,0 X_3 + 45\,897 X_1 X_2 - 5,103 X_1 X_3 + 3\,017,94 X_2 X_3 \quad (19)$$

El modelo cuadrático, derivado del diseño compuesto, fue evaluado estadísticamente para ver el grado de ajuste a los datos experimentales. El análisis de varianza del modelo cuadrático de la Ecuación 19, se presenta en el Cuadro 24. En la evaluación estadística, el

análisis de varianza indica que el modelo cuadrático utilizado es altamente significativo ( $p < 0.001$ ) en el proceso.

**Cuadro 24: Análisis de varianza (ANOVA) del modelo cuadrático del diseño de mezcla para la optimización del rendimiento de fructosa**

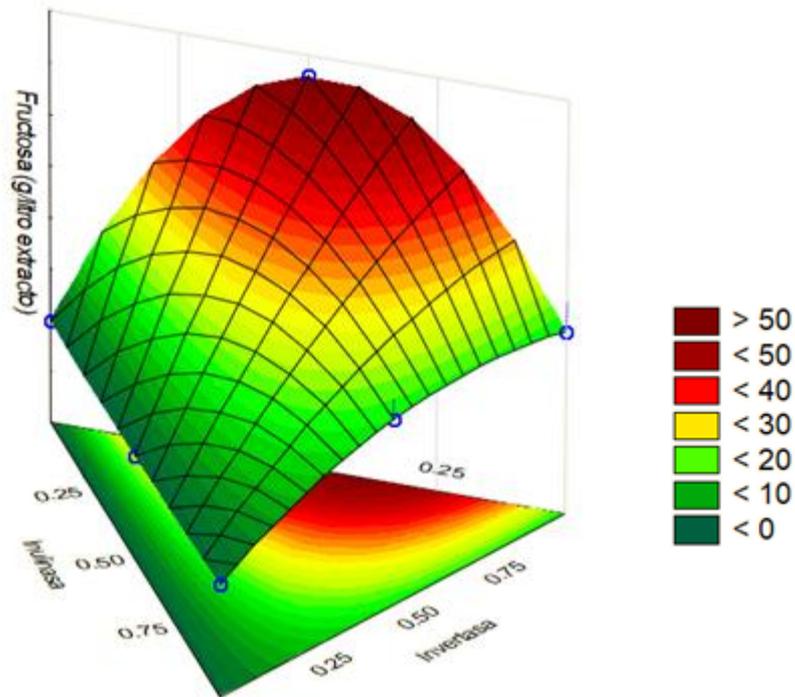
FACTORES	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADO MEDIO	VALOR -F	VALOR-P	SIGNIFICANCIA
Modelo cuadrático	4357.390	5	871.478	8646.260	0.000	***
Error puro	0.504	5	0.101			
Error Total	0.504	5	0.101			
Total	4357.890	10				
R <sup>2</sup>	0.999					
R <sup>2</sup> ajustado	0.998					

\* Significancia a un nivel de  $\alpha=0.05$ ; \*\*Significancia a un nivel de  $\alpha=0.01$ ; \*\*\*Significancia a un nivel de  $\alpha=0.001$ ; n.s.= No significativo.

Con respecto al coeficiente de determinación ( $R^2$ ) se pudo establecer que el 99.9 por ciento de la variabilidad de los resultados es explicado por el modelo cuadrático y que existe un alto grado de correlación entre los valores experimentales y estimados, debido a que el  $R^2$  fue de 0.999 y el  $R^2$  ajustado fue de 0.998.

#### 4.5.2. ANÁLISIS DE LA SUPERFICIE RESPUESTA

En la Figura 16 se muestra el efecto de la relación concentración de inulinasa ( $10^{-2}$  U), concentración de invertasa ( $10^{-3}$  U) y el porcentaje de FOS sobre el rendimiento de fructosa (g/L de extracto de yacón), de donde se observa que la variable concentración de enzima invertasa ( $X_2$ ) ejerce un efecto cuadrático sobre la variable respuesta, corroborando el comportamiento anteriormente encontrado; mientras que la variable concentración de enzima inulinasa ( $X_1$ ) ejerce un efecto lineal, posiblemente por la baja afinidad que presenta esta enzima con el sustrato. Por otra parte, la variable porcentaje de FOS ( $X_3$ ) ejerce un efecto cuadrático sobre la variable respuesta.



**Figura 16: Superficie respuesta del rendimiento de fructosa en función a los factores: inulinasa ( $10^{-2}$ U), invertasa ( $10^{-3}$ U) y FOS (%)**

Las condiciones óptimas de la hidrólisis enzimática en el diseño de mezcla fueron: concentración de inulinasa  $1.756 \times 10^{-11}$  U lo que se traduce a  $1.930 \times 10^{-10}$  U/g FOS, concentración de invertasa  $4.328 \times 10^{-3}$  U equivalente a 0.048 U/g FOS y 4.55 por ciento de FOS obteniéndose un rendimiento de 56.31 g fructosa/L de extracto de yacón, ello evidencia que la inulinasa no influyó de manera importante en la hidrólisis de los FOS cuando actúan ambas enzimas para obtener fructosa, teniendo mayor actividad la invertasa.

En estudios como el de Liu *et al.* (2016) en el que se analiza el sinergismo de la exo y endoinulinasa para la hidrólisis de inulina, se ha demostrado que la actividad de la exoinulinasa se ve favorecida con los productos de hidrólisis de la endoinulinasa, ya que ésta provee al medio oligofruktanos de mediana longitud (grado de polimerización entre 9- 16). Este comportamiento es similar al estudio realizado por Montañez *et al.* (2011) en el que reportan valores de hidrólisis de inulina al 100 por ciento usando exo y endoinulinasas, en proporción 5:1 (25 U/ml) a un pH de 4.5 con una temperatura de 50 °C en 2.5 horas. De otro lado, en este estudio se puede observar que la acción de la endoinulinasa influye poco en la hidrólisis de los FOS, teniendo la invertasa un rol más participativo en la reacción.

### 4.5.3. VALIDACIÓN DEL MODELO

La ecuación fue validada realizando pruebas para predecir los valores de la respuesta óptima con las condiciones óptimas recomendadas. Se encontró que los valores experimentales están de acuerdo con el valor estimado por el modelo, por lo tanto se puede recomendar la ecuación (ver Cuadro 25).

**Cuadro 25: Condición óptima recomendado por la ecuación de segundo orden, la respuesta estimada y experimental**

CONDICIONES ÓPTIMAS	CODIFICADO	NO CODIFICADO	
Inulinasa ( $10^{-2}$ U)	-0.999	$1.756 \times 10^{-9}$	
Invertasa ( $10^{-3}$ U)	0.082	4.328	
FOS (%)	-0.082	5.672	
VARIABLE RESPUESTA	ESTIMADA	*EXPERIMENTAL	RANGO
Tasa de conversión (g Fructosa/ L de extracto de yacón)	56.310	$56.18 \pm 0.14$	55.04 - 56.32

\*Media  $\pm$  desviación estándar, n=3(triplicado)

### 4.6. COMPARACIÓN ENTRE LA HIDRÓLISIS QUÍMICA Y ENZIMÁTICA

En el Cuadro 26 se presentan los mejores resultados de los valores óptimos encontrados en cada hidrólisis. Para el caso de la hidrólisis química se obtuvo el mejor valor con el ácido sulfúrico (9.118 g/ L de extracto de yacón), lo que representa un total de 15.52 g de fructosa total (fructosa inicial en el extracto más la fructosa procedente de la hidrólisis) en la solución; mientras que, con la mejor hidrólisis enzimática llevado a cabo con la invertasa se obtuvo como valor óptimo en rendimiento de fructosa 7.506 g/ L de extracto de yacón lo que representa un 13.91 g de fructosa total en la solución. Por otro lado, se sabe que los jarabes en alta fructosa (JAF-55) a una concentración de 77 grados Brix, poseen 55 g de fructosa (Rippe 2014); por lo que llevando los resultados obtenidos a la misma concentración, usando las condiciones óptimas mencionadas para la hidrólisis química y enzimática se obtendría

59.91 y 53.52 g de fructosa, respectivamente; valores similares a los que comercialmente se ofrece en el mercado. Sin embargo, se sabe que las condiciones drásticas a las que están sometidos los azúcares en la hidrólisis química limitan su uso por la posible formación de compuestos tóxicos (Pekic *et al.* 1985, Blecker *et al.* 2002, Eskandari *et al.* 2009, Glibowski y Bukowska 2011), es por ello que, para obtener un jarabe de alta fructosa no se recomienda realizar una hidrólisis química sin antes evaluar la posible formación de compuestos tóxicos.

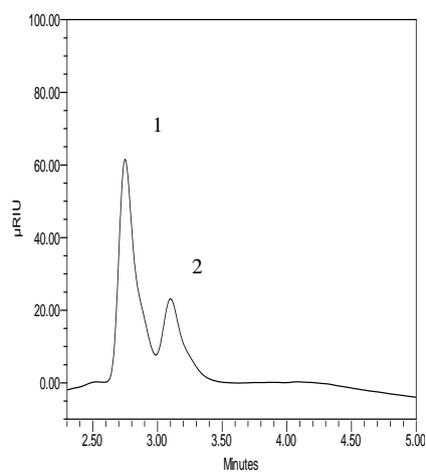
De otro lado, en el diseño de mezclas se analizó diferentes concentraciones de sustrato y cantidades de enzimas (inulinasa e invertasa), y se obtuvo como valor óptimo en rendimiento de fructosa 56.31 g/L de extracto de yacón a partir de una concentración de FOS en el extracto de 5.67 por ciento lo que representó un 93.02 g de fructosa total en la solución. Si llevamos los resultados a la condición de trabajo del uno por ciento de FOS (tal como se evaluaron los ensayos bajo hidrólisis química y enzimática) se aprecia que se lograría obtener por cada L de solución de FOS al 1 por ciento un contenido de fructosa de 9.92 g/L de extracto de yacón (ver Cuadro 26), valor ligeramente superior al óptimo encontrado para la hidrólisis química con ácido sulfúrico. Los valores de rendimiento de fructosa de cada tipo de hidrólisis son diferentes significativamente (ver ANEXO 8).

Comparando los resultados del diseño de mezclas enzimática y el obtenido con el diseño de MSR para la hidrólisis enzimática solo con invertasa, la diferencia con respecto a esta última, se debería a la intervención de la inulinasa (en pequeñas cantidades), por lo tanto, es probable que dicha enzima ejerza un efecto en la acción hidrolítica de los FOS por parte de la invertasa. Este comportamiento ha sido observado también en la literatura, en donde pequeñas cantidades de una enzima puede intervenir en la acción de otra (Montañez *et al.* 2011, Liu *et al.* 2016).

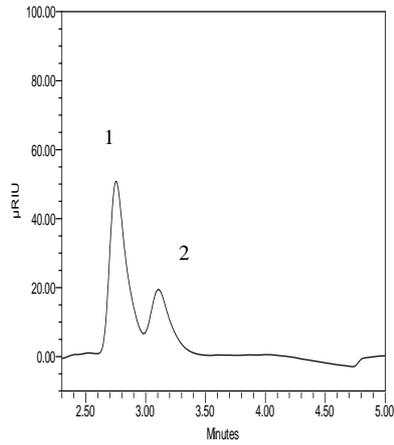
En la Figura 17, se representa los cromatogramas obtenidos de los extractos hidrolizados óptimamente bajo las condiciones ácidas con ácido sulfúrico, enzimático con invertasa y el de la mezcla enzimática inulinasa/invertasa. En todos los cromatogramas se observa dos picos, correspondientes a pico 1: fructosa (tiempo de retención de: 2.75 min) y pico 2: glucosa (tiempo de retención: 3.25 min), los que se indica que para todos los casos, estos serían los dos únicos azúcares en el extracto hidrolizado de yacón, donde la presencia de FOS es despreciable (no se detecta) o nula.

**Cuadro 26: Comparación de los resultados en rendimiento en fructosa, fructosa total y glucosa total en los extractos de yacón al 1 por ciento de FOS sometidos a hidrólisis**

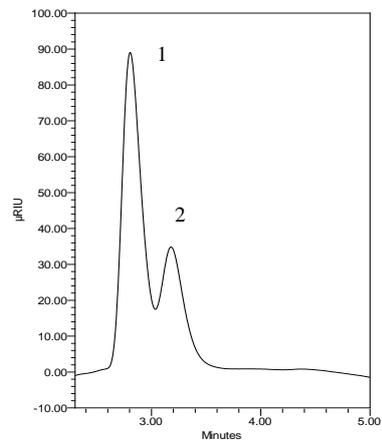
TRATAMIENTO	RENDIMIENTO (g FRUCTOSA/L EXTRACTO) A PARTIR DE UN EXTRACTO DE 1% DE FOS	FRUCTOSA TOTAL (g/ L EXTRACTO)	GLUCOSA (g/L EXTRACTO)
Hidrólisis con ácido sulfúrico	9.12	15.52	5.38
Hidrólisis con invertasa	7.51	13.91	4.49
Hidrólisis invertasa/inulinasa	9.92	16.32	7.13



(a)



(b)



(c)

**Figura 17: Cromatograma del UPLC- IR para la validación de la hidrólisis (a) química usando ácido sulfúrico, (b) enzimática usando solo invertasa y (c) empleando la combinación de enzimas inulinasa/invertasa del diseño de mezclas. Las corridas se han realizado a una concentración de sólidos de 2 por ciento.**

## V. CONCLUSIONES

- De acuerdo al diseño Box Behnken, las condiciones óptimas de la hidrólisis química del extracto de yacón al uno por ciento de FOS, empleando ácido sulfúrico fueron: pH 1, temperatura 88.4 °C y tiempo de 38.7 min obteniéndose un rendimiento de fructosa de 9.118 g/L de extracto de yacón; mientras que con el ácido fosfórico las condiciones fueron: pH 1, temperatura 89.9 °C y tiempo de 42.2 min obteniendo un rendimiento de 7.848 g fructosa/ L de extracto de yacón.
- De acuerdo al diseño Central Compuesto, las condiciones óptimas de la hidrólisis enzimática del extracto de yacón empleando inulina fueron: tiempo de 134 min y concentración de enzima de 11.7 U/g FOS; mientras que con la invertasa fueron: tiempo de 127.5 min y concentración de enzima  $6.74 \times 10^{-1}$  U/g FOS, ambas reacciones de hidrólisis bajo las condiciones constantes de temperatura 50 °C y pH 5, obteniendo un rendimiento de 6.165 y 7.506 g fructosa/L de extracto de yacón al uno por ciento de FOS, respectivamente.
- De acuerdo al diseño de Mezclas, las condiciones óptimas de las hidrólisis enzimática del extracto de yacón empleando inulina e invertasa fueron:  $1.930 \times 10^{-1}$  U/g FOS de inulina, 0.048 U/g FOS de invertasa y 4.55 por ciento de FOS, bajo condiciones constantes de temperatura 50 °C, pH 5 y tiempo de 2 horas, obteniéndose un rendimiento de 56.31 g de fructosa/L de extracto de yacón.
- Se observó que la inulina mostró un efecto hidrolítico importante en la acción hidrolítica de la invertasa sobre los azúcares del extracto de yacón, bajo las condiciones de trabajo.

- Los modelos cuadráticos del diseño Box-Behnken para la hidrólisis química, el diseño Central Compuesto y el diseño de Mezclas representaron adecuadamente los resultados experimentales, tanto para la hidrólisis ácida como para la hidrólisis enzimática del extracto de yacón.

## **VI. RECOMENDACIONES**

- Evaluar la purificación de azúcares provenientes del hidrolizado químico y enzimático.
- Evaluar la posible formación de compuestos no deseables (hidroximetilfurfural) en la hidrólisis química.
- Realizar un escalamiento industrial del proceso de hidrólisis enzimática con las condiciones óptimas de la mezcla.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar G. 1995. Estudio de cuatro métodos para la obtención de glucosa a partir de almidón de camote (*Ipomoea batatas (L.) Lam.*). Tesis Ing. Lima, Perú, UNALM. s. p.
- Aldabe, J.; Hueto, A.; Juni, J.; López, P. 1998. Biología. San Sebastián, España, Editorial Erein S.A. s.p.
- Anderson-Cook, M.; Borror, M.; Montgomery, C. 2009. Response Surface Design: Evaluation and Comparison. *Journal of Statistical Planning and Inference* 139:629-674.
- Ashokkumar, B.; Nagarajan, K.; Paramasamy, G. 2001. Optimization of media for  $\beta$ -fructofuranosidase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentation. *Process Biochemistry* 37(4):331-338.
- Ayala, J.; Pardo, R. 1995. Optimización por diseños experimentales con aplicaciones en ingeniería. Lima, Perú, Editorial CONCYTEC. 261 p.
- Blecker, C.; Fougnyes, C.; Van Herck, J.; Chevalier, J.; Paquot, M. 2002. Kinetic Study of the Acid Hydrolysis of Various Oligofructose Samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(6):1602-1607.
- Boyer, P. 1972. The enzymes. Elimination and Addition Aldol Cleavage and Condensation other C-C Cleavage Phosphorolysis and hydrolysis. New York, EEUU, Editorial Academic Press. S.A. s.p.
- Campos, D.; Betalleluz, I.; Tauquino, R.; Chirinos, R.; Pedreschi, R. 2009. Nutritional and functional characterisation of Andean chicuru (*Stangea rhizanta*). *Journal Agriculture and Food Chemistry* 112:63-70.
- Campos, D.; Aguilar, A.; Pedreschi, R. 2016. Stability of fructooligosaccharides, sugars and color of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) roots during blanching and drying. *International Journal of Food Science and Technology* 51:1177-1185.
- Carvalho, C.; Zapata, C. 2015. Thermodynamic analysis of sorption isotherms of dehydrated yacon (*Smallanthus sonchifolius*) bagasse. *Food Bioscience* 12:26-33.

- Castillo, A.; Chamy, R. 2010. Producción de Inulinasa por levaduras de *Kluyveromyces marxianus*. *Scientia Agropecuaria* 2:235-245.
- Coronado, A. 2013. Elaboración De la harina de yacón (*Smallanthus sonchifolius*) y su influencia en el crecimiento de dos bacterias probióticas. Tesis Quim. Farm. Lima, Perú, UNMSM. s.p.
- Doherty, W.O.S.; Greenwood, J.; Pilaski, D.; Wright; P.G. 2002. The effect of liming conditions in juice clarification. *Proceedings of the Australian Society of Sugar Cane Technologists* 24:443- 451.
- Eskandari, N.; Habibi- Rezaei, M.; Khaki, A.; Balvardi, M. 2009. Investigation on Acid Hydrolysis of Inulin: A Response Surface Methodology Approach. *International Journal of Food Engineering* 5:1556-3758.
- Fernández, C; Piñeiro, M. 2013. Superficies de Respuestas: Métodos y Diseños (en línea). Tesis Lic. Argentina, UNL. Consultado 15 Mar 2016. Disponible en [http://fcb.unl.edu.ar/laboratorios/ladaq/curso\\_TopQuim\\_2013/Bibliografia%20RSM/superficie%20de%20respuesta%201.pdf](http://fcb.unl.edu.ar/laboratorios/ladaq/curso_TopQuim_2013/Bibliografia%20RSM/superficie%20de%20respuesta%201.pdf).
- Flórez, J. 2008. Estudio de oligomerización de invertasa de *Saccharomyces cerevisiae* mediante el entrecruzamiento intermolecular. Tesis Lic. Colombia, UIS. s.p.
- Gil, A. 2007. Tratado de nutrición: composición y calidad nutritiva de los alimentos. Madrid, España, Editorial Médica Panamericana S.A. s.p.
- Glibowski, P.; Bukowska, A. 2011. The effect of pH, temperature and heating time on Inulin chemical stability. *Acta Scientiarum Polonorum Technology Aliment* 10 (2):189-196.
- Goto K., Fukai K., Hikida J., Nanjo F., Hara Y. 1995. Isolation and structural analysis of oligosaccharides from yacon (*Polymnia sonchifolius*). *Biosci. Biotechnol. Biochem* 59:2346-2347.
- Graefe, S.; Hermann, M.; Manrique, I.; Golombek, S.; Buerkert, A. 2004. Effects of post-harvest treatments on the carbohydrate composition of yacon roots in the Peruvian Andes. *Field Crops Research* 8(2):157-165.
- Hernández, L. 2006. Predicción y optimización de emisores y consumo mediante redes neuronales en motores diésel. Barcelona, España, Editorial Reverté S.A. s.p.
- Hernalsteens, S.; Maugeri, F. 2008. Purification and characterisation of a fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. *Biotechnologically relevant enzymes and proteins* 79:589- 596.

- Herrera R., CH.; Bolaños V., N.; Lutz C., G. 2003. Química de Alimentos: Manual de laboratorio. Costa Rica, Editorial de la Universidad de Costa Rica. 142 p.
- Homme, C.; Arbelot, M.; Puigserver, A.; Biagini, A. 2003. Kinetics of Hydrolysis of Fructooligosaccharides in Mineral- Buffered Aqueous Solutions: Influence of pH and Temperature. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51:224-228.
- INEI (Instituto Nacional de Estadística e Informática). 2014. Agrario: Compendio Estadístico del Perú (en línea). Lima, Perú. Consultado 20 jun 2016. Disponible en [https://www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/publicaciones\\_digitales/Est/Lib1173/cap12/cap12.pdf](https://www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/publicaciones_digitales/Est/Lib1173/cap12/cap12.pdf).
- Inga, M., Betalleluz, I., Kina, M., Campos, D. 2015. Optimización del proceso de extracción de los Fructooligosacaridos de yacón (*Smallantus sonchifolius*). *Revista de la Sociedad Química del Perú* 81(3):263-272.
- Jaime, L.; Martin, M. A.; Molla', E.; López-Andréu, F.; Esteban, R. M. 2001. Effects of storage on fructan and fructooligosaccharide of onion (*Allium cepa* L.). *Journal Agriculture and Food Chemistry* 49:982-988.
- Jesús, E. 1995. Ácidos y Bases (en línea). Madrid, España, Universidad de Alcalá. Consultado 2 Ago 2016. Disponible en [http://www3.uah.es/edejesus/resumenes/IQI/tema\\_5.pdf](http://www3.uah.es/edejesus/resumenes/IQI/tema_5.pdf).
- Jiménez C., MG. 2015. Superficies Respuesta mediante un Diseño Central Compuesto. *Revista Varianza* 11:31-36.
- Kina, M. 2016. Optimización de los procesos de extracción de fructooligosacáridos y clarificación del extracto acuoso de yacón (*Smallanthus sonchifolius* Poepp & Endl.). Tesis Ing. Lima, Perú, UNALM. s.p.
- Klages, F. 1968. Tratado de Química Orgánica: Casos especiales. Barcelona, España, Editorial Reverté S.A. 861 p.
- Kurakake, M.; Masumoto, R.; Maguma, K.; Kamata, A.; Saito, E.; Ukita, N.; Komaki, T. 2010. Production of Fructooligosaccharides by  $\beta$ - Fructofuranosidases from *Aspergillus oryzae* KB. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58:488-492.
- Kuster, B. 1990. 5- Hidroximetilfurfural, a review focussing in its manufacture. *Starch- Starke* 42:314-321.
- Kuster, B; Van der Baan, H. 1977. The influence of the initial and catalyst concentrations on the dehydration of D- fructose. *Carbohydrate Research* 54:165-176.

- Laksameethanasana, P.; Somla, N.; Janprem, S.; Phochuen, N. 2012. Clarification of sugarcane juice for syrup production. *Procedia Engineering* 32:141– 147.
- Leskovac, V. 2003. *Comprehensive Enzyme Kinetics*. Kluwer Academy Publishers. 437 p.
- Li, Y.; Fu, WJ.; Liu, NN.; Tan, MJ.; Liu, GL.; Chi, ZM. 2015. Role of SUC2 gene and invertase of *Saccharomyces* sp. W0 in inulin hydrolysis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 111:71-78.
- Liu, Y.; Zhou, SH.; Cheng, YR.; Chi, Z.; Chi, ZM.; Liu, GL. 2016. Synergistic effect between the recombinant exo- inulinase and endo- inulinase on inulin hydrolysis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 120:27-38.
- Lobo, A.; Colli, C.; Alvares, E.; Filisetti, T. 2007. Effects of fructans-containing yacon (*Smallanthus sonchifolius* Poepp & Endl.) flour on caecum mucosal morphometry, calcium and magnesium balance, and bone calcium retention in growing rats. *British Journal of Nutrition* 97:776-785.
- Manrique, I.; A. Párraga y M. Hermann. 2005. Jarabe de yacón: Principios y Procesamiento. Lima, Perú, UNDAC. s.p.
- Manrique, I.; Hermann, M.; Bernet, T. 2005. Yacon - Ficha Técnica (en línea). Consultado 9 ago 2016. Disponible en <http://infoandina.mtnforum.org/sites/default/files/publication/files/R2006082306.pdf>.
- Mejía, R. 2015. Impregnación al vacío de fructooligosacáridos de yacón (*Smallanthus sonchifolius* Poepp & Endl.) en manzana. Tesis Ing. Lima, Perú, UNALM. s.p.
- Montañez S, JL.; Venegas G, J.; Bernardino N, A.; Ramos R, EG. 2011. Enzymatic production of high fructose syrup from *Agave tequilana* fructans and its physicochemical characterization. *African Journal of Biotechnology* 10(82):19137-19143.
- Montgomery, D. 2002. *Diseño y análisis de experimentos*. México, Editorial Limusa S.A. 686 p.
- Myers, R.; Montgomery, D.; Anderson- Cook, C. 2016. *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization using design experiments*. Ney Jersey, EEUU, Editorial Wiley S.A. 855 p.

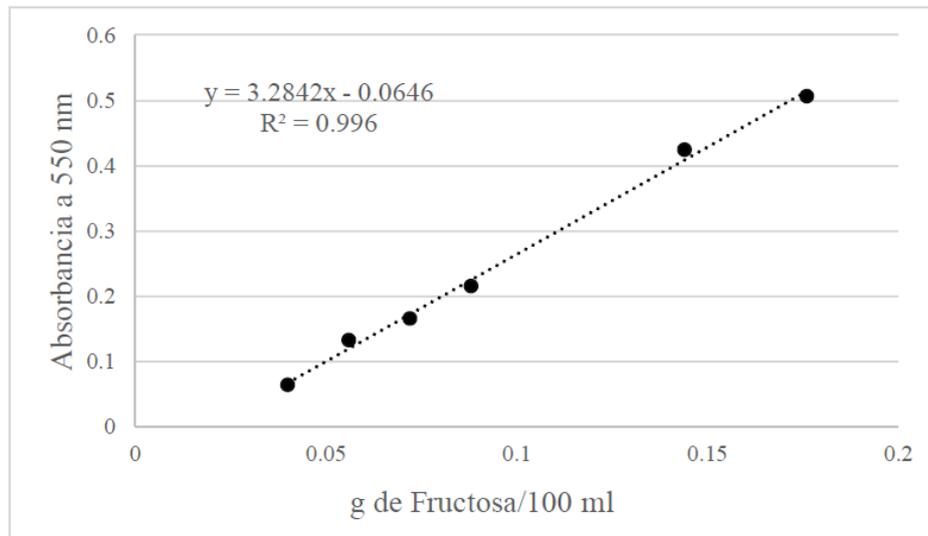
- National Research Council. 1989. Lost Crops of the Incas: little-known plants of the Andes with promise for worldwide cultivation. Washington, EEUU., Editorial Academy Press S.A. 415 p.
- Nobre, C.; Suvarov, P.; De Weireld, G. 2014. Evaluation of commercial resins for fructo-oligosaccharide separation. *New Biotechnology* 31(1):55-63.
- Noureddine B.; Norio S. 2006. Hydrolysis Kinetic Parameters of DP 6, 7, 8, and 9-12 Fructooligosaccharides (FOS) of Onion Bulb Tissues. Effect of Temperature and Storage Time. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 54:2587-2592.
- Ohyama, T.; Ito, O.; Yasuyoshi, S.; Ikarashi, T.; Minamisawa, K.; Kubota, M.; Tsukihashi, T.; Asami, T. 1990. Composition of storage carbohydrate in tubers of yacon (*Polymnia sonchifolia*). *Japanese Society of Soil Science and Plant Nutrition* 36(1):167-171.
- Ojansivu, I.; Ferreira, CL.; Salminen, S. 2011. Yacon, a new source of prebiotics oligosaccharides with a history of safe use. *Food Science & Technology* 22:40-46.
- Pasasrini, K.; Gamarra, F.; Vanalle, R.; Santana, J. 2012. Reutilización de las Aguas Residuales en la Irrigación de Planas y en la Recuperación de los Suelos. *Información Tecnológica* 23(2): 57-64.
- Pedreschi, R.; Campos, D.; Noratto, G.; Chirinos, R.; Cisneros-Zevallos, L. 2003. Andean Yacon Roots (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. Endl) Fructooligosaccharides as a Potential Novel Source of Prebiotics. *Agricultural and Food Chemistry* 51:5278- 5284.
- Pekic, B.; Slavica, Z.; Lepojevic, Z.; Petrovic, S. 1984. Effect of the Acid Hydrolysis of Jerusalem Artichoke Inulin. *Food Chemistry* 17(1): 169-173.
- Prati, P; Moretti, R. 2010. Study of clarification process of sugar cane juice for consumption. *Cienc. Tecnol. Aliment* 30(3):776-783.
- Ricca, E.; Calabro, V.; Curcio, S.; Iorio, G. 2009. Fructose production by chicory inulin enzymatic hydrolysis: A kinetic study and reaction mechanism. *Process Biochemistry* 44:466-470.
- Rippe, JM. 2014. Fructose, High Fructose Corn Syrup, Sucrose and Health. New York, EEUU, Editorial Humana Press S.A. 379 p.
- Rocha, JR.; Catana, R.; Ferreira, BS.; Cabral, JMS.; Fernandes, P. 2006. Design and characterisation of an enzyme system for inulin hydrolysis. *Food Chemistry* 6:77-82.

- Sarchami, T.; Rehmman, L. 2014. Optimizing Acid Hydrolysis of Jerusalem Artichoke- Derived Inulin for Fermentative Butanol Production. *Bioenergy Research* 8(3):1148-1157.
- Sarchami, T.; Rehmman, L. 2014. Optimizing enzymatic hydrolysis of inulin from *Jerusalem artichoke* tubers for fermentative butanol production. *Biomass and Bioenergy* 69:175-182.
- Seminario, J.; Valderrama, M.; Manrique, I. 2003. El yacón: fundamentos para el aprovechamiento de un recurso promisorio. Centro Internacional de la Papa (CIP), Universidad de Cajamarca, Agencia Suiza para el Desarrollo y la Cooperacion (COSUDE) (Ed). Lima, Perú, s. e. 60 p.
- Shukla, P.; Pletschke, B. 2013. *Advances in Enzyme Biotechnology*. New Delhi, India, Editorial Springer S.A. 175 p.
- Simonovska, B.; Vovk, I.; Andresek, S.; Valentová, K.; Ulrichová, J. 2003. Investigation of phenolic acids in yacón (*Smallanthus sonchifolius*) leaves and tubers. *Journal of Chromatography A* 1016(1):89-98.
- Szambelan, K.; Nowak, J. 2006. Acid and enzymatic hydrolysis of Jerusalem Artichoke (*Helianthus Tuberosus* L.) tubers for further etanol production. *Journal of Chromatography A* 9(4):80-98.
- Tan, E.; Ngoh, Y. y Gan, CH. 2014. A comparative study of physicochemical characteristics and functionalities of pinto bean protein isolate (PBPI) against the soybean protein isolate (SPI) after the extraction optimisation. *Food Chemistry* 152: 447-455.
- Tinoco, I., Sauer, K. y Wang, J. C. 1994. *Physical Chemistry: Principles and Applications in Biological Sciences*. Madrid, España, Editorial Prentice-Hall S.A. s.p.
- Traut, T. 2008. *Allosteric Regulatory Enzymes*. New York, EEUU, Editorial Springer S.A. s.p.
- Tomotani, E. J.; Vitolo, M. 2004. Screening of Dowex anion exchange resins for invertase immobilization. *Applied Biochemical Biotechnology* 56:145-159.
- Tomotani, E. J.; Vitolo, M. 2007. Production of high-fructose syrup using immobilized invertase in a membrane reactor. *Journal of Food Engineering* 80:662-667.
- Vaňková, K.; Polakovič, M. 2010. Optimization of single-colum chromatographic separation of fructooligosaccharides. *Process Biochemistry* 45(8):1325-1329.

- Vargas, C. 2009. Obtención de insumos de interés industrial a partir de las fructanas del agave mezcalero potosino (*Agave salmiana*). Tesis Lic. México, Instituto Politécnico Nacional. s.p.
- Veana F.; Aguilar CN.; Viader. Salvador JM.: Rodriguez- Herrera R. 2011. Invertasa del Género *Aspergillus* y su Impacto Biotecnológico. *Biotecnología* 15(1):11-29.
- Vilhena S.M.C.; Camara, F.L.A.; Piza, I.M.T.; Lima, G.P.P. 2003. Contenido de fructanos en raíces tuberosas de yacón (*Polymnia sonchifolia*). *Cienc. Tecnol. Aliment* 4(1):35-40.
- Ward, W. 2012. The Isolation of Invertase from Baker's Yeast – An Introduction to Protein Purification Strategies, *Protein Purification* (en línea). Consultado 15 dic 2016. Disponible en <https://www.intechopen.com/books/protein-purification/tpp-and-other-new-applications-for-ammonium-sulfate-precipitation>.
- Wenling, W.; Le H, WW.; Shiyuan, W. 1999. Continuous preparation of fructose syrups from Jerusalem artichoke tuber using immobilized intracellular inulinase from *Kluyveromyces* sp. Y- 85. *Process Biochemistry* 34:643- 646.
- Zhao, Z.; Wang, X.; Zhou, G.; Cao, Y.; Lu, P.; Liu, W. 2016. Hydrolysis kinetics of inulin by imidazole-based acidic ionic liquid in aqueous media and bioethanol fermentation. *Chemical Engineering Science* 15:116-124.
- Zeitsch, K. 2000. The Chemistry and Technology of furfural and its many by-products: Series Sugar. Elsevier Science B.V 13:3-5.

## VIII. ANEXOS

### ANEXO 1: CURVA ESTÁNDAR DE SOLUCIONES DE FRUCTOSA



Ecuación:  $y = 3.2841x - 0.0646$

Donde:

y: Absorbancia a 550 nm

x: g de Fructosa/100 ml

En el Anexo 18 se muestra la curva estándar con soluciones de fructosa. Los resultados se expresan como g de fructosa/100 ml.

**ANEXO 2: CONDICIONES ÓPTIMAS PARA LA HIDRÓLISIS QUÍMICA USANDO ÁCIDO SULFÚRICO MEDIANTE LA FUNCIÓN DE DESEABILIDAD**

ÓPTIMO (d= 0.9118)	pH (1-3) [1]	TIEMPO (20- 70) (min) [38.7]	TEMPERATURA (60- 98) (°C) [88.4]
Rendimiento de fructosa máximo 9.118 g/L de extracto de yacón			

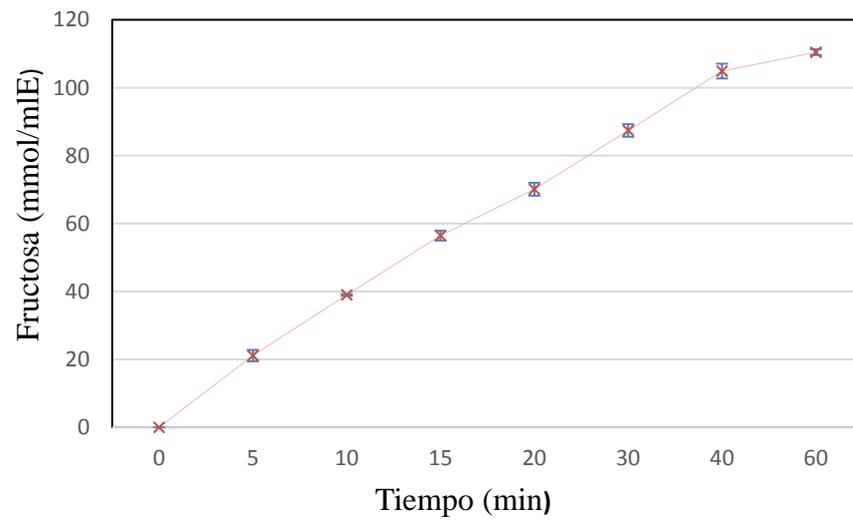
El Anexo 2 muestra las condiciones óptimas para maximizar el rendimiento de Fructosa utilizando el método de la función de deseabilidad para la hidrólisis química con ácido sulfúrico.

**ANEXO 3: CONDICIONES ÓPTIMAS PARA LA HIDRÓLISIS QUÍMICA USANDO ÁCIDO FOSFÓRICO MEDIANTE LA FUNCIÓN DE DESEABILIDAD**

ÓPTIMO (d= 0.785)	pH (1-3) [1]	TIEMPO (20- 70) (min) [42.2]	TEMPERATURA (60- 98) (°C) [89.94]
Rendimiento de fructosa máximo 7.848 g/L de extracto de yacón			

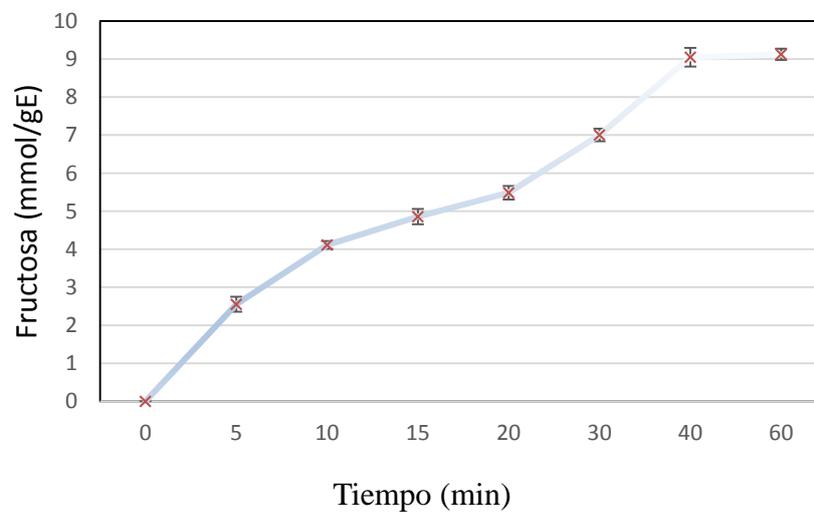
El Anexo 3 muestra las condiciones óptimas para maximizar el rendimiento de Fructosa utilizando el método de la función de deseabilidad para la hidrólisis química con ácido fosfórico.

#### ANEXO 4: ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA INULINASA.



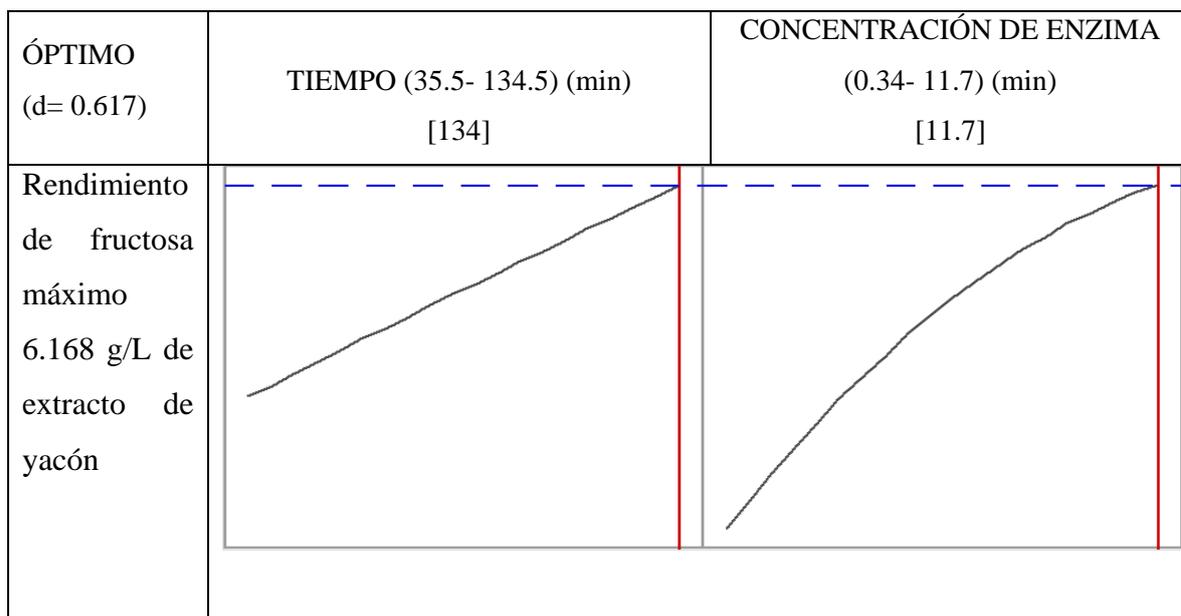
El Anexo 4 muestra la actividad enzimática de la inulinasa en Inulina al 3 por ciento, pH 5, temperatura 50 °C.

#### ANEXO 5: ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA INVERTASA.



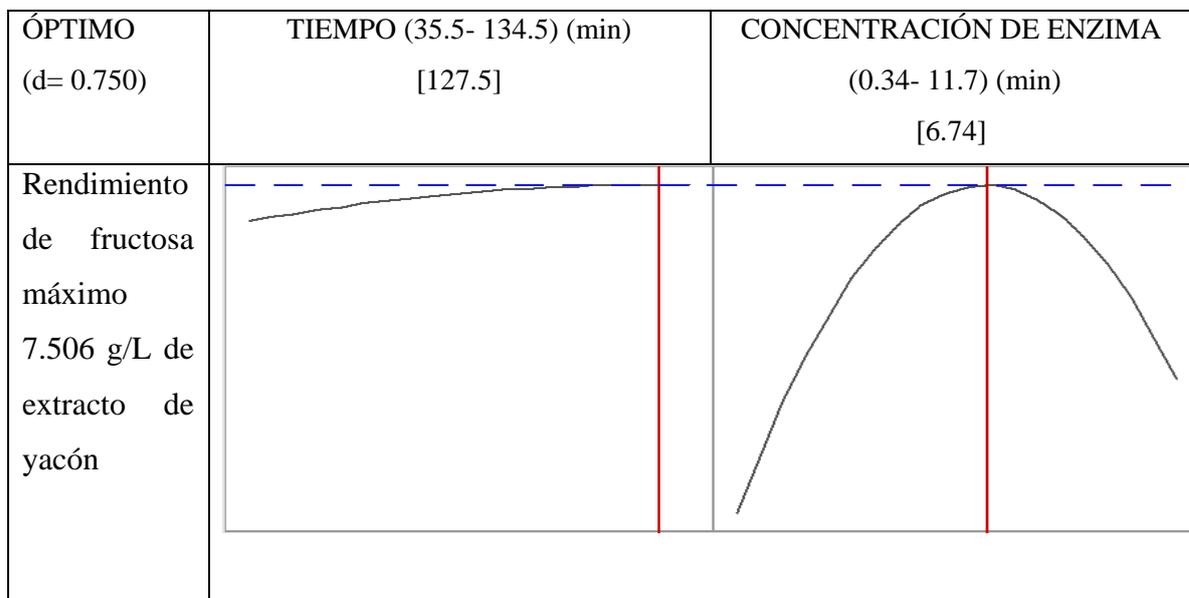
El Anexo 5 muestra la actividad enzimática de la Invertasa en Inulina al 3 por ciento, pH 5, temperatura 50 °C.

**ANEXO 6: CONDICIONES ÓPTIMAS PARA LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA USANDO INULINASA**



El Anexo 6 muestra las condiciones óptimas para maximizar el rendimiento de Fructosa utilizando el método de la función de deseabilidad para la hidrólisis enzimática con inulinasa.

**ANEXO 7: CONDICIONES ÓPTIMAS PARA LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA USANDO INVERTASA.**



El Anexo 7 muestra las condiciones óptimas para maximizar el rendimiento de Fructosa utilizando el método de la función de deseabilidad para la hidrólisis enzimática con invertasa.

**ANEXO 8: ANOVA DE LOS VALORES DE RENDIMIENTO DE FRUCTOSA DE LAS TRES HIDRÓLISIS.**

FUENTE	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADO MEDIO	RAZÓN-F	VALOR-P
Entre grupos	129.988	2	64.9941	24073.30	0.0000
Intra grupos	0.0162	6	0.0027		
Total (Corr.)	130.004	8			

En el Anexo 8 se observa el cuadro de análisis de varianza de los valores de rendimiento de fructosa (g/L de extracto de yacón al uno por ciento). Debido a que el valor-*p* es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las tres medias con un nivel de confianza del 95.0 por ciento.